



УДК 616.832-004.2-06:615.275

Федулов А.С.¹, Борисов А.В.¹, Зафранская М.М.², Марченко Л.Н.¹, Качан Т.В.¹, Кривенко С.И.³, Нижегородова Д.Б.², Московских Ю.В.¹, Авдей Л.Л.⁴, Дрик О.Н.³, Корневская И.Э.³

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

³ 9-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

⁴ Минский консультационно-диагностический центр, Минск, Беларусь

Fedulov A.¹, Borisov A.¹, Zafranskaja M.², Marchenko L.¹, Kachan T.¹, Krivenko S.³, Nizhegorodova D.², Moskovskih Y.¹, Avdei L.⁴, Drik O.³, Korenevskaya I.³

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

³ 9th Clinical Hospital, Minsk, Belarus

⁴ Minsk Consulting and Diagnostic Centre, Minsk, Belarus

Применение аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при рецидивно-ремиттирующей форме рассеянного склероза

Use of autologous transplantation of mesenchymal stem cells in relapsing-remitting form of multiple sclerosis

Резюме

Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при рассеянном склерозе (РС) заключается в эффектах иммуномодуляции, репарации или ремиелинизации и нейропротекции. Результаты исследования свидетельствуют о стабилизации или улучшении неврологического статуса при применении двукратной аутологичной трансплантации МСК у пациентов с РС на протяжении до 12 месяцев. Оптимальным сроком для второго введения АуТМСК является 9 месяцев после их первой инфузии.

Ключевые слова: рассеянный склероз, аутологичная трансплантация, мезенхимальные стволовые клетки.

Abstract

Analysis of the published data shows that the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) in multiple sclerosis (MS) is in the effects of immunomodulation, repair or remyelination, and neuroprotection. The results show the stabilization or improvement of neurological status in use of re-transplantation of autologous MSCs in MS patients for up to 12 months. The optimal period for re-AuTMSK is 9 months after their first injection.

Keywords: multiple sclerosis, autologous transplantation, mesenchymal stem cells.

■ ВВЕДЕНИЕ

Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при рассеянном склерозе (РС) заключается в эффектах иммуномодуляции (ингибирование энцефалитогенных Т- и В-лимфоцитов, активация регуляторных клеток), ремиелинизации (активация процессов олигодендрогенеза и восстановление миелиновой оболочки) и нейропротекции (защита нейронов и олигодендроцитов от клеточной гибели за счет трофических факторов, эффект трансдифференцировки в олигодендроциты и активация эндогенных нервных стволовых клеток) [1–3]. Эффективность аутологичной трансплантации МСК (АуТМСК) у пациентов с РС установлена в ряде исследований [4–7].

Жизнеспособность введенных внутривенно, интратекально или интестинциально стволовых клеток ограничена неделями, хотя эффект может поддерживаться и дольше за счет инициированных каскадных механизмов иммунорегуляции. В связи с вышеуказанным, целесообразным представляется повторное введение МСК для поддержания эффекта клеточной терапии после их первой трансплантации. В настоящее время отсутствуют четкие представления по оценке временного интервала между повторными трансплантациями в связи со сложностью визуализации МСК в организме.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести сравнительную оценку эффективности однократной и повторной трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток у пациентов с рецидивно-ремиттирующей клинической формой рассеянного склероза.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования – проспективное, когортное, лонгитюдное, открытое, одноцентровое.

Верификация диагноза РС проводилась на основании критериев McDonald и соавторов (2010 г.) [8]. В основную группу были включены 19 пациентов с рецидивно-ремиттирующей клинической формой РС, которым проводилась однократная либо повторная АуТМСК. Период от забора МСК до трансплантации составлял $22,8 \pm 3,3$ дня. Количество клеточных пассажей – от 2 до 3. Аутологичные МСК вводили внутривенно в дозе $1,0 \times 10^6$ /кг массы тела. Повторная трансплантация осуществлялась через 9 месяцев после первой. В контрольную группу (КГ) рекрутировали пациентов с РС, которым проводилась симптоматическая терапия. При эксацербациях у пациентов использовались глюкокортикостероиды. Эффективность терапии оценивали у пациентов с однократной АуТМСК через 9 месяцев после трансплантации, с повторной – спустя 9 месяцев после второй инфузии МСК. Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Выраженность инвалидизации пациентов с РС оценивали по шкале EDSS (Expanded Disability Status Scale). Оценку патоморфологических изменений осуществляли с помощью магнитно-резонансной томографии головного мозга (Philips Intera, Голландия), индукция магнитного поля – 1,5 Тс. Для внутривенного усиления вводили парамагнетик омнискан



