

Даний винахід відноситься до застосування антагоніста хемокінового рецептора спільно з циклоспорином з метою отримання фармацевтичної композиції для лікування або профілактики відторгнення трансплантованих органів, тканин або клітин. Він відноситься також до вказаних фармацевтичних композицій для (далі скрізь) одночасного, роздільного або послідовного застосування його активних інгредієнтів у вказаній вище терапії.

Зокрема, він відноситься до застосування Met-RANTES спільно з циклоспорином А з метою отримання фармацевтичного складу для лікування відторгнення алогенного трансплантата нирки.

Передумови до створення винаходу

Механізм, за яким формується Т-клітинна відповідь на чужорідний (алогенний або ксеногенний) білок або клітину, або орган, досить добре вивчений Антигенпрезентуючі клітини (АПК) притягуються до дільниць запалення або пошкодження (які можуть бути викликані хірургічною трансплантацією). Спектр Т-клітин на периферії безперервно обстежує тканини для виявлення патогенів або наявності чужорідної (ало- або ксеногенної) тканини. Як тільки розпізнається який-небудь з цих попереджуючих сигналів, АПК поглинає білок, переварює його і надає його імунній системі господаря.

Імунна система добре пристосована для швидкого ідентифікування чужорідної, інфікованої або запаленої тканини і швидко її руйнує. Це завжди було основною перешкодою при трансплантації тканини, органу і клітини, а також при генній терапії. Більшість проблем звичайно пов'язані з хронічною імуносупресією, інкапсуляцією або імуноізоляцією. Небажані побічні ефекти хронічної імуносупресії включають підвищену вугливість до умовно-патогенної інфекції і утворення пухлин.

Зокрема, гостре відторгнення алотрансплантата нирки опосередковується як алоантиген-залежними, так і незалежними чинниками і характеризується моноядерним клітинним інфільтратом, що складається, в основному, з Т-лімфоцитів, моноцитів/макрофагів і атипових еозинофілів (Grone H.J., 1996, Valente J.F. et al., 1998, Bishop G.A. et al., 1986). Рекрутинг цих лейкоцитів з периферичного кровообігу до трансплантованого органу включає складну взаємодію між рядом молекул, експресованих на поверхні лейкоцитів і ендотелію (Butcher E.G., 1991, Butcher E.G. et al., 1996, Springer T.A., 1994.)

Бажання забезпечити довготривале сприйняття трансплантованої тканини за відсутності постійної імуносупресії є давньою метою медицини людини.

Було показано, що хемокіни, велике суперсімейство структурно родинних цитокінів, виборче стимулюють швидку адгезію, хемотаксис і активацію специфічних ефекторних субпопуляцій лейкоцитів (Springer T.A., 1994, Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, Schlondorff D. et al., 1997).

Хемокіни характеризуються рядом загальних структурних елементів, що включають консервативні цистеїнові залишки (C), що використовуються для розрізнення хемокінових підгруп C, C-C, C-X-C і C-X₃-C (де X означає проміжний амінокислотний залишок, розташований між першими двома N-кінцевими проксимальними цистеїнами). Вся різноманітна біологічна активність хемокінів, мабуть, контролюється їх взаємодією з великим сімейством, що охоплює сім трансмембранних зв'язаних з C-білком рецепторів (Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, Schlondorff D. et al., 1997). Специфічна експресія клітинного типу цих рецепторів, мабуть, значною мірою контролює лейкоцитну специфічність активності хемокінів (Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, Schlondorff D. et al., 1997).

Хемокін RANTES (регульований при активації, експресований і секретований нормальними Т-клітинами), член підродини хемокінів C-C, є лігандом для ряду хемокінових рецепторів, включаючи CCR1, CCR3, CCR5, CCR9 і DARC (антигеновий рецептор Даффі для хемокінів) у людини (Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, Schlondorff D. et al., 1997, Nibbs R.J. et al., 1997). RANTES є сильним хемоатрактантом для Т-клітин, моноцитів, природних клітин-кілерів, базофілів і еозинофілів (Nelson P.J. et al., 1998).

Вважається, що такі хемокіни, як RANTES, грають основну роль в клітинних інфільтратах, які складають основу різних патологічних процесів. Наприклад, RANTES експресується *in vivo* при захворюваннях, що характеризуються моноядерним клітинним інфільтратом, включаючи гіперчутливість уповільненого типу, некротизуючий гломерулонефрит, запальні захворювання легень і відторгнення ниркоподібного трансплантату (Schlondorff D. et al., 1997, Nelson P.J. et al., 1998, Devergne O. et al., 1994, Luckas N.W. et al., 1996, Lloyd C.M. et al., 1997, Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J. et al., 1993). При дослідженні людських нирок, що зазнають гострого клітинного відторгнення, було знайдено, що білок RANTES локалізований в моноядерних інфільтруючих клітинах, ниркоподібних тубулярних епітеліальних клітинах і ендотеліальному шарі перитубулярних капілярів (Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J. et al., 1993). Оскільки гостре клітинне відторгнення характеризується внутрішньосудинним розвиненим інтерстиціальним клітинним інфільтратом, що складається з моноцитів/макрофагів, Т-лімфоцитів і атипових еозинофілів, RANTES грає потенційно ключову роль в патогенезі гострого відторгнення (Schlondorff D. et al., 1997, Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J. et al., 1993).

Засновуючись на цих спостереженнях, була запропонована модель, що пояснює роль RANTES у відторгненні ниркоподібних алотрансплантатів (Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J. et al., 1993). На початку відторгнення мікрovasкулярний ендотелій запалюється, відбувається дегрануляція тромбоцитів, що вивільняє білок RANTES, який зв'язується з поверхнею ендотелію. Запалені ниркоподібні каналці і ендотеліальні клітини продукують додаткові хемокіни, включаючи RANTES. Потім акумульовані поверхово-пов'язані хемокіни подають направлені сигнали циркулюючим в крові лейкоцитам по мірі того, як вони проходять по поверхні ендотелію (Butcher E.G., 1991, Butcher E.G. et al., 1996, Springer T.A., 1994, Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J. et al., 1993). Лейкоцити впізнають поверхово-пов'язаний білок, посилюють регуляцію інтегринів і міцно прилипають до поверхні ендотелію, зазнають діapedезу і транссудації. По мірі того, як лейкоцити активуються, вони виділяють додаткові цитокіни і хемокіни, посилюючи і розповсюджуючи, таким чином, запальну реакцію (Nelson P.J. et al., 1998,

Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J., 1993).

