

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Новокузнецкий научно-исследовательский
химико-фармацевтический институт

ВИЛИМ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новосибирск
2008

*О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, Е.В. Гойман, А.П. Лыков,
Т.В. Долгих, К.В. Гайдунь, *А.Н. Мирскова, *Г.Г. Левковская,
М.Г. Воронков, В.А. Козлов
НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
*Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОДЕПРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ ВМ-7-02 У ИНТАКТНЫХ МЫШЕЙ И В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИММУНОКОМПЛЕКСНОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

Актуальной проблемой иммунофармакологии является создание препаратов с селективной способностью изменять баланс Th1/Th2 клеток. Как видно из представленных ранее результатов, достаточно трудно при скрининге *in vivo* на интактных животных выделить соединения с разнонаправленным влиянием на интегральные показатели – антителообразование и ГЗТ, оказывающих влияние либо только на гуморальный, либо только на клеточный иммунный ответ. Очевидно, что поиск таких соединений требует использования новых экспериментальных моделей. Для выполнения требований валидности (воспроизводимости), селективности и прогнозируемости необходима также определенная система скрининга, включающая несколько экспериментальных моделей.

Целью настоящего исследования является апробация экспериментальных подходов для поиска иммунодепрессантов с селективными свойствами

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использовали здоровых половозрелых животных – мышей линии СВА, DBA/2 и мышей гибридов (СВАхС57BL/6)F1 (СВF1), (С57BL/6хDBA/2)F1 (В6D2F1) обоего пола, 8-10-недельного возраста, массой тела 18-20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышает $\pm 10\%$. Контрольные и опытные животные одного возраста и получены одновременно из одного питомника (“Рассвет”, г. Томск). До и в период эксперимента контрольные и опытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводились в одно и то же время суток (утром). Опыты

проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986), и одобренных комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Модель иммунокомплексного гломерулонефрита - люпус-подобного иммунокомплексного гломерулонефрита у мышей осуществлялась путём переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Вводили клетки лимфатических узлов, тимуса и селезёнки в соотношении 1:3:6 (соответственно по 5×10^6 клеток лимфатических узлов, 15×10^6 клеток тимуса, 30×10^6 клеток селезёнки), выделенных *ex tempore*, в стерильной среде RPMI-1640. Каждая мышь-реципиент получала по 50×10^6 клеток путём внутривенной инъекции в хвостовую вену в объёме 0,5 мл среды двукратно с интервалом в пять дней. Для контроля использовались интактные животные того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте. При этом у мышей-реципиентов к 3-му месяцу развивается люпус-подобное поражение почек аутоиммунного генеза.

Поражение почек тестировали по уровню белка в моче. Содержание белка в моче определяли калориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie) с помощью Titertec Multiskan, длина волны λ 570 nm. Реактив готовили следующим образом: 10 мг Кумасси растворяли в 5 мл C_2H_5OH . После полного растворения красителя добавляли 11,2 мл 70% H_3PO_4 . Общий объём довели до 100 мл, фильтровали. К 5 мкл мочи, разведённой в 5 раз в ЗФР, добавляли 150 мкл красителя Кумасси. Калибровочную кривую строили по BSA (100-1000 мкг/мл).

Определение количества IgM антителообразующих клеток *in vivo*

Соединение в различных дозах в объёме 0,5 мл вводили внутрибрюшинно один раз в сутки ежедневно в течение 5-7 дней. Контрольным животным в таком же объёме и режиме вводили растворитель соединений (среду). В день последнего введения соединения (или одновременно с введением ЭБ) животных иммунизировали внутривенно эритроцитами барана (ЭБ) в дозе 10^7 /мышь. Количество IgM АОК в селезенке мышей оценивали на 4-е сутки после иммунизации по количеству зон локального гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом. Результаты выражали в абсолютном количестве IgM АОК в селезенке.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа *in vivo*

Соединение в разных дозах в объёме 0,5 мл вводили внутрибрюшинно один раз в сутки ежедневно в течение 5 дней. Контрольным животным в таком же объёме и режиме вводили растворитель соединений (среду). В

день последнего введения соединения мышей сенсibilизировали внутрибрюшинным введением 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл, на 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена под подошвенный апоневроз правой задней лапы (50% ЭБ в объеме 50 мкл). В контрлатеральную лапу вводили растворитель в том же объеме. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединений (среду). Реакцию ГЗТ оценивали по методике локальной ГЗТ. Учет реакции производили через 24 часа после введения разрешающей дозы ЭБ, величину отека оценивали штангенциркулем. Результаты выражали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунодепрессивные свойства соединения ВМ-7-02 *in vivo*

Изучение иммуносупрессорных свойств соединения ВМ-7-02 *in vivo* проводили на экспериментальной модели иммунокомплексного гломерулонефрита – модели аутоиммунного заболевания, при котором воспалительный процесс в почках имеет иммунологический механизм.

Изучение иммунодепрессивных свойств соединения ВМ-7-02 на модели аутоиммунного заболевания

Модель иммунокомплексного гломерулонефрита вызывали у самок В6D2F1 двукратным с недельным интервалом внутривенным введением лимфоидных клеток от самок родительской линии DBA/2. Содержание белка в моче определяли калориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie) на Titertec Multiscan, длина волны λ 570 nm. В опытах использовали мышей со стойкой протеинурией и содержанием белка 3 мг/мл и более (белок в моче определялся неоднократно).

Проведено 3 серии опытов. В I серии у мышей со стабильной протеинурией на протяжении 2-х месяцев и содержанием белка в моче от 3,0 до 6,5 мг/мл проведено курсовое введение соединения ВМ-7-02. Курс составил 5 ежедневных внутрибрюшинных инъекций в дозе 300 мг/кг (6 мг/мышь). Через 5 дней после последнего введения соединения была измерена протеинурия. Установлено, что в 83% случаев (у 5 мышей из 6 мышей, использованных в опыте) наблюдается снижение протеинурии на 10; 18,5; 30,8; 45,2 и 55,6%, у одной мыши эффекта практически нет. В среднем по группе до лечения протеинурия составила 5,1 мг/мл, после лечения – 3,6 мг/мл, что достоверно ниже ($P < 0,05$), снижение по группе в среднем составило 32,0%.

Во II серии опытов соединение в дозе 5 мг/кг (100 мкг/мышь) вводили *per os*, курс составил 10 введений. Аналогичным образом вводили пре-

парат сравнения азатиоприн в дозе 5 мг/кг. Измерение протеинурии проводили через сутки после последнего введения препаратов. В таблице 1 представлены данные II серии опытов.

Таблица 1

Влияние соединения ВМ-7-02 в дозе 5 мг/кг на уровень белка в моче у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом в сравнении с азатиоприном

Азатиоприн			Соединение ВМ-7-02		
Белок в моче до лечения (мг/мл)	Белок в моче после лечения (мг/мл)	% ингибиции	Белок в моче до лечения (мг/мл)	Белок в моче после лечения (мг/мл)	% ингибиции
5,9	5,2	-12	11,2	4,8	-58
9,5	13,6	+43	8,9	6,4	-28
6,5	6,6	+1,5	5,9	8,1	+37
14,6	5,2	-64	6,5	5,6	-14
7,6	10,1	+33	8,1	3,0	-63

Как видно из данных таблицы 1, под влиянием азатиоприна в 40% случаев наблюдается снижение белка в моче (в среднем на 38%), соединение вызывает снижение протеинурии в 80% случаев, снижение протеинурии в среднем под действием соединения составляет 41%.

В III серии опытов соединение в дозе 10 мг/кг (200 мкг/мышь) вводили per os, курс составил 10 введений. Аналогичным образом вводили препарат сравнения азатиоприн в дозе 5 мг/кг. Измерение протеинурии проводили через сутки после последнего введения препаратов. В таблице 2 представлены данные III серии опытов.

Таблица 2

Влияние соединения ВМ-7-02 в дозе 10 мг/кг на уровень белка в моче у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом в сравнении с азатиоприном

Азатиоприн			Соединение ВМ-7-02		
Белок в моче до лечения (мг/мл)	Белок в моче после лечения (мг/мл)	% ингибиции	Белок в моче до лечения (мг/мл)	Белок в моче после лечения (мг/мл)	% ингибиции
2,7	0,7	-84	3,0	1,8	-60
1,9	5,6	+ в 2,9 раза	4,0	5,0	+25
3,9	1,8	-54	2,4	1,9	-21
4,6	3,5	-24	3,9	2,7	-31
4,1	2,1	-49	2,3	1,0	-57
3,9	1,5	-62			

Как видно из данных таблицы 2, в 83% случаев под влиянием азатиоприна снижается протеинурия (у 5 мышей из 6), в среднем снижение составило 55%. Под влиянием соединения ВМ-7-02 в 80% случаев наблюдается снижение протеинурии (у 4 мышей из 5), в среднем снижение составило 42%.

Анализируя полученные данные можно заключить, что соединение вне зависимости от дозы и способа введения в 80% случаев (общее количество мышей с гломерулонефритом – 16) приводит к снижению белка в моче. Использование соединения в меньших дозах (5 и 10 мг/кг) более эффективно, чем в большой дозе (300 мг/кг). Дозы 5 и 10 мг/кг снижают протеинурию на 41 и 42% соответственно, тогда как доза 300 мг/кг – на 32%. В целом, по эффективности соединение ВМ-7-02 не уступает широко используемому в клинической практике иммунодепрессанту азатиоприну. При сравнении соединения ВМ-7-02 и азатиоприна по токсичности можно отметить, что соединение вызывает иммунодепрессивный эффект в дозе на порядок ниже относительно LD_{50} , чем азатиоприн. Как известно, азатиоприн в дозе 10 мг/кг угнетает функцию костного мозга, подавляет пролиферацию гранулоцитов, вызывает лейкопению.

Иммунологическим субстратом, запускающим каскад нарушений в почках, является Т-зависимая поликлональная активация В-клеток, сопровождающаяся увеличением синтеза анти-ДНК антител, формированием иммунных комплексов, что приводит к системному иммунокомплексному воспалительному процессу в почках – нефриту и протеинурии. Такой тип повреждения почек сравним морфологически и функционально с тяжелым заболеванием человека – системной красной волчанкой. Подтверждением иммуносупрессорного эффекта соединения, т.е. его способности подавлять Т-зависимую активацию В-клеток являются данные, изложенные далее.

Изучение иммунодепрессивных свойств соединения ВМ-7-02 у интактных мышей

По данным скринингового исследования иммуотропной и противоопухолевой активности производных алканкарбоновых кислот соединение ВМ-7-02 было выделено как потенциально иммунодепрессивное соединение по следующим позициям: выраженные миелодепрессивные свойства при использовании в максимально переносимой дозе ($1/5$ от LD_{50}), подавление ГЗТ в дозе $1/50$ и $1/5$ от LD_{50} , резкое подавление *in vitro* пролиферации клеток селезенки интактных мышей, стимулированной Т-клеточным митогеном конканавалином А во всех использованных дозах, а также подавление спонтанной и стимулированной митогеном лаконоса пролиферации

клеток селезенки интактных мышей. При этом эффект соединения, вводимого до введения антигена, на гуморальный иммунный ответ – первичный IgM и вторичный IgG зависел от дозы – наблюдалось как подавление, так и стимуляция того и другого вида ответа. В настоящей работе исследовали иммуносупрессивные свойства соединения в отношении гуморального и клеточного типов иммунитета при использовании других доз и схем его применения.

Первичный IgM ответ

Для подтверждения данных о способности соединения подавлять Т-зависимую активацию В-клеток, полученных на модели иммунокомплексного гломерулонефрита, использовали модель первичного гуморального иммунного ответа. Известно, что иммунизация интактных мышей Т-зависимым антигеном – эритроцитами барана приводит также к активации *in vivo* В-клеток и последующему синтезу антител в селезенке.

В соответствии с рекомендациями Фармакологического комитета МЗ РФ по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ изучено влияние соединения ВМ-7-02 в дозах 1, 5, 10 мг/кг (соответственно $1/1500$, $1/300$, $1/150$ от LD₅₀) на индуктивную/продуктивную фазы IgM ответа. Соединение в разных дозах вводили одновременно с антигеном и далее в течение 3-х суток ежедневно. Для иммунизации животных использовали ЭБ в дозе 10×10^6 . Соединение вводили внутрибрюшинно и внутрижелудочно. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединения (среда RPMI). Количество IgM АОК в селезенке мышей оценивали на 4-е сутки после иммунизации по количеству зон локального гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом Cunningham (1968). Результаты выражали в абсолютном количестве IgM АОК в селезенке.

Таблица 3

Влияние соединения ВМ-7-02 на первичный гуморальный иммунный ответ

Г р у п п ы	Число IgM АОК / с е л е з е н к у	
	внутрижелудочно	внутрибрюшинно
Контроль	6024	9620
Соединение в дозе:		
1 мг/кг	6761	5843
5 мг/кг	2925*	5508
10 мг/кг	2112*	3111*

* – достоверно относительно контроля.

татам влияния на сенсibilизацию оценивается возможность образования антигенспецифических Т-лимфоцитов, результаты разрешающей фазы оценивают интенсивность воспалительной реакции, связанной с выделением провоспалительных цитокинов.

Соединение ВМ-7-02 в дозах 1, 5, 10 мг/кг (соответственно $1/1500$, $1/300$, $1/150$ от LD₅₀) вводили одновременно с сенсibilизирующей дозой антигена (0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл внутривбрюшинно) и далее в течение 4-х суток ежедневно (в день введения разрешающей дозы антигена). Соединение вводили внутривбрюшинно. На 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена под подошвенный апоневроз правой задней лапы (50% ЭБ в объеме 50 мкл). В контрлатеральную лапу вводили растворитель (RPMI) в том же объеме. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединений. Реакцию ГЗТ оценивали по методике локальной ГЗТ (Crowle, 1975). Учет реакции производили через 24 часа после введения разрешающей дозы ЭБ, величину отека оценивали штангенциркулем. Результаты выражали в абсолютных значениях.

Таблица 5

Влияние соединения ВМ-7-02 на клеточный иммунный ответ

Г р у п п ы	Выраженность ГЗТ (мм)
Контроль	0,47
Соединение в дозе:	
1 мг/кг	0,46
5 мг/кг	0,45
10 мг/кг	0,44

Как видно из данных таблицы 5, соединение ВМ-7-02 практически не оказывает влияния на выраженность клеточного иммунитета *in vivo*.

Отсутствие иммунодепрессивного эффекта соединения ВМ-7-02 на IgG ответ и ГЗТ в тех же дозах, которые подавляют IgM ответ, по-видимому, в первую очередь обусловлено тем, что для селективного иммунодепрессанта, к которым может быть отнесено соединение ВМ-7-02, эти методы оценки не вполне адекватны.

Реакция трансплантат против хозяина

Реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) индуцировали в системе родитель – >F1 реципиент: клетки селезенки мышей-самок СВА в дозе 120×10^6 /мл вводили однократно внутривенно мышам-самкам (СВАхС57BL/6)F1 гибридам. Соединение в дозе 10 мг/кг вводили, начиная со второго дня после переноса клеток. Произведено 8 инъекций. Учет выражен-

ности РТПХ проводили на 9 день после индукции РТПХ по массе селезенки и селезеночному индексу (отношение массы селезенки к массе тела).

Таблица 6

Влияние соединения ВМ-7-02 на реакцию трансплантат против хозяина

Г р у п п ы	Масса тела (г.)	Масса селезенки (мг)	Селезеночный индекс
Интактные	19,9	81,2	4,1
РТПХ	21,2	235,8	11,1
РТПХ+ВМ-7-02	20,6	217,2	10,5

Как видно из данных таблицы 6, соединение ВМ-7-02 не оказывает влияния на выраженность РТПХ.

Показатели крови, массы лимфоидных органов и костного мозга.

Таблица 7

Группы	Кол-во ядросод. клеток крови $\times 10^6/\text{мл}$	Масса тимуса (мг)	Масса селезенки (мг)	Масса лимфоузла (мг)	Селез. индекс	Кол-во клеток костного мозга $\times 10^6/\text{бедро}$
Контроль	8,9	20,0	68,0	2,0	0,28	20,6
Опыт	7,2*	25,2	63,2	2,0	0,27	18,9

Как видно из данных таблицы 7, внутрибрюшинное введение соединения в дозе 10 мг/кг в течение 10 дней интактным мышам не приводит к существенным изменениям массы органов, за исключением достоверного снижения количества ядросодержащих клеток в крови.

Влияние иммунодепрессивных свойств соединения ВМ-7-02 на показатели крови и лимфоидных органов в период постциклофосфановой регенерации.

Известно гемато- и иммунотоксическое действие противоопухолевого препарата из класса хлорэтиламинов циклофосфана после однократного введения в дозе 200 мг/кг (доза, близкая к МДП) с последующим восстановлением показателей гемато- и иммунопоэза. ЦФ используется в экспериментальной иммунологии для моделирования токсических поражений иммунитета и изучения токсикомодифицирующих свойств новых соединений. Применяя курсовое введение соединения ВМ-7-02, обладающее выраженными антипролиферативными свойствами *in vitro* и *in vivo* на фоне постциклофосфановой регенерации, предполагали выявить замедление процессов восстановления.

Мышам-самкам линии СВА вводили циклофосфан однократно внутривенно на изотоническом растворе хлорида натрия в дозе 200 мг/кг, соединение ВМ-7-02 в дозе 10 мг/кг внутривенно на следующий день после введения циклофосфана в течение 10 дней. Проведено 2 серии опытов с морфологическим изучением лимфоидных органов. В таблице 8 представлены данные о влиянии соединения ВМ-7-02 на показатели крови и лимфоидных органов на 10 сутки после введения ЦФ.

Таблица 8

Влияние соединения ВМ-7-02 на показатели крови и лимфоидных органов на 10 день постциклофосфановой регенерации

Группы	Кол-во клеток крови $\times 10^6/\text{мл}$	Селезенка		Тимус		Лимфо-узел $\times 10^6$
		масса (мг)	клеточность $\times 10^6$	масса (мг)	клеточность $\times 10^6$	
Интактные	12,6	70,4	117,8	36,4	81,3	5,8
ЦФ	11,5	131,8*	84,3	26,6	25,4*	4,4
ЦФ+ВМ-7-02	11,6	91,2	121,3	19,8*	20,1*	6,2

* – достоверно относительно контроля.

Как видно из данных таблицы 8, к 10 суткам наблюдается практически полное восстановление количества лейкоцитов в периферической крови мышей. Введение комбинации ЦФ+ВМ-7-02 приводит к большему снижению массы селезенки и тимуса, а также клеточности тимуса по сравнению с введением одного ЦФ. Во второй серии опытов оценивали токсикомодифицирующее влияние соединения ВМ-7-02 на более раннем сроке восстановления. В таблице 9 представлены данные о влиянии соединения ВМ-7-02 на показатели крови и лимфоидных органов на 4 и 10 сутки после введения ЦФ.

Таблица 9

Влияние соединения ВМ-7-02 на показатели крови и лимфоидных органов на 4 и 10 день постциклофосфановой регенерации

Группы	4 сутки				10 сутки	
	Кол-во клеток крови $\times 10^6/\text{мл}$	Селезенка		Кол-во клеток крови $\times 10^6/\text{мл}$	Селезенка	
		масса (мг)	клеточность $\times 10^6$		масса (мг)	клеточность $\times 10^6$
Контроль	12,2	78,5	116,9	9,0	70,7	141,0
ЦФ	1,6*	38,4*	40,9*	9,2	99,4*	138,8
ЦФ+ВМ-7-02	1,4*	36,6*	22,5*	13,9*	91,6*	90,9*

* достоверно относительно контроля и ЦФ.

Как видно из данных таблицы 9, введение соединения ВМ-7-02 во время постциклофосфановой регенерации ухудшает показатели крови, массы и клеточности селезенки, однако недостоверно относительно ЦФ. При этом показатели клеточности селезенки снижены значительно больше, чем масса органа. При пересчете количества клеток в селезенке на мг веса органа выявляется достоверное отрицательное влияние соединения ВМ-7-02 на процессы восстановления клеточности в селезенке на 4 и 10 сутки. Данные представлены в таблице 10.

Таблица 10

Влияние соединения ВМ-7-02 на количество клеток в селезенке на мг веса органа на 4 и 10 сутки постциклофосфановой регенерации

Группы	Количество клеток в селезенке $\times 10^6$ /мг веса органа	
	4 сутки	10 сутки
Контроль	1,49 $\times 10^6$ /мг	1,99 $\times 10^6$ /мг
ЦФ	1,01 $\times 10^6$ /мг	1,39 $\times 10^6$ /мг
ЦФ+ВМ-7-02	0,62 $\times 10^6$ /мг*	0,98 $\times 10^6$ /мг*

* - достоверно относительно контроля.

Как видно из данных таблицы 10, введение соединения ВМ-7-02 на следующие сутки после введения ЦФ достоверно ухудшает восстановление клеточности в селезенке на 4 и 10 сутки.

Влияние соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 на пролиферативную активность стволовых кроветворных клеток интактных мышей

Проведены исследования по оценке соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 как потенциальных ингибиторов/стимуляторов пролиферативной активности КОЕс методом «тимидинового самоубийства». ККМ мышей, интактные или стимулированные тестостероном, инкубировали *in vitro* с соединениями в дозе 150 мкг/мл в течение 4-х часов. Установлено, что соединение ВМ-42-99 стимулирует пролиферацию интактных/стимулированных КОЕс. Соединения ВМ-7-02, ВМ-8-02 не изменяют пролиферацию интактных и ингибируют пролиферацию «стимулированных» КОЕс. Так, соединение ВМ-7-02 подавляет пролиферацию КОЕс, стимулированную тестостероном, с 30,5% до 15,4%.

ВЫВОДЫ

1. Соединение ВМ-7-02 вне зависимости от дозы и способа введения в 80% случаев (общее количество мышей с гломерулонефритом – 16) приводит к снижению белка в моче.

2. При сравнении соединения ВМ-7-02 и азатиоприна по токсичности можно отметить, что соединение вызывает иммунодепрессивный эффект у мышей с гломерулонефритом в дозе на порядок ниже относительно LD₅₀, чем азатиоприн.

3. Вне зависимости от способа введения соединения ВМ-7-02 (внутрижелудочно или внутрибрюшинно), но в зависимости от времени его введения относительно антигена, наблюдается дозозависимое подавление первичного гуморального иммунного (IgM) ответа у интактных мышей.

4. Соединение ВМ-7-02 практически не оказывает влияния на выраженность клеточного иммунитета *in vivo* (ГЗТ, РТПХ).

5. Соединение ВМ-7-02 во время постциклофосфановой регенерации ухудшает показатели крови, массы и клеточности селезенки.

6. Соединение ВМ-7-02 не изменяет пролиферацию интактных, но ингибирует пролиферацию стимулированных тестостероном КОЕс в 2 раза.