

НЕВРОЛОГИЯ И НЕЙРОХИРУРГИЯ

УДК: 616.8–08:576

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ПАТОЛОГИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Аллахвердиев Лойман Мехман–оглы, Колпаков Роман Юрьевич, Апрелев Вадим Евгеньевич
Кафедра неврологии, медицинской генетики

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России
Оренбург, Россия

Аннотация

Введение. Стволовые клетки – недифференцированные клетки, способные к самообновлению и превращению в зрелые клетки. Исследования показывают, что стимуляция процессов репаративной регенерации нейронов может быть эффективным методом восстановления функции нервной системы. **Цель исследования** – рассмотреть перспективы применения мезенхимальных стволовых клеток в лечении заболеваний нервной системы. **Материал и методы.** Провести анализ последних литературных данных, касающихся теоретического обоснования и практических результатов применения мезенхимальных стволовых клеток в лечении заболеваний нервной системы. **Результаты.** Мезенхимальные стволовые клетки – это собой мультипотентные стромальные клетки, существующие во многих тканях человека и характеризующиеся дифференцировкой в клетки мезодермального происхождения. Особенно активны стали применяться в неврологической практике при таких заболеваниях, как ишемия головного мозга, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и другие. **Выводы.** Стволовые клетки являются перспективным способом лечения различных заболеваний нервной системы, они обладают большим потенциалом для улучшения качества жизни пациентов, в то время как традиционная медицина не предполагает эффективного лечения.

Ключевые слова: регенеративная медицина, стволовые клетки, плюрипотентность, заболевания нервной системы.

PROSPECTS FOR THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF NERVOUS SYSTEM PATHOLOGY

Allahverdiev Loyman Mehman–ogly, Kolpakov Roman Yurevich, Aprelev Vadim Evgenievich

Department of Neurology, Medical Genetics

Orenburg State Medical University

Orenburg, Russia

Abstract

Introduction. Stem cells are undifferentiated cells capable of self–renewal and transformation into mature cells. Studies show that stimulation of reparative neuronal regeneration processes can be an effective method of restoring the function of the nervous system. **The aim of this study** is to consider the prospects of application of mesenchymal stem cells in the treatment of diseases of the nervous system. **Material and methods.** To analyze recent literature data concerning the theoretical basis and practical results of mesenchymal stem cells application in the treatment of diseases of the nervous system. **Results.** Mesenchymal stem cells are multipotent stromal cells existing in many human tissues and characterized by differentiation into cells of mesodermal origin. They have become particularly active in neurological practice in diseases such as cerebral ischemia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and others. **Conclusion.** Stem cells are a promising way to treat various diseases of the nervous system, they have great potential to improve the quality of life of patients, while traditional medicine does not offer effective treatment.

Keywords: hand, nail phalanx, traumatic amputation, open fracture, injury, children.

ВВЕДЕНИЕ

Регенеративная медицина сравнительно молодой раздел медицины, объединивший в себе многие дисциплины – это гистология, молекулярная биология, нормальная физиология, тканевая инженерия и др.

Целью регенеративной медицины является восстановления утраченных структур с помощью стволовых клеток (СК). Также регенеративная медицины направлена на выращивание стволовых клеток *in vitro* с последующим введением в организм. Одним из наиболее важных разделов этой молодой науки является клеточная терапия – использование стволовых клеток, направленных на приобретение утраченной функции органа или целой системы.

Особенно часто стволовые клетки используются в неврологии и нейрохирургии. Заболевания нервной системы такие, как цереброваскулярные, нейродегенеративные, связаны

с повреждением, разрушением и потерей нервных клеток. Поскольку многие травмы и заболевания нервной системы не поддаются эффективному лечению стандартными медицинскими методами, а терапия направлена лишь на устранение симптомов, появляются альтернативные варианты лечения. Одним из таких вариантов и является регенеративная медицина, которая позволяет эти барьеры устранить.

Цель исследования – рассмотреть перспективы применения мезенхимальных стволовых клеток в лечении заболеваний нервной системы

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Провести анализ отечественной и зарубежной литературы по эффективности и перспективе применения МСК в лечении заболеваний нервной системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стволовые клетки – это тип клеток с потенциалом самообновления и мультипотентности. Они играют ключевую роль в формировании и функционировании организма и являются одним из наиболее активно изучаемых объектов благодаря своей уникальной роли клеточного резервуара для поддержания и восстановления функции органов и тканей. Первой попыткой медицинского применения стволовых клеток костного мозга датируется 1891 годом, когда два французских физиолога Шарль Броун–Секар и Жак д. Арсонваль попытались излечить больного лейкемией путем приема вытяжки костного мозга внутрь. Однако это попытка успеха не имела.

Термин «стволовая клетка» впервые был предложен в 1908 году А.А. Максимовым в статье, опубликованной на немецком языке, а в середине 70–х годов советский ученый А. Фриденштейн [1], изучая их, доказал, что именно в костном мозге находится их депо.

Стратегии лечения заболеваний и травм нервной системы назначают менее прямой, но все же полезный источник клеток для трансплантации для лечения неизлечимых заболеваний – МСК. В настоящее время МСК используются в регенеративной медицине в двух контекстах: аутологичном и аллогенном. В первом случае требуется интеграция МСК в регенерирующие ткани, и важны способность к пролиферации и синтезу внеклеточного матрикса. В последнем случае интеграции МСК не ожидается, даже если МСК экспрессируют низкие уровни маркеров гистосовместимости.

МСК были идентифицированы в костном мозге, пуповинной крови, жировой ткани, пульпе зубов, субэндотелиальных слоях, амниотической жидкости, печени плода, эндометрии и др. Недавно были обнаружены перициты с МСК–подобными характеристиками, способные экспрессировать классические маркеры перицитов и напоминали МСК, полученные из костного мозга [3].

МСК, полученные из костного мозга (BM–МСК), содержат подгруппу, экспрессирующую нестин, маркер НСК, и могут дифференцироваться в глиальные клетки и нейроны с полными функциями, стимулируя пролиферацию, дифференцировку клеток.

МСК также способны секретировать паракринные медиаторы, уменьшая уровень провоспалительных цитокинов (ФНО– α и ИЛ–1) и ускоряя регенерацию тканей за счет активации резидентных стволовых клеток и мобилизации циркулирующих системных стволовых клеток посредством хемотаксической сигнализации [2].

Также было показано, что МСК могут продуцировать множество проангиогенных, ремоделирующих ткани, антиапоптотических, ростовых и трофических факторов, которые могут поддерживать выживание клеток–хозяев, восстановление поврежденной ткани, активацию и дифференцировку местных предшественников.

Хотя МСК из разных источников имеют общие характеристики, между ними имеются и ряд отличий. Paola Romina Amable и др. опубликовали исследования, направленные на изучение отличительных особенностей МСК, полученных из наиболее часто применяемых заборов стволовых клеток: костный мозг, желе Уортона и жировая ткань [4].

МСК, полученных из желе Уортона (WJ–МСК), в зависимости от выбранного метода выделения (выделенные ферментативно коллагеназой, трипсином или гиалуронидазой или путем экстракции непосредственно из эксплантатов), могут незначительно отличаться по

таким характеристикам, как экспрессия маркеров плюрипотентности и скорости пролиферации клеток/ Было доказано, что WJ–МСК обладают более высоким потенциалом пролиферации, а самым низким обладают BM–МСК. Только AT–МСК (МСК, полученные из жировой ткани) секретируют коллаген I, II, III, IV типов и металлопроиназы, а WJ–МСК выделяют ограниченное количество компонентов внеклеточного матрикса. WJ–МСК имеют провоспалительный профиль, а BM–МСК противовоспалительный. BM–МСК обладают более низким ангиогенным потенциалом и что AT – и WJ–МСК более ангиогенны, но их эффекты могут отличаться, поскольку они секретируют другую группу ангиогенных факторов. AT – и BM–МСК показали более высокий адипогенный потенциал по сравнению с WJ–МСК. Что касается остеогенного потенциала, AT–МСК показал самое высокое отложение кальция. Среди хемокинов были обнаружены MCP, MIP–1, IP–10. Факторы роста EGF, bFGF, TGF– β 3, PDGF–AB и IGF–1 не были обнаружены ни в одном супернатанте, что означает, что их концентрации были ниже предела обнаружения соответствующих анализов [4].

Существуют разные пути введения MSC: внутривенный, внутриартериальный, интратекальный, интраназальный, внутрибрюшинный, внутрипузырный, внутримозговой или прямое введение в определенные структуры. Способ введения важен, поскольку он определяет количество успешно пересаженных клеток в поврежденном месте, которое может быть коррелировано с терапевтическим исходом. На данный момент большую популярность имеет интраназальный способ введения стволовых клеток. Это метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими: он обладает более высокой степенью доставки в ЦНС, позволяет избежать метаболизма вводимых компонентов при первом внедрении, он менее инвазивен и прост в применении, что позволяет при необходимости повторять введение, и побочные эффекты могут быть сведены к минимуму.

Впервые интраназальная доставка была совершена Уильямом Фреем в 1989 году. В 2009 году Даниелян и др. сначала доставляли флуоресцентно меченные мезенхимальные стволовые клетки крыс или клетки глиомы человека в мозг грызунов через носовую полость [2]. Интраназально доставленные клетки наблюдались в обонятельной луковице, коре головного мозга, мозжечке и субарахноидальном пространстве. С тех пор несколько исследований доказало, что интраназально доставленные клетки демонстрируют более обширную миграцию в поврежденные области в мышинных моделях гипоксии–ишемии и ишемического инсульта.

Также ряд исследования показали, что, хотя наиболее приемлемым методом трансплантации MSC является внутривенная инъекция, в таких условиях большинство клеток попадают в «ловушку» в легких. Тем не менее, такие захваченные MSC могут высвобождать микровезикулы и иммуномодулирующие факторы и влиять на общее состояние пациента путем модуляции периферических иммунных клеток.

Чжан и др. (2018) проводили исследование над крысами с ишемией мозга с целью выяснить, какой из трех методов: внутриартериальный, внутривенный или интрацеребральный – является наиболее предпочтительным [5,6]. Было показано, что все три способа введения вызвали улучшение неврологических функций, восстановление миелинизации в области мозолистого тела на стороне инфаркта, но эти процессы все же лучше наблюдались при внутриартериальном введении.

Важными хемоаттрактантами, которые могут усиливать MSC в областях повреждения головного мозга, являются MCP-1 и фактор-1, полученный из стромальных клеток. В исследовании Ли и соавт. (2015) на модели инсульта крыс МСАО (окклюзия средней мозговой артерии) было показано, что MCP-1 и SDF-1 имеют дифференциальную экспрессию, зависящую как от места, так и от времени, которая направляет внутривенно вводимые MSC мигрировать либо в кору головного мозга через 1 день после травмы, либо в полосатое тело в более поздние дни [7]. Так уровень MCP–1 в экстрактах ишемизированной ткани головного мозга повышался через 6 часов после МСАО, достигал максимума через 48 часов и снижался через 7 дней. Кроме того, в отношении MSC хемотаксическая активность MCP–1 достигла максимума через 24 часа после МСАО [8]. Напротив, экспрессия SDF–1 временно снижалась

через 6 часов, увеличивалась через 2 и 4 дня, а затем достигала пика в течение 7 дней после ишемического повреждения. Кроме того, в настоящем исследовании было установлено, что преимущественно миграция МСК происходила в ишемизированную область коры головного мозга, которая модулирует двигательную активность.

Благодаря своим иммуномодулирующим свойствам МСК могут устранять воспаление, вызванное травмой и дегенерацией; они могут поддерживать выживание нейронов и влиять на регенерацию потери тканей, воздействуя на местные нейрогенные ниши. Так, в 2010–2012 году Llufríu и др. доказали, что при лечении рассеянного склероза МСК наблюдается незначительное уменьшение популяций Th1/Th17, увеличение популяции регуляторных В-клеток (Breg) и отсутствие изменений в отношении естественных и индуцированных популяций регуляторных Т-клеток [9].

МСК могут влиять на воспаление, выделяя растворимые факторы или непосредственно контактируя с клетками – это ТФР- β , IL-6 и IL-10, Pg E2.

Способность МСК к нейрорегенерации также основана на секреции широкого спектра паракринных веществ клетками-хозяевами и МСК. Несколько факторов роста секретируются МСК: нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов, ИФР-1, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF) и VEGF. Нейропротекторная функция трансплантированных МСК основана на снижении чувствительности нейронов к лигандам глутаматных рецепторов и изменении экспрессии генов, что предполагает связь между терапевтическими эффектами МСК и активацией клеточной пластичности в поврежденных нервных структурах.

Несмотря на их врожденный мультипотентный характер, МСК могут быть еще идеально адаптированы к конкретному типу травмы. Этого прогресса можно достичь путем соответствующей подготовки МСК к конкретным условиям перед трансплантацией. На сегодняшний день установлены различные способы праймирования МСК цитокинами, гипоксией, фармакологическими агентами, биоматериалами и другими молекулами.

При некоторых неврологических расстройствах, таких как болезнь Паркинсона и инсульт, в качестве метода лечения предлагается генная терапия. Одной из проблем таких подходов является передача генов. Было показано, что модифицированные клетки оказывают более выраженный терапевтический эффект, чем немодифицированные МСК. Однако необходимы дополнительные исследования, чтобы определить, является ли транзиторная доставка таких факторов роста достаточной или необходима повторная трансплантация в зависимости от лечаемого заболевания. В отличие от этого, МСК также могут использоваться для уменьшения нежелательных генов, способствующих восстановлению. Так исследование, проводившееся Ли и др. (2009), показало, что модификация МСК с помощью лентивирусной РНК, понижающей аденозинкиназу, помогает снизить интенсивность припадков на мышинной модели фокальных СА3-селективных спонтанных припадков [10].

Было показано, что МСК дифференцируются во многие типы клеток нервной системы, включая дофаминовые нейроны, моторных нейроноподобных клеток, секретирующих ацетилхолин, холинергических нейронов, ГАМКергических нейронов и олигодендроциты. Однако функциональность этих клеток остается спорной. В частности, условия, необходимые для того, чтобы заставить МСК дифференцироваться в нейрональные клетки, требуют наличия факторов, таких как 5-аза-дезоксцитидин, которые естественным образом не обнаруживаются в живых организмах. С другой стороны, приведение МСК к нейронному фенотипу может свидетельствовать о терапевтическом эффекте только МСК. Потенциал дифференцировки МСК может быть использован во время их подготовки перед трансплантацией.

Начиная с открытия стволовых клеток, ученые проводили большое количество испытаний, направленных на их исследование. Большинство клинических испытаний показали безопасность различных применений МСК. При проведении экспериментов в некоторых случаях наблюдались побочные эффекты, в большей степени, связанные не с самими клетками, а со способом их введения. Например, при исследовании эффективности

использования МСК для лечения хронического инсульта были выявлены некоторые побочные эффекты: скопление жидкости в субдуральном пространстве, эпилептический припадок, пневмония, также появлялись головные боли, связанные с хирургической процедурой (77.8%), тошнота (33.3%), рвота (22.2%), депрессия (22.2%), мышечная спастичность (22.2%), усталость (16.7%), повышение уровня глюкозы в крови (16.7%) и повышение С-реактивного белка (16.7%) [11]; в другом исследовании попадание МСК приводило в конечном счете к летальной тромбоэмболии легочной артерии и повышенному риску ятрогенного ателектаза [11,12]. У пациентов, получавших интратекальное введение, наиболее частыми осложнениями после процедуры были лихорадка, головная боль, тогда как парестезия и невропатическая боль были среди наиболее частых зарегистрированных событий у пациентов, получавших интратекальное введение [13]. Однако клинические испытания, проведенные у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом и спинально-мышечной атрофией, показали, что при интратекальном введении МСК выраженных побочных эффектов не было [12, 14].

В большинстве исследований безопасность и эффективность оценивали дополнительно с помощью МРТ [9, 15, 16].

Трансплантация МСК привела в основном к значительным неврологическим улучшениям. Так, при лечении МСК в связи их иммуномодулирующим, нейротрофическим болезни Паркинсона показало предотвращение потери дофаминергических нейронов черной субстанции, улучшению двигательных функций, защиту nigrostriatalной системы и улучшение высвобождения дофамина [11].

Другое исследование показало, что интраназальное введение А1-экзосом на ранней стадии после эпилептического статуса включало: подавление повышенного синтеза провоспалительных цитокинов, повышенная экспрессия нескольких противовоспалительных цитокинов и трофических факторов, снижении активации микроглии и потеря зубчатых хиллярных нейронов, надежная защита глутаматергических пирамидных нейронов и уменьшенная потеря нескольких подклассов ГАМКергических ингибирующих интернейронов [17].

Как показано выше, МСК улучшают функциональный дефицит при ряде заболеваний центральной нервной системы как на экспериментальных моделях животных, так и в клинике. Терапевтические механизмы могут включать нейропротекторные эффекты, иммуномодуляцию, ремоделирование тканей и активацию местных предшественников. Таким образом, МСК подготавливают среду для роста аксонов, стимулируют ангиогенез и приводят к функциональному восстановлению.

Растущие знания о регенеративном потенциале МСК вселяют большие надежды на их применение в клинике. Тем не менее, все еще есть возможности для улучшения, и необходимо провести дополнительные доклинические исследования для оценки условий культивирования клеток, а также времени и способа введения.

Во-первых, на данный момент нет оптимального источника МСК для трансплантации. Как было сказано ранее. МСК могут различаться между источниками по своему регенеративному потенциалу, о чем свидетельствуют, например, различные уровни секретируемых трофических факторов или склонность клеток дифференцироваться в разные линии.

Во-вторых, существует недостаток комплексных исследований, обсуждающие вопросы количества пересаженных клеток, необходимых для улучшения неврологических расстройств. привело к улучшению клинических результатов при неврологических расстройствах.

В-третьих, еще одна возникающая проблема связана с необходимостью проведения параллельных клинических и доклинических исследований. Такой подход был реализован лишь в меньшинстве клинических исследований. Этот тип научного подхода необходим не только для выявления потенциальных улучшений, но и для обеспечения использования надежных научных методов для объяснения наблюдаемых явлений.

В-четвертых, нет единого мнения по поводу наилучшего метода трансплантации МСК. Внутривенно пересаженные МСК могут попасть в легкие и печень, из которых они могут высвобождать микровезикулы и иммуномодулирующие факторы. В некоторых исследованиях такое попадание приводило в конечном счете к летальной тромбоэмболии легочной артерии и повышенному риску ятрогенного ателектаза.

ВЫВОДЫ

МСК обладают большим потенциалом для улучшения качества жизни пациентов, в то время как традиционная медицина не предполагает эффективного лечения. Однако и сейчас есть ряд проблем в исследовании подобного рода клеток, которые решаются клиническими испытаниями как на животных, так и на людях. Поскольку внедрить плацебо-контроль достаточно трудно, необходимо более детально проводить доклинические исследования с использованием разных методов введения и разных видов МСК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Chen X. Human mesenchymal stem cells/ Chen X., Huang J., Wu J.//Cell Prolif – 2022. – Vol.55 №4. – P.13141.
2. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review/ Rodríguez-Fuentes D., Fernández-Garza L., Samia-Meza J. et al.//Arch Med Res.– 2021. – Vol. 52(1). – P. 93–101.
3. Perivascular Mesenchymal Stem Cells From the Adult Human Brain Harbor No Intrinsic Neuroectodermal but High Mesodermal Differentiation Potential/Lojewski X., Srimasorn S., Rauh J., et al.// Stem Cells Transl Med.– 2015. – Vol. 4(10). – P. 1223–1233.
4. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly/Amable P., Teixeira M., Carias R., Granjeiro J., Borojevic R. // Stem Cell Res Ther.– 2014. – Vol.5(2).– P.53.
5. Advances in intranasal application of stem cells in the treatment of central nervous system diseases/Zhang Y., He K., Zhang J. et al.//Stem Cell Res Ther. –2021 – Vol.12(1) – P.210.
6. Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats/ Zhang H., Xie X., Xiong Y. et al. //Brain Research. – 2018. – Vol.1. – P. 143–154.
7. Muse cells: ushering in a new era of stem cell-based therapy for stroke/Li H., Wei J., Liu X. et al.// Stem Cell Res Ther.– 2022. – Vol. 13(1). – P. 421.
8. Mesenchymal stem cells as a multimodal treatment for nervous system diseases/Badyra B., Sułkowski M., Milczarek O., Majka M.// Stem Cells Transl Med. – 2020. – Vol.9(10). – P. 1174–1189.
9. Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis /Llufriu S., Sepúlveda M., Blanco Y., et al.// PLoS One.– 2014. – Vol.9(12).
10. Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke A Phase 1/2a Study./ Steinberg G., Kondziolka D., Wechsler L., et al.// Stroke. Author manuscript.– 2016. –Vol.47(7). – P. 1817–1824
11. Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis/Li T., Ren G., Kaplan D., Boison D.// Epilepsy Res. Author manuscript – 2009. – Vol.84(2–3). – P. 238–241.
12. Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS./Staff N., Madigan N., Morris J. et al.// Neurology.– 2016. – Vol.87(21). – P. 2230–2234.
13. Huang L. Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury/Huang L., Zhang L.// Prog Neurobiol. Author manuscript.– 2019. – Vol. 173. – P. 1–17.
14. An open-label phase 1 clinical trial of the allogeneic side population adipose-derived mesenchymal stem cells in SMA type 1 patients/Mohseni R., Hamidieh A., Shoaee-Hassani A. et al.// Neurol Sci. – 2022. – Vol.43(1). – P. 399–410.
15. Oh S. Current Concept of Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury: A Review/Oh S., Jeon S.// Korean J Neurotrauma.– 2016. – Vol.12(2). – P. 40–46.
16. Tatsumi K. Factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism/Tatsumi K., Ohashi K., Matsubara Y.// Biochem Biophys Res Commun. – 2013. –Vol. 431(2). – P. 203–209.
17. Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus / Long Q., Upadhyay D. et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – P. 114–117.
18. Chen H. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy/Chen H., Liang F., Gu P.// Cell Death Dis.– 2020. Vol.11(4). – P. 288.
19. Mesenchymal stem cells-derived therapies for subarachnoid hemorrhage in preclinical rodent models: a meta-analysis/He J., Liu J., Huang Y. et al.// Stem Cell Res Ther.– 2022. – Vol.13(1). – P. 42.
20. Autologous olfactory mucosa mesenchymal stem cells treatment improves the neural network in chronic refractory epilepsy/Liu Z., Huang Y., Hong C. et al.// Stem Cell Res Ther. –2023. – Vol.14(1). – P. 237.

Сведения об авторах

Л.М. Аллавердиев – студент лечебного факультета

Р.Ю. Колпаков – студент лечебного факультета

В.Е. Апрелев – доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

L.M. Allahverdiev – Student of Medical Faculty

R.Yu. Kolpakov – Student of Medical Faculty

V.E. Aprelev – Doctor of Sciences (Medicine), Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

loy25od@yandex.ru