Таблица 1
Клинико-демографическая характеристика пациентов с рассеянным склерозом (n=32)

Параметр	Однократная АУТМСК	Повторная АУТМСК	Контрольная группа
Количество пациентов	12	7	13
Пол, ж/м	7/5	4/3	5/8
Возраст, лет ¹	30,1±6,8	34,3±4,8	32,8±5,0
Длительность заболевания, лет ¹	3,2±3,1	5,1±4,8	3,1±1,5
EDSS на этапе скрининга, баллы ²	2,4 [1,5; 4,0]	2,6 [1,5; 4,0]	2,7 [1,5; 3,0]
Количество обострений за год до АУТМСК ²	1 [1; 1]	2 [1; 2]	1 [1; 1]

Примечания:

¹ M±tm_н

² Me – межквартильный интервал.

(Амершам Хелс, Корк, Ирландия) в дозе 20–40 мл (в зависимости от массы тела). Для проведения оптической когерентной томографии (ОКТ) заднего отрезка глазного яблока использовали оптический когерентный томограф Stratus OCT модель 3000 фирмы Carl Zeiss Meditec с источником света – суперлюминесцентным диодом длиной волны 820 нм. Протоколы, применявшиеся у пациентов с РС:

- 1) Optic Disc (сосочек диска зрительного нерва);
- 2) RNFL Thickness (толщина слоя нервных волокон сетчатки).

Исследовались толщина слоя нервных волокон сетчатки (СНВС), полный макулярный объем, площадь нейроретинального ободка.

Для нахождения достоверных различий между сравниваемыми группами применяли непараметрические статистические методы: критерий Манна – Уитни (две независимые группы); критерий Уилкоксона (одна группа до и после лечения); точный критерий Фишера (для анализа таблиц сопряженности при небольшом количестве наблюдений).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении выраженности инвалидизации по шкале EDSS на этапе скрининга статистически значимых различий между группами пациентов с однократной и повторной АУТМСК не наблюдалось (Mann – Whitney=–0,75, p=0,45), что свидетельствует об одинаковой выраженности неврологических нарушений в этих группах. При оценке неврологического статуса всех пациентов с РС, которым проводилась АУТМСК на этапе скрининга и через 9 месяцев после однократной (n=12) либо повторной (n=7) трансплантации статистически значимое различие не определялось (Wilcoxon=1,7, p=0,09), что отражает стабилизацию патологического процесса обследованных.

Спустя 9 месяцев после трансплантации выраженность инвалидизации по шкале EDSS в группе пациентов, проходивших однократную АУТМСК (n=12), существенно не изменилась (Wilcoxon=0,37, p=0,71) и составила 2,0 балла EDSS.

Среди пациентов с РС, которым проводилась повторная АУТМСК (n=7) выраженность инвалидизации по шкале EDSS через 9 месяцев

после первой трансплантации также достоверно не отличалась от таковой на этапе скрининга. При этом сравнение неврологического статуса пациентов до АуТМСК и через 9 месяцев после повторной трансплантации выявило статистически значимое снижение баллов по EDSS (Wilcoxon=2,02, $p=0,04$) (рис. 1) с 3,0 [2,0; 3,0] до 2,0 [1,5; 2,0], что отражает снижение неврологического дефицита у пациентов с РС исследуемой группы.

При сравнении неврологического дефицита по шкале EDSS на этапе скрининга статистически значимых различий между группами пациентов, которым была выполнена АуТМСК, и пациентов с КГ не отмечалось (Mann – Whitney=-1,004, $p=0,31$). Вместе с тем оценка неврологического дефицита у пациентов КГ на этапе скрининга и через 9 месяцев мониторинга выявила нарастание выраженности инвалидизации по шкале EDSS (Wilcoxon=2,5, $p=0,01$) с 2,75 [2,0; 3,0] до 3,5 [2,5; 4,0].