Модифікація N-кінця білка RANTES може в істотній мірі змінити його властивості (Proudfoof A.E. et al., 1996, Gong J.H. et al., 1996, Simmons G. et al., 1997). Приєднання одного залишку метіоніну (Met) змінює агоністичний білок в антагоніст рецептора хемокіну RANTES з активністю при наномолярній концентрації (Proudfoof A.E. et al., 1996). Цей антагоніст, Met-RANTES, виявляє біологічну активність у мишей і пацюків (Proudfoof, не опубліковані спостереження) і, як було показано, ослабляє запалення на мишачих моделях алергічної шкіри і ревматоїдного артриту і частково придушує некротизуючий гломерулонефрит (Teixeira M.M. et al., 1997, Plater-Zyberk C. et al., 1997, Lloyd C.M. et al., 1997).

Циклоспори́ни являють собою групу неполярних циклічних олігопептидів з імундепресивною активністю, що продукуються грибом *Tolypocladium inflatum* Gams і іншими дефектними грибами. Основний компонент, циклоспорин А, був ідентифікований поряд з декількома іншими міноними метаболітами, циклоспори́нами від В до N. Було також отримано множини синтетичних аналогів. Циклоспорин А є комерційно доступним препаратом, який отримав широке клінічне застосування в якості імундепресанту при трансплантаті органів.

Основною проблемою застосування циклоспори́ну А є його нефротоксичність (Martindale, 1996), що характеризується затримкою рідини, підвищеною концентрацією сироваткового креатиніну і сечі, падінням швидкості гломерулофільтрації і зниженою екскрецією натрію і калію. Зокрема, у реципієнтів ниркоподібного трансплантату буває важко відрізнити нефротоксичність від відторгнення трансплантату.

Розкриття суті винаходу

У цей час автори виявили, що комбінована терапія антагоністом хемокінового рецептора і низькою дозою циклоспори́ну приводить до зменшення випадків запалення, пов'язаних з відторгненням трансплантату в порівнянні з лікуванням одним циклоспори́ном.

Зокрема, автори виявили, що Met-RANTES зменшує пошкодження судин і каналців і спричиняє значне ослаблення інтерстиціального відторгнення в ниркоподібних алотрансплантатах.

Отже, основним об'єктом даного винаходу є застосування антагоніста хемокінового рецептора в комбінації з циклоспори́ном з метою отримання фармацевтичного складу для лікування або профілактики (далі скрізь) відторгнення трансплантованих органів, тканин або клітин. Антагоніст хемокінового рецептора і циклоспорин можуть вводитися одночасно, роздільно або послідовно.

Тому іншим об'єктом даного винаходу є спосіб лікування або попередження відторгнення трансплантованих органів, тканин або клітин шляхом одночасного, роздільного або послідовного введення ефективної кількості антагоніста хемокінового рецептора і ефективної кількості циклоспори́ну разом з фармацевтичним прийнятним наповнювачем.

Термін «ефективна кількість» означає кількість активних інгредієнтів, яка є достатньою для того, щоб впливати на хід і важкість відторгнення трансплантованих органів, тканин або клітин, приводячи до ослаблення або ремісії такої патології. Ефективна кількість буде залежати від шляху введення і стану пацієнта.

Ще одним об'єктом даного винаходу є фармацевтичні склади, що містять антагоніст хемокінового рецептора і циклоспорин в присутності одного або декількох фармацевтично прийнятних наповнювачів, для одночасного, роздільного або послідовного введення активних інгредієнтів з метою лікування або попередження відторгнення трансплантованих органів, тканин або клітин.

У разі роздільного або послідовного застосування двох активних інгредієнтів фармацевтичні склади згідно з винаходом будуть включати два різних склади, причому кожний включає один або два активних інгредієнти нарівні з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами.

Мається на увазі, що термін «фармацевтично прийнятний» охоплює будь-який носій, який не впливає на ефективність біологічної активності активного інгредієнту і не є токсичним для господаря, якому вводиться. Наприклад, для парентерального введення вказані вище активні інгредієнти можуть бути змішані у вигляді одиної дози для ін'єкції в наповнювачах, таких, як фізіологічний розчин, розчин декстрози, сироватковий альбумін або розчин Рінгера.

Крім фармацевтично прийнятного носія, склади згідно з винаходом можуть також включати невеликі кількості добавок, таких, як стабілізатори, наповнювачі, буфери і консерванти.

Введення таких активних інгредієнтів може бути внутрішньовенним, внутрішньом'язовим або підшкірним. Даний винахід охоплює і інші шляхи введення, які можуть забезпечити в крові бажані рівні відповідних інгредієнтів.

Комбінована терапія згідно з даним винаходом застосовна для лікування або попередження відторгнення будь-якого трансплантованого органу, тканини або клітин, але вона особливо доцільна у випадках ниркоподібних трансплантатів із-за нефротоксичності циклоспори́ну А.

Термін «антагоніст хемокінового рецептора» означає будь-яку молекулу, яка діє як антагоніст по відношенню до зрілих, повнорозмірних, природних хемокінів і, переважно, не володіє значною хемоатрактантною активністю. Для вимірювання вказаної хемоатрактантної активності можна послатися, наприклад, на Nelson P.J. et al., 1998.

Антагоніст хемокінового рецептора вибирають переважно серед усічених молекул хемокіну RANTES, про які повідомлено в Міжнародній патентній заявці WO 97/44462, усічених MCP-3, RANTES і MIP-1 α , описаних в Міжнародній патентній заявці WO 98/06751, усічених RANTES і MCP-2, описаних в Європейській патентній заявці 97116863.8/ або подовженого по N-кінцю RANTES, описаного в WO 96/17935. Особливо переважним є Met-RANTES. У цитованих вище патентних заявках приведені також посилання на способи отримання згаданих антагоністів хемокінових рецепторів.

Циклоспорин вибирають з циклоспори́ну А, його метаболітів або синтетичних аналогів, Переважним є

циклоспорин А.

Отже, переважне втілення винаходу полягає в спільному застосуванні Met-RANTES і циклоспоринолу А для лікування або попередження відторгнення ниркоподібного алотрансплантату. Заявник знайшов, що в цьому випадку можна знизити ефективну дозу циклоспоринолу, і це є величезною перевагою, враховуючи дозо-залежну токсичність для нирки, яка, як відомо, пов'язана з лікуванням циклоспорином.

Вказаний вище ефект показаний в експериментах на пацюках *in vivo*.

Винахід буде тепер описуватися за допомогою наступних прикладів, які не повинні розглядатися як такі, що обмежують даний винахід. У прикладах будуть посилання на фігури, описані нижче.

Опис фігур

Фіг.1. Визначали здатність RANTES зв'язуватися безпосередньо з мікроеваскулярним ендотелієм до і після стимуляції з IL-1 β (5нг/мл) протягом 12 годин. DMVEC вирощували в 96-лункових планшетах, вміст RANTES вимірювали з використанням модифікованої методики ELISA.

Фіг.2а і 2б. Вплив Met-RANTES на стійку затримку, поширення або трансміграцію клітин лінії MonoMac 6 на активованому мікроеваскулярному ендотелії при фізіологічному струмі. Клітини DMVEC, вирощені до злиття в чашках Петрі, стимулювали IL-1 β (5нг/мл) або залишали необробленими (контроль) протягом 12 годин, потім заздалегідь інкубували з RANTES (10нг/мл) або без нього протягом 30 хвилин клітини MonoMac 6 заздалегідь обробляли з Met-RANTES (1мкг/мл) або без нього і перфузували при постійній швидкості струму 1,5дин/см². (а) Стійку адгезію до DMVEC визначали шляхом підрахунку міцно прикріплених моноцитів в множинних полях через 5 хвилин і виражали як клітини/мм. (б) Моноцити, що зазнають поширення або трансміграції, підраховували через 5 хвилин в множинних полях високого розрізнення і виражали як процент від спочатку міцно прикріплених клітин. Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення від 3 дослідів. (Примітка: результати були такими, що відтворюються в інтервалі Met-RANTES від 0,01 мкг/мл до 1мкг/мл).

Приклади

Матеріали і методи

Клітини, що використовуються

Лінію моноцитарних пухлинних клітин MonoMac 6 культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 10% FCS, як описано раніше (Ziegler-Heitbrock H.W.L. et al, 1988). Клітини, як звичайно, вміщували в 24-лункові планшети (фірми Costar), середовище і сироватку тестували на вміст ліпополісахаридів (ЛПС) низької щільності. Первинні людські дермальні мікроеваскулярні ендотеліальні клітини (DMVEC) з людської неонатальної крайньої плоти отримані від д-ра K. Degitz (Dermatology, LMU, Munich, Germany). Клітини вносили в середовище MCDB 131 (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Boehringer Mannheim Germany). 1мг/мл ацетату гідрокортизону (Sigma, Deisenhofen, Germany), 5x10⁵М дибутириладенозинмонофосфату (Sigma, Deisenhofen, Germany), 2мМ глутаміну (Seromed, Berlin, Germany). 100Е/мл пеніциліну, 100мг/мл стрептоміцину, 25мг/мл амфтеріцину В (антибіотичний/протигрибковий розчин Gibco BRL, Eggenstein, Germany) і інкубували при 37°C і 5% CO₂. Клітини вирощували в колбах T75, чашках Петрі діаметром 35мм (Costar, Corning, New York) або 96-лункових плоскодонних планшетах (Nunc, Wiesbaden, Germany), заздалегідь покритих 0,5% желатином (Sigma, Deisenhofen, Germany). Середовище замінювали кожні 2-3 дні. Клітини характеризували, чистоту культур забезпечували за допомогою морфологічних ознак і імуофлуоресцентної проточної цитометрії для поверхневої експресії CD31.

Матеріали

Матеріали для гістологічних досліджень отримували від фірми Merck (Darmstadt, Germany). Матеріали для хімічних і імунологічних вимірювань були поставлені фірмою Sigma (Munich, Germany). IL-1 β і TNF α придбані у фірми Sigma (Munich, Germany). Отримання рекомбінантного RANTES і RANTES-специфічного моноклонального антитіла VL1 описані раніше (Von Luetichau I., 1996). Отримували Met-RANTES і видаляли ендотоксин для досліджень *in vivo*, як описано раніше (Proudfoot A.E. et al, 1996, Teixeira M.M. et al, 1997, Plater-Zyberk C. et al., 1997, Lloyd C.M. et al., 1997).

Тварини і трансплантація нирок

У всіх експериментах використали інбредних пацюків-самців. Пацюки лінії Lewis (LEW, RT11) служили як реципієнти нирок від пацюків лінії Fisher 344 (F344 RT1^M) або Brown Norway (BN RT1^{*}). Тварин отримували від фірми Charles River GmbH, Sulzfeld, Germany. Пацюки важили 190-250г (Lew і F344) і 140-170 г (BN) для регулювання діаметра сечоводу. Трансплантацію проводили, використовуючи модифікацію методики, спочатку описаної Fisher і Lee (Fisher B. et al., 1965). Коротко, тваринам давали наркоз за допомогою ефірно-краплинної анестезії, донорську нирку промивали 5 мл холодного (4°C) 0,9% NaCl, що містить або не містить 100мкг Met-RANTES. Нирку і сечовід видаляли в блоці, включаючи ниркоподібну артерію разом з 5мм скупченням клітин навколо аорти і ниркоподібну вену з 3мм ділянкою порожнистої вени. Нирки зберігали в 0,9% NaCl при 4°C.

Донорську нирку трансплантували до черевної аорти і нижньої порожнистої вени тварини-реципієнта, нижче лівої ниркоподібної артерії, з допомогою анастомозів «кінець в кінець» монофіламентним нейлоновим швом, що не розсмоктується 8-0. Анастомоз сечоводу здійснювали «кінець в кінець» з монофіламентним нейлоновим швом, що не розсмоктується 11-0. Загальний ішемічний час донорської нирки складав від 30 до 40 хвилин. Гіпонєфроз оцінювали як макроскопічне під час загибелі, так і за допомогою світлової мікроскопії. Всі тварини з гіпонєфрозом виключалися з дослідних груп. Ліву нирку реципієнта завжди видаляли під час трансплантації. При трансплантації від тварини лінії Fisher реципієнту лінії Lewis права нирка знаходилася на пластині зліва для того, щоб мати внутрішній коім роль ефектів Met-RANTES. При трансплантації від Brown Norway до Lewis у час трансплантації проводили двосторонню нефректомію.

Дослідні групи

Дослідні групи були наступні.

Група 1: нирка від Fisher 344 пацюку Lewis з однією ендогенною ниркою.

Група 1a: з Met-RANTES, 200 мкг/день протягом 7 днів (n=9).

Група 1b: без Met-RANTES протягом 7 днів (n=9).

Група 2: нирка від Brown Norway пацюку Lewis при двосторонній нефректомії і введенні 2,5 мг/кг вапгтіла на день циклоспорину А.

Група 2a: з Met-RANTES, 50 мкг/день протягом 12 днів (n=4).

Група 2b: без Met-RANTES протягом 12 днів (n=4).

Циклоспорин А (CyA) (люб'язно наданий Sandoz, Basel, Switzerland) розчиняли в оливковій олії і вводили підшкірно при концентрації 2,5 мг/кг ваги тіла щодня протягом 12 днів, починаючи через 4 години після трансплантації. Met-RANTES розчиняли у воді і доводили до 0,9% хлоридом натрію і вводили шляхом внутрішньовенної ін'єкції щодня в дозі 200мкг/день в досліді по трансплантації від Fisher до Lewis і в дозі 50мкг/день в досліді по трансплантації від Brown Norway до Lewis.

Аналіз сироватки

Кров, взяту з аорти під час умертвіння, аналізували на вміст креатинину, сечовини, глюкози і білірубину, використовуючи автоматичний аналізатор сироватки. Це не забезпечувало інформацію про функцію нирки для моделі Fisher-Lewis, оскільки у тварин, що зазнали трансплантації була одна ендогенна нирка, але ці вимірювання були доречні у разі трансплантації на моделі Brown Norway-Lewis.

Гістологія

Органи (легені, печінку, нирку і селезінку) видаляли під глибоким наркозом. Органи швидко промокали від крові, зважували і потім піддавали обробці, необхідній для гістології, імуногістохімії або гібридизації *in situ*. З органів готували зрізи в 1мм і або фіксували зануренням в 4% формальдегіді в забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS), pH 7.35 (PBS: 99мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 108мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ і 248мМ NaCl) протягом 24 годин, або фіксували в метакамі протягом 8 годин і заливали парафіном, або заморожували в рідкому азоті і в подальшому зберігали при -80°C до використання в імуногістохімічному аналізі. Світлову мікроскопію проводили на зрізах 3мм за допомогою суміші періодна кислота - реагент Шиффа або реагенту Голднер-Еластіка.

Імуногістохімія

Моноклональне антитіло ED1 (фірми Serotech/Camom, Wiesbaden, Germany) використали на фіксованій метакамом і залитій парафіном тканині (3мм) для того, щоб продемонструвати наявність моноцитів/макрофагів. Для виявлення антигену CD8, експресованого на цитотоксичних Т-лімфоцитах, мишачі моноклональні антитіла наносили на заморожені зрізи після фіксації охолодженням льодом оцетом протягом 5 хвилин (фірма Serotech/Camom, Wiesbaden, Germany). Використали систему виявлення лужна фосфатаза - антилужна фосфатаза (фірми Dako, Hamburg, Germany). Контролі, що виключають перше або друге антитіло для кожного зрізу, були негативними.

Морфометрія

Оцінка васкулярного пошкодження в балах: прегломерулярні судини з пошкодженням ендотелієм, тромбом і ендотеліалітом були оцінені як такі, що не мають ніякого пошкодження (0), що мають слабу (1), помірну (2) і важку (3) міру пошкодження, і визначалися у всьому ниркоподібному зрізі, включаючи корковий шар, зовнішній і внутрішній мозковий шар. Міру специфічного показника васкулярного пошкодження визначали як процент судин з відповідною мірою пошкодження, що зустрічається у всьому ниркоподібному зрізі. Оцінку загального васкулярного пошкодження в балах розраховували як суму всіх судин з всіма мірами васкулярного пошкодження, при тому, що число судин з показником 1 множили на одиницю, з показником 2 - на коефіцієнт два і з показником 3 - на коефіцієнт три (Stojanovic T. et al., 1996). Оцінка тубулярного запалення в балах: тубулярне пошкодження розцінювали як відсутнє (0), слабе (1), помірне (2) і важке (3) за оцінкою в 20 полях високого дозволу (HPF) коркового шару і поперечної смужки зовнішнього мозкового шару. Загальне тубулярне пошкодження в балах розраховували, як описано, для оцінки загального васкулярного пошкодження. Оцінка інтерстиціального запалення в балах: поширеність інтерстиціальної інфільтрації з допомогою моноядерних клітин оцінювали як відсутню (0), слабу (1), помірну (2) і важку (3), і загальне пошкодження в балах розраховували, як описано для оцінки загального васкулярного пошкодження. Кількість моноцитів/макрофагів і Т-клітин всередині капілярних сплетень клубочків розраховували як середнє значення від відповідних кількостей у всіх клубочках в одному ниркоподібному зрізі.

Гібридизація *in situ*

Одноланцюгові РНК-зонди отримували шляхом транскрипції *in vitro* клону кДНК щурячого RANTES (Dr. H. Sprenger, Marburg, Germany), Транскрипцію *in vitro* проводили з використанням набору Транс-зонд-Т (Pharmacia, Freiburg, Germany) і міченою дигоксигеніном трифосфату уридину (Boehringer, Mannheim, Germany). Вектор (pBluoscript KS (+), Stratagene, Heidelberg, Germany) розрізали рестриктазою BamHI і транскрибували з РНК-полімеразою Т3, отримуючи антисмисловий зонд; для того, щоб отримати смисловий зонд, плазмиду розрізали рестриктазою EcoRI з подальшою транскрипцією з РНК-полімеразою Т7. Після видалення парафіну ниркоподібні зрізи розщеплювали 20мкг/мл протеїназою К (Boehringer) в буфері PBS протягом 16 хвилин. Зрізи повторно фіксували в 4% формальдегіді протягом 5 хвилин і ацетилювали (0,25% оцтовий ангідрид в 0,1М триетаноламіні, 10 хвилин). Для гібридизації *in situ* з міченої дигоксигеніном мРНК використали наступний гібридизаційний буфер: 5х стандартний розчин хлориду і цитрату натрію (SSC), 50% формамід, 50мкг/мл тРНК, 50мкг/мл гепарину і 0,1% додецилсульфат натрію.

Після гібридизації при 56°C протягом 16 год. зрізи промивали однократно буфером 4xSSC і 2xSSC

протягом 10 хвилин при 37°C з подальшим промиванням в 0,55xSSC протягом 30 хвилин і 0,1 SSC при 22°C протягом 15 хвилин. Інкубацію антидигоксигенінового антитіла і реакцію з лужною фосфатазою проводили відповідно до керівництва виробника (Boehringer, Mannheim, Germany), використовуючи п-нітротетразолій синій і 5-бром-4-хлор-3-індолілфосфат як забарвлюючі реагенти (Stojanovic T. et al, 1996, Simon M. et al., 1995).

Аналіз на захист від РНКаз

Загальну РНК виділяли з всієї нирки пацюка, як описано раніше (Simon M. et al., 1995). Досліди по захисту від РНКаз проводили з використанням комерційного набору: RP/V (PharMingen, San Diego, California, зонд rCK-1). Цей набір дозволяє одночасно вимірювачі! к зразках мРНК пацюка: IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 і TNF- γ і конститутивні гени GAPDH і L32. Для кожного визначення використали 20 мкг загальної РНК. Захищені зразки проганяли на преформованому гелі (систему швидкого розділення нуклеїнових кислот Quickpoint™ використали відповідно до рекомендацій виробника, фірми Novex, San Diego, California). Інтенсивність специфічних смуг оцінювали кількісно, використовуючи прилад Molecular Dynamics Storm 840 Phosphorimager, стандартизований до експресії гена L32, і усереднювали по трьох аналізованих тваринах.

Аналіз скріплення in vitro

Клітини DMVEC вирощування до злиття на 96-лункових плоскодонних планшетах з покриттям. Ендотеліальний моношар, що утворюється або залишали необробленим, або обробляли різними концентраціями IL-1 β (від 0,1 до 5нг/мл) протягом 12 годин. Аналіз скріплення RANTES був модифікацією описаної раніше методики (Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J. et al., 1993). Кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP) моноклональне антитіло проти людського RANTES (VL1, 0,1мкг) преінкубували при 25°C протягом 30 хвилин з надлишком рекомбінантного людського RANTES (20мкг/мл) в ростовому середовищі DMVEC (без добавок). Додавали комплекс хеомкін-антитіло, потім аналізували відносну хеомкін-зв'язуючу здатність мікровакулярного ендотелію. Ендотеліальний моношар обережно промивали їх ростовим середовищем без добавок (25°C), додавали комплекс хеомкін-антитіло і інкубували при 25°C протягом 30 хвилин. Потім лунки промивали чотири рази середовищем без сироватки при 25 °C. Реакцію з пероксидазою хрому проводили протягом 5 хвилин або менше. Оптичну щільність в планшеті при 406nm визначали з використанням зчитувального пристрою для ELISA. Результати демонструють зміни в зв'язуючій здатності запаленого мікровакулярного ендотелію по відношенню до білка RANTES після активації ендотеліальних клітин. Всі експерименти проводилися чотири рази по чотири, і результати, що демонструються представляють репрезентативну вибірку від трьох окремих дослідів.

Аналіз клітинного сортиру, що активується флуоресценцією (FACS)

Проточний цитометричний аналіз дермальних мікровакулярних клітин (DMVEC) проводили, в основному, як описано (Weber C. et al., 1995). Коротко: клітини, що злилися DMVEC, стимульовані IL-1 β (5нг/мл) або залишені необробленими протягом 12 годин, трипсинізували, вводили в реакцію з інтерлейкін-насичуваними концентраціями моноклопального антитіла (mAb) RR1/1 (люб'язно наданого Dr. R. Rothlein) до антигену ICAM-1, моноклопального антитіла до Е-селектину і моноклопального антитіла до антигену VCAM-1 (обидва антитіла від Serotec), або проводили ізотипічний контроль протягом 30 хвилин на льоду, забарвленому за допомогою кон'югованого з флуоресцеїнізоціанатом (FITC) козячим антимишачим IgG (Boehringer Mannheim) і аналізували FACScan (Becton Dickinson). Після поправки на неспецифічне скріплення дані виражали у вигляді специфічної середньої логарифмічної інтенсивності флуоресценції (SMFI) в каналах.

Модельна система рекрутингу моноцитів на мікровакулярному ендотелі in vitro при фізіологічних умовах струму

Взаємодію моноцитів з клітинами DMVEC вивчали в тестах ламінарного потоку, чийованих в основному, як описано (Weber C. et al., 1997, Kukerti S et al., 1997, Piali L et al., 1998). Коротко: клітини DMVEC вирощували до злиття в чашках Петрі діаметром 35мм, стимулювали IL-1 β (5нг/мл) або залишали необробленими протягом 12 годин. Чашки компонували у вигляді нижньої стінки в проточній камері з паралельними стінками і монтували гістологічні зрізи на столику інвертованого мікроскопа Olympus IMT-2 з 20x і 40x об'єктивами фазового контрасту. Монотики (клітини MonoMac 6) культивували, як повідомлено (Ziegler-Heitbrock H.W.L. et al., 1988, Weber C. et al, 1993) і знову суспендували при 10⁶/мл в аналітичному буфері (HBSS), що містить 10мМ Hepes, pH 7,4 і 0,5% HSA. Незадовго до аналізу додавали 1мМ Mg²⁺ і 1мМ Ca²⁺. У ході аналізу клітинні суспензії витримували в нагрівальному блоці при 37°C і перфузували в проточну камеру при швидкості 1,5дин/см² протягом 5 хвилин. У дослідях по інгібуванню моноцити заздалегідь інкубували з Met-RANTES при різних концентраціях (0,01-1мкг/мл) протягом 30 хвилин на льоду. Кількість міцно прикріплених клітин після п'ятого потоку визначали кількісно в множинних полях (щонайменше, п'ять на експеримент) за допомогою відеоаналізу, записаного відеокамерою тривалого накопичення JVC 3CCD і за допомогою відеоманітофона JVC SR L 900E, і виражали в клітинах/мм². Тип адгезії, що аналізується був обмежений первинними, тобто прямими взаємодіями моноцитів з ендотелієм. Як взаємо-зворотного вимірювання стійкої затримки, кількість клітин, що рухаються при зниженій швидкості по ендотелію, визначали протягом останніх 30 секунд п'ятихвилинних інтервалів і оцінювали в процентах від всіх взаємодій в даному полі. Кількість клітин, що розповсюджуються або трансмігруючих визначали з п'ятихвилинними інтервалами в полях високого розрізнення, як описано (Luscinskas F.W. et al., 1994) і виражали в процентах під міцно прикріплених клітин.

Статистичний аналіз

Значення \pm SEM представляли ms roman. Статистичний аналіз проводили, використовуючи критерій суми рангів Манна-Уїтні У-Уїлкоксона. Значення p<0.05 розглядається як значна відмінність між двома

групами.

Результати

Алотрансплантація нирок Fisher 344 (F344 RT1^M) в Lewis (LEW, RT1¹)

Трансплантація нирок пацюків лінії Fisher (344) пацюкам лінії Lewis за відсутності імуносупресії проводила до появи характерного моноядерного клітинного інфільтрату і пошкодження тканини на сьомий день після операції. Гістологічне дослідження виявило місцевий моноядерний клітинний інфільтрат у внутрішній оболонці прегломерулярних артерій і тубулярної проміжної тканини. Основний компонент інтерстиціального моноядерного клітинного інфільтрату складався з клітин моноцитів/макрофагів. Міра пошкодження артерій, артеріол, клубочків і поширення моноядерного клітинного інфільтрату проміжної тканини оцінювали по шкалі, починаючи від відсутнього (0), слабого (1), помірного (2) до сильного (3), використовуючи описану раніше методику, засновану на напівкількісній морфометрії (див. Матеріали і методи).

Вплив Met-RANTES на цей процес досліджували шляхом обробки тварин з трансплантами щоденними внутрішньовенними ін'єкціями Met-RANTES в дозі 200мкг на тварину. Первинну ін'єкцію Met-RANTES проводили через 1 годину після утворення васкулярного анастомозу під час операції по трансплантації. У ході експерименту не давали ніякого додаткового імуносупресивного агента. Світлова мікроскопія і імуногістологія не виявили вираженого ефекту обробки Met-RANTES на ендогенну нирку.

У ході відторгнення органу трансплантата трансплантований орган звичайно збільшується у вазі через запалення. Результати, підсумовані в таблиці 1, показують, що у тварин, оброблених Met-RANTES, спостерігалася статистично значуще зниження ваги трансплантованого органу в порівнянні з необробленими тваринами. Ці результати передбачають також зменшення Т-клітинної і моноцитної інфільтрації клубочків, однак це зменшення не можна вважати статистично значущим (критерій суми рангів Манна-Уїтні У-Уїлкоксона). Найбільш виражені ефекти обробки Met-RANTES підсумовані в таблиці 2. Дані демонструють значне зменшення судинного пошкодження і показника тубулярного відторгнення у тварин, оброблених з Met-RANTES, в порівнянні з тим, що спостерігається у необроблених тварин. У той час, як загальна тенденція, що стосується оцінки інтерстиціального відторгнення, свідчить про явне зниження у оброблених Met-RANTES тварин, вона не може розглядатися як статистично значуща (критерій суми рангів Манна-Уїтні У-Уїлкоксона).

Для того, щоб оцінити вплив Met-RANTES на процес відторгнення, досліджували гістологічні зрізи і імуногістохімічне забарвлення. Нирки видаляли через сім днів після трансплантації і препарували, як описано в розділі Матеріали і методи.

У необроблених нирках спостерігали судинне пошкодження з наявністю моноядерних клітин в просвіті і стінці артерій. У протилежність цьому, у тварин, оброблених Met-RANTES, судинне відторгнення не виявлялося. В інтерстиціальній області у необроблених тварин спостерігалася інфільтрація великого числа темнозабарвлених моноядерних клітин всередині інтерстицію і каналців. Оброблені ж Met-RANTES тварини, навпаки, демонстрували знижену моноядерну інфільтрацію, менше пошкодження каналців при добре окресленою червоною щітковою смужкою проксимальних каналців.

Локалізація RANTES мРНК пацюка шляхом гібридизації in situ

Зрізи тканин, взяті від нирок, що відторгаються пацюків лінії Fisher, використали в дослідженнях по методу гібридизації in situ для того, щоб продемонструвати клітинну специфічну експресію RANTES мРНК в нирці, що відторгається. Результати були подібні там, які описані раніше для експресії RANTES при відторгненні людських алотрансплантатів нирки (Pattison J. et al., 1994, Wiedemann C.J. et al., 1993, Von Luetichau L., 1996). Була відмічена виражена експресія інфільтруючими моноядерними клітинами і ниркоподібними каналцями і обмежена, але експресія, що ідентифікується деякими ендотеліальними клітинами.

Оброблені Met-RANTES тварини демонструють зниження експресії мРНК про-запального цитокіну, як визначено аналізом на захист від РНКаз

Підвищена експресія про-запальних цитокінів, таких, як IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, TNF β , TNF α і IPN γ , є характерною для відторгнення ниркоподібного трансплантата (Nickerson P. et al., 1997, Schmodder R.L. et al., 1995, Strom T.B. et al., 1996, Castro M.D. et al., 1998). Експресія цих цитокінів є показником протікаючого запального процесу. Автори досліджували вплив Met-RANTES на експресію ряду цитокінів в трансплантованих нирках пацюків лінії Fisher, використовуючи кількісну пробу захисту від РНКаз. Зразки РНК цілком органу виділяли з нормальних контрольних нирок, необроблених трансплантованих нирок і трансплантованих нирок, оброблених Met-RANTES. Рівні мРНК, що представляють цитокіни: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 TNF β , TNF α і IPN γ , визначали відносно внутрішніх стандартів -L32 і GAPDH. Результати показують, що через сім днів після трансплантації в необроблених нирках посилювалася регуляція мРНК, що кодує IL-1 α (в 24 рази), TNF β (в 3,2 рази) і IPN γ (в 1,7 рази), з найбільш вираженим посиленням, відміченим у випадку IL-1 β (в 8,4 рази) і TNF α (в 4,6 рази). У цих нирках в той же самий час (7 днів після трансплантації) не відмічено експресії мРНК, що кодує IL-2, IL-4 або IL-5. Для відповідних тварин, оброблених Met-RANTES, показаний знижений середній рівень експресії IL-1 α (25%), IL-1 β (48%), TNF β (34%), TNF α (24%) і IPN γ (24%) в порівнянні з необробленими тваринами.

Трансплантація нирок пацюків лінії Brown Norway пацюкам лінії Lewis: ефект Met-RANTES в поєднанні з низькою дозою циклоспорину А (CyA)

Далі автори розширили експерименти для того, щоб визначити, міг би Met-RANTES служити доповненням до лікування відторгнення ниркоподібного трансплантата низькими дозами циклоспорину А. Для цієї процедури автори вибрали модель ниркоподібного трансплантата, яка могла б дати більш сильну

реакцію відторгнення, а саме, трансплантацію нирки пацюка лінії Brown Norway пацюку лінії Lewis. Двосторонню нефректомію проводили під час трансплантації. Заздалегідь було показано, що рівень циклоспорину А, що використовується 2,5мг/кг ваги тіла на день, введений підшкірно, не придушує значно відторгнення нирки на цій моделі (Grone, неопубліковані результати, Stojanovic T. et al., 1996). Нарешті, для того, щоб краще визначити будь-яку синергістичну дію, в цих експериментах використали знижену дозу Met-RANTES, 50 мкг/тварина/день. Результати, підсумовані в таблиці 3, показують статистичне значуще зменшення поразки судин і каналців, що спостерігається у тварин, оброблених Met-RANTES і низькою дозою циклоспорину А, в порівнянні з тваринами, які отримували тільки низьку дозу циклоспорину А. Крім того, спостерігалось значне зменшення моноядерного клітинного інфільтрату в інтерстиціальній області. Ці гістологічні спостереження були підтверджені функціональними вимірюваннями, в яких сироватковий креатинін був знижений у оброблених Met-RANTES тварин в порівнянні з необробленими контролями ($0,98 \pm 0,12$ до $1,42 \pm 0,17$ мг%, $n=3$).

Пряме скріплення RANTES і експресія адгезійної молекули на активованому мікровазкулярному ендотелії

Оскільки зниження інфільтрації моноцитів в просвіті судин є відомою особливістю обробки Met-RANTES на обох трансплантаційних моделях, автори збиралися вивчити потенційні механізми цього ефекту. На моделі ролі RANTES у відторгненні ниркоподібного трансплантата було зроблене припущення про те, що білок RANTES, що вивільняється активованими тромбоцитами або секретується місцеве запаленою тканиною, акумулюється на поверхні запаленого ендотелію, де він може підтримувати рекрутинг моноцитів (Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993). Для того, щоб вивчити пряме скріплення RANTES з мікровазкулярним ендотелієм, автори досліджували здатність активованого дермального мікровазкулярного ендотелію (DMVEC) секвеструвати білок RANTES і скористалися модифікацією методу аналізу, застосованого раніше для визначення скріплення RANTES з поверхнею ендотелію в тканинних зрізах (Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993). Моноклональне антитіло VL1, кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP), специфічне до RANTES, іосубували з надлишком білка RANTES і отриманий комплекс додавали до того, що покоїться або активованого за допомогою IL-1)) мікровазкулярного ендотелію, вирощеному у 96-лунковому плоскодонному культуральному планшеті. З використанням різновиду ELISA визначали здатність клітин DMVEC зв'язувати комплекс антиген-моноклональне антитіло (mAb) при зіставленні зі скріпленням тільки mAb. Незважаючи на те, що мікровазкулярний ендотелій міг би зв'язати деяку кількість білка RANTES без попередньої стимуляції, скріплення значно посилювалося після попередньої стимуляції з про-запальним цитокином IL-1 α (Fig.1). Фонове фарбування некон'югованого mAb на нестимульованому або активованому ендотелії було незначним.

Для подальшої характеристики запальної активації мікровазкулярного ендотелію визначали поверхневу експресію молекул, що беруть участь в адгезії моноцитів, тобто Е-селектину і членів суперсімейства імунोगлобулінів ICAM-1 і VCAM-1, на клітинах DMVEC, використовуючи раніше приведену методику проточної цитометрії (Weber C. et al., 1995). Аналіз показав, що клітини DMVEC, що знаходяться в стані спокою, експресують істотні поверхневі рівні білка ICAM-1, однак була виявлена невелика кількість VCAM-1 або Е-селектину (таблиця 4). Активація клітин DMVEC з IL-1 β протягом 12 годин привела до посилення регуляції експресії ICAM-1 і помітної індукції поверхневої експресії VCAM-1 і Е-селектину (таблиця 4).

Met-RANTES блокує стійку адгезію моноцитів до запаленого мікровазкулярного ендотелію, але не впливає на подальші події при діapedезі

У спробі зрозуміти потенційні механізми дії Met-RANTES автори вивчили, чи могла блокада рецепторів хемокіну RANTES інгібувати стійку затримку і діapedез моноцитів на мікровазкулярному ендотелії. З цією метою автори використали моноцитні клітини лінії MonoMac 6, які володіють адгезивними характеристиками і інтегративним спектром зрілих моноцитів і експресують деякі рецептори хемокінів, включаючи CCR1 (En W. et al., 1995). Клітини DMVEC вирощували на чашках Петрі і або залишали нестимульованими, або активували з IL-1 β (5нг/мл) протягом 12 годин. Потім мікровазкулярний ендотелій тестували в проточних камерах з паралельними стінками, де клітини MonoMac 6 перфузували крізь камеру при швидкості зсуву 1,5дин/см² протягом 5 хвилин. При таких фізіологічних умовах струму клітини MonoMac 6 зазнають коротких періодів безперервного переміщення, і тяжіння частини клітин може легко перетворитися в стійку до зсуву затримку. Через 5 хвилин накопичення визначали число клітин MonoMac 6, які зазнали стійкої адгезії до ендотелію (fig.2a).

Незначне число моноцитарних клітин, стійко прикріплених до нестимульованого мікровазкулярного ендотелію, і попередній вплив на ендотеліальні клітини білка RANTES не дали значного ефекту. Попередня стимуляція мікровазкулярного ендотелію з IL-1 β привела до підвищення стійкої до зсуву адгезії моноцитів. Інгібування з моноклональним антитілом (mAb) підтвердило висновки про те, що цей процес опосередковується моноцитними інтегінами $\alpha 4$ і $\beta 2$, які взаємодіють з білками ICAM-1 і VCAM-1, відповідно, експресованими на активованому ендотелії (Kukerti S. et al., 1997, Luscinskas F.W. et al., 1994). У відповідності до іmobілізації хемокіну RANTES в тпобах прямого скріплення попередній вплив білка RANTES на активований IL-1 β мікровазкулярний ендотелій помітно посилював стійку затримку і накопичення моноцитів протягом 5 хвилин (fig.2a). Особливо примітно, що попередня інкубація моноцитів Met-RANTES при різних концентраціях (0,01-1мкг/мл) повністю блокувала опосередковану RANTES стійку до зсуву адгезію моноцитів на активованих IL-1 β клітинах DMVEC (fig.2a і неопубліковані дані); паралельно фракція моноцитів, що безперервно пересувається по активованому мікровазкулярному ендотелію, який може використовуватися як зворотна міра стійкої затримки клітин, поменшав після попереднього впливу хемокіну RANTES, але була відновлена з допомогою Met-RANTES, свідчаючи про те, що число початкових

взаємодій з активованим ендотелієм залишилося незмінним. Після стійкої затримки фракція моноцитів зазнала зміни конфігурації або розпластання, і деякі з них в кінцевому результаті мігрували в, між або під ендотеліальні клітини. Однак RANTES або Met-RANTES не змінювали розпластання або трансміграцію (фіг.2б), що передбачають включення інших сигналів. Таким чином, ці результати вказують на те, що Met-RANTES може знижувати рекрутинг моноцитів при відторгненні трансплантата нирки, блокуючи затримку моноцитів в запаленому мікровазкулярному ендотелії.

ТАБЛИЦІ

Таблиця 1

Нирки пацюків лінії Fisher, трансплантовані пацюкам лінії Lewis.
Кількість моноцитів/макрофагів і Т-клітин в сплетеннях капілярів клубочків розраховували як середнє значення відповідних кількостей у всіх клубочках в одному зрізі нирки.

	Контроль (n=9)	Met-RANTES (n=9)
Вага тіла (г)	211,8±5,15	195±5,98
Вага трансплантата нирки	1,41±0,048	1,15±0,08*
Вага ендогенної нирки	0,91±0,04	0,8±0,04
Т-клітини в клубочках	3,98±0,81	2,75±0,45
Макрофаги в клубочках	9,16±1,69	5,98±0,87

* Вказує значущу (p<0,05) відмінність між випробуваними групами.

Таблиця 2

Нирки пацюків лінії Fisher, трансплантовані пацюкам лінії Lewis.
Короткий виклад результатів гістологічного і імуногістологічного аналізу впливу Met-RANTES на пошкодження судин і інтерстиціальний моноядерний інфільтрат

	Судинне пошкодження		Пошкодження каналців		Інтерстиціальне запалення	
	Контроль	Met-RANTES	Контроль	Met-RANTES	Контроль	Met-RANTES
Стадія 0	50,67±9,02	85,5±2,66	15,56±6и/03	46,00±12,15	1,39±1,11	16,00±7,14
Стадія 1	40,44±5,5	12,8±4,17	32,22±8,25	30,00±6,06	44,17±12,39	58,00±8,7
Стадія 2	4,44±2,22	0,9±0,6	20,56±5,68	13,00±4,1	18,33±5,95	9,50±4,62
Стадія 3	5,55±5,55	0±0,0	31,67±14,19	8,50±7,46	36,11±14,88	10,50±9,44
Показник	62,67±18,64	16,1±5,2*	33,00±6,44	15,70±5,22	37,78±5,58	24,45±4,62

* Вказує на значущу (p<0,05) відмінність між випробуваними групами

Таблиця 3

Нирки пацюків лінії Brown-Norway, трансплантовані пацюкам лінії Lewis.
Короткий виклад результатів гістологічного аналізу впливу Met-RANTES на пошкодження судин і каналців і інтерстиціальний моно ядерний інфільтрат в присутності низької дози циклоспорину А.

Оцінка	Циклоспорин, 2,5мг/кг ваги тіла / день	Циклоспорин, 2,5 мг/кг ваги тіла/день + Met-RANTES, 50 мкг/день
Пошкодження судин	60,7±1,8	13,7±7,5*
Пошкодження каналців	124,3±28,7	28,3±14,8*
Інтерстиціальне запалення	157,3±21,3	71±6,1*

*Вказує на значущу (p<0,05) відмінність між випробуваними групами

Таблиця 4

Вплив IL-1β на поверхневу експресію молекул адгезії в людських мікровазкулярних ендотеліальних клітинах. Клітини DMVEC активували IL-1β (5нг/мл) або залишали необробленими (контроль) протягом 12 годин і вводили в реакцію з білками ICAM-1, VCAM-1, Е-селектином або ізотипічними контрольними моноклональними антитілами. Поверхневу експресію білка аналізували з допомогою FACS в трьох незалежних експериментах і після корекції на неспецифічне скріплення в каналах представляли у вигляді середнього значення специфічної інтенсивності флуоресценції (SMFI).

SMFI (канали)		Контроль	IL-1P
ICAM-1	Експеримент 1	339	502

	Эксперимент 2	386	592
	Эксперимент 3	327	432
	Эксперимент 1	10	76
VCAM-2	Эксперимент 2	72	236
	Эксперимент 3	25	129
	Эксперимент 1	1	120
Е-селектин	Эксперимент 2	44	265
	Эксперимент 3	28	177
	Эксперимент 1		

ПОСИЛАННЯ

- Bishop G.A. et al. *Kidney Int.*, 29, 708-717, 1986.
Butcher B.C., *Cell*, 67, 1033-1036, 1991.
Butcher E.G. et al., *Science*, 272, 60-66, 1996.
Castro M.D. et al., *Transpl. Int.*, 11, 1, S15-S18, 1998.
Devergne O. et al., *J. Exp. Med.*, 179, 1689-1694, 1994.
Erl W. et al., *Atherosclerosis*, 113, 99-107, 1995.
Fisher B. et al., *Surgery*, 58, 904-917, 1965.
Gong J.H. et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 10521-10527, 1996.
Gr6ne H.J., *Neph. Dial. Transplant*, 11, 1916-1917, 1996.
Kukerti S. et al., *Blood*, 89, 4104-4111, 1997.
Lloyd C.M. et al., *J. Exp. Med.*, 185, 1371-1380, 1997. ' Lloyd C.M. et al., *J. Leukoc. Biol.*, 62, 676-680, 1997.
Luckas N.W. et al., *J. Leukoc. Biol.*, 59, 13-17, 1996.
Luscinskas F.W. et al., *J. Immunol.*, 156, 326-335, 1994.
Luster A.D., *N. Engl. J. Med.*, 338, 436-445, 1998.
Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, 31st edition, London, Royal Pharmaceutical Industry, 1996, 557-562.
Nelson P. J. et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 265-270, 1998.
Nelson P.J. et al., *The Chemokine RANTES*. In *Cytokines, Handbook of Immunopharmacology Series*. R. Thorpe and A. Mire-Sluis, editors. Academic Press. London. 433-448, 1998.
Nibbs R.J. et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 32078-32083, 1997.
Nickerson P. et al., *Transplantation*, 27, 489-494, 1997.
Pattison J. et al., *Lancet*, 343, 209-211, 1994.
Piali L. et al., *Eur. J. Immunol.*, 28, 961-972, 1998.
Plater-Zyberk C. et al., *Immunol. Lett.*, 57, 117-120, 1997.
Proudfoof A.E. et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 2599-2603, 1996.
Schlondorff D. et al., *Kidney Int.*, 51, 610-621, 1997.
Schmouder R.L. et al., *Nephrol. Dial. Transplant*, 10 Suppl 1, 36-43, 1995.
Simmons G. et al., *Science*, 276, 276-279, 1997.
Simon M. Et al., *Am. J. Physiol.*, 268, F240-F250, 1995.
Springer T.A., *Cell*, 76, 301-314, 1994.
Stojanovic T. Et al., *Lab. Invest*, 74, 496-512, 1996.
Strom T.B. et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 8, 688-693, 1996.
Teixeira M.M et al., *J. Clin. Invest*, 100, 1657-1666, 1997.
Valente J.F, et al., *Surg. Clin. North. Am.*, 78, 1-26, 1998.
Von Luetichau I. et al., *Cytokine*, 8, 89-98, 1996.
Weber C. et al., *Eur. J. Immunol.*, 23, 852-859, 1993.
Weber C. et al., *J. Immunol.*, 155, 445-451, 1995.
Weber C. et al., *J. Clin. Invest*, 100, 2085-2093, 1997.
Wiedemann C.J. et al., *Curr. Biol.*, 3, 735-739, 1993.
Ziegler-Heitbrock H.W.L. et al., *Internal. J. Cancer*, 41, 456-461, 1988.