Спустя 9 месяцев после трансплантации пациенты, прошедшие АуТМСК, имели статистически достоверно менее выраженную инвалидизацию чем пациенты, которым трансплантация не выполнялась (Mann – Whitney=-3,36, $p=0,0008$). Причем статистически значимые различия отмечались, как при сравнении группы пациентов после однократной АуТМСК и КГ (Mann – Whitney=-2,73, $p=0,006$), так и группы пациентов после повторной АуТМСК и КГ (Mann – Whitney=-2,85, $p=0,004$) (рис. 2).

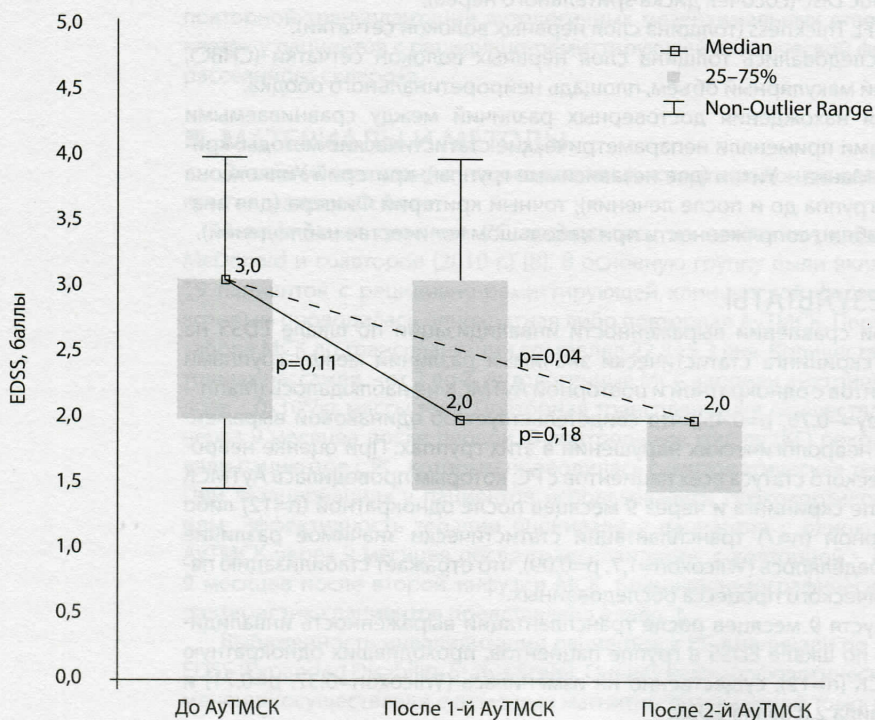


Рис. 1. Динамика неврологического статуса пациентов с рассеянным склерозом после повторной аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (n=7)

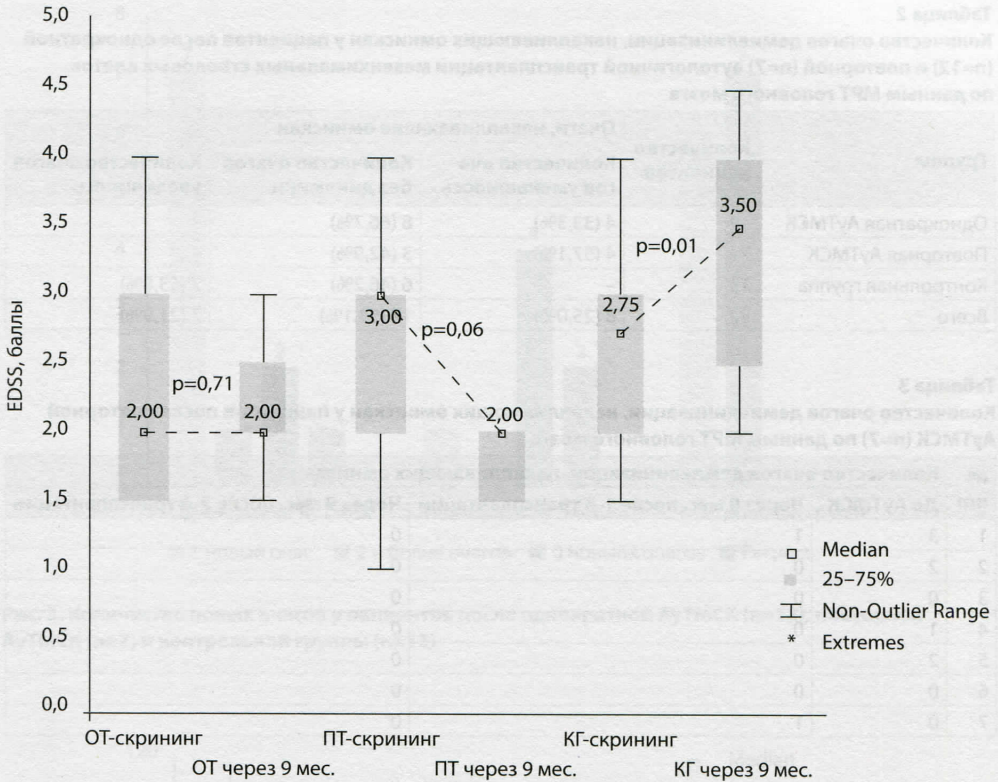


Рис. 2. Динамика неврологического статуса пациентов после однократной аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (ОТ, n=13), повторной аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (ПТ, n=7) и контрольной группы (КГ, n=13)

На этапе скрининга у пациентов с РС, которым выполнялась однократная/повторная АуТМСК и среди пациентов с КГ количество активных очагов демиелинизации при МРТ головного мозга было сопоставимым и составляло от 0 до 2 очагов, накапливающих омнискан.

При оценке влияния АуТМСК на количество очагов демиелинизации, накапливающих парамагнетик (омнискан), по данным МРТ статистически значимые различия между группами пациентов, которые проходили однократную или повторную трансплантацию не определяются (Fisher exact $p=0,3765$, two-tailed). Вместе с тем, относительное количество пациентов с РС, у которых уменьшилось количество активных очагов через 9 месяцев после трансплантации среди пациентов, прошедших повторную АуТМСК было выше, чем среди лиц с однократной АуТМСК: соответственно 57,1% и 33,3% (табл. 2).

В группе пациентов, которые прошли повторную трансплантацию аутологичных МСК, отмечалось снижение числа активных очагов демиелинизации через 9 месяцев после первой и повторной АуТМСК (табл. 3). Причем после повторной трансплантации аутологичных МСК очагов, накапливающих парамагнетик, у обследованных РС не выявлено.

Таблица 2

Количество очагов демиелинизации, накапливающих омнискан у пациентов после однократной (n=12) и повторной (n=7) аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток по данным МРТ головного мозга

Группы	Количество пациентов	Очаги, накапливающие омнискан		
		Количество очагов уменьшилось	Количество очагов без динамики	Количество очагов увеличилось
Однократная АуТМСК	12	4 (33,3%)	8 (66,7%)	–
Повторная АуТМСК	7	4 (57,1%)	3 (42,9%)	–
Контрольная группа	13	–	6 (46,2%)	7 (53,8%)
Всего	32	8 (25,0%)	17 (53,1%)	7 (21,9%)

Таблица 3

Количество очагов демиелинизации, накапливающих омнискан у пациентов после повторной АуТМСК (n=7) по данным МРТ головного мозга

№ п/п	Количество очагов демиелинизации, накапливающих омнискан		
	До АуТМСК	Через 9 мес. после 1-й трансплантации	Через 9 мес. после 2-й трансплантации
1	3	1	0
2	2	0	0
3	0	0	0
4	1	0	0
5	2	0	0
6	0	0	0
7	0	1	0

После однократной трансплантации аутологичных МСК у большинства пациентов с РС «свежие» очаги демиелинизации не визуализировались либо отмечалось не более 1 такого очага – 66,7%. Обследованные с РС, которым выполнялась повторная трансплантация, после 1-й АуТМСК в 71,4% случаев имели не более 1 очага демиелинизации, после 2-й АуТМСК у пациентов либо не отмечалось «свежих» очагов демиелинизации – 71,4%, либо имел место регресс одного или нескольких таких очагов – 28,6%. В контрольной группе после 9 месяцев наблюдения у 53,8% пациентов появилось 2 или более новых очага демиелинизации (рис. 3).

Таким образом, на основании проведенных исследований можно предположить, что АуТМСК является эффективным методом снижения активности патологического процесса у пациентов с РС, т.к. позволяет значительно уменьшать количество активных и появление новых очагов демиелинизации.

Изучение толщины СНВС по данным ОКТ у пациентов с РС до АуТМСК и через 9 месяцев после трансплантации выявило статистически значимое увеличение слоя нервных волокон (Wilcoxon=2,85, p=0,004) (рис. 4).

Сравнение динамики данного показателя у обследованных с однократной и повторной трансплантацией аутологичных МСК показало, что более значительное нарастание толщины СНВС наблюдалось в группе пациентов, которым АуТМСК выполнялась повторно (рис. 4).

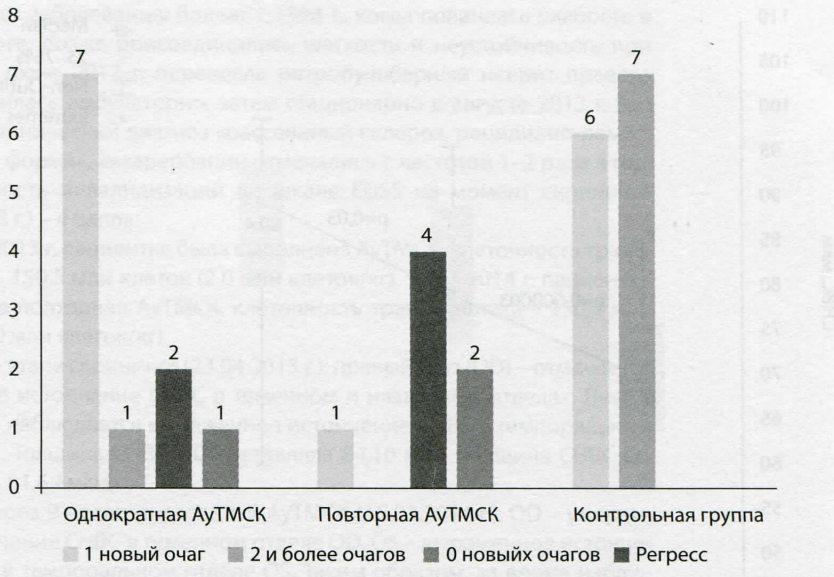


Рис. 3. Количество новых очагов у пациентов после однократной АуТМСК (n=12), повторной АуТМСК (n=7) и контрольной группы (n=13)

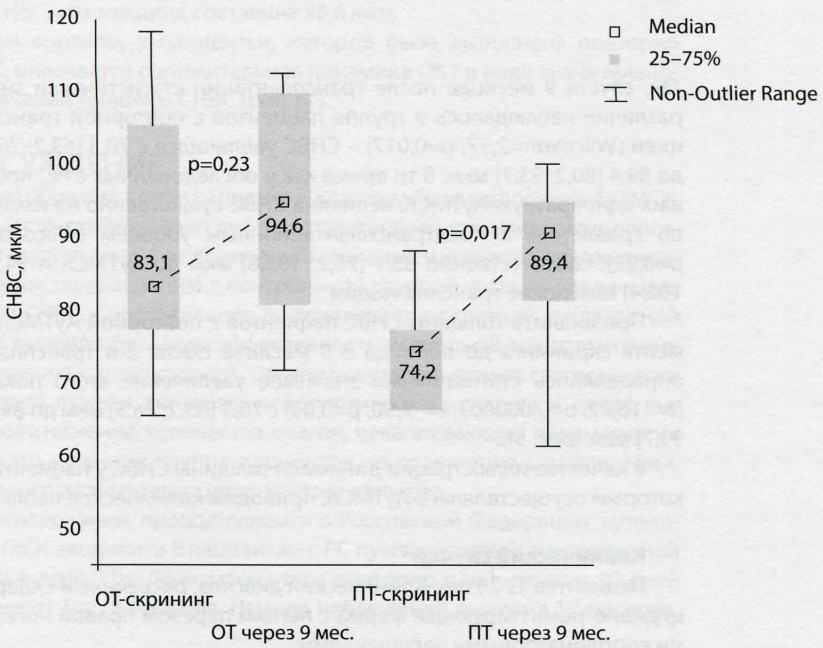


Рис. 4. Динамика толщины слоя нервных волокон сетчатки у пациентов с рассеянным склерозом после однократной трансплантации и повторной трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток

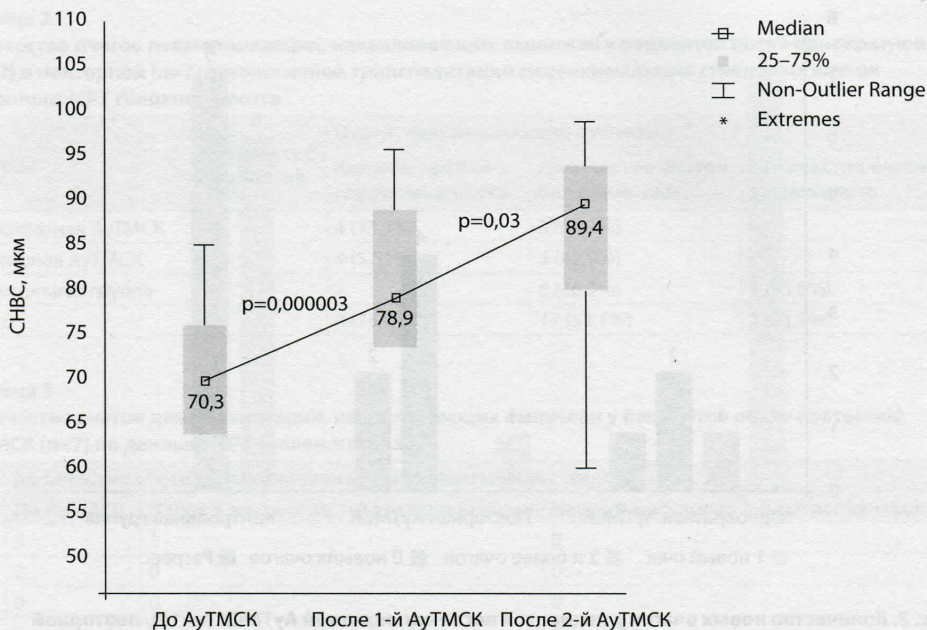


Рис. 5. Динамика толщины слоя нервных волокон сетчатки пациентов с рассеянным склерозом, которым проводилась повторная аутологичная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (n=7)

Так, спустя 9 месяцев после трансплантации статистически значимое различие наблюдалось в группе пациентов с повторной трансплантацией (Wilcoxon=2,37, $p=0,017$) – CHBC увеличился с 70,3 [63,2; 76,3] мкм до 89,4 [80,2; 93,7] мкм. В то время как у обследованных с РС, проходивших однократную АуТМСК, величина CHBC существенно не изменилась по сравнению с предтрансплантационным уровнем (Wilcoxon=1,21, $p=0,23$): соответственно 83,1 [76,2; 103,8] мкм до АуТМСК и 94,6 [79,5; 108,4] мкм после трансплантации.

При анализе толщины CHBC пациентов с повторной АуТМСК от момента скрининга до периода в 9 месяцев после 2-й трансплантации определялось статистически значимое увеличение этого показателя ($t=-16,22$, $p=0,000003$; $t=-2,90$, $p=0,03$) с 70,3 [63,2; 76,3] мкм до 89,4 [80,2; 93,7] мкм (рис. 5).

В качестве иллюстрации динамики толщины CHBC у пациентов с РС, которым осуществлялась АуТМСК, приводим клиническое наблюдение.

Клинический случай

Пациентка Т., 26 лет. Клинический диагноз: рассеянный склероз, рецидивно-ремиттирующая форма с легким парезом правой ноги, легкими координаторными нарушениями.

Жалобы на слабость в правой ноге, неустойчивость и шаткость при ходьбе.



Анамнез заболевания: болеет с 1998 г., когда появилась слабость в правой ноге, позже присоединились шаткость и неустойчивость при ходьбе. В июне 2012 г. перенесла ретробульбарный неврит правого глаза. Лечилась амбулаторно, затем стационарно в августе 2012 г. Выставлен клинический диагноз «рассеянный склероз, рецидивно-ремиттирующая форма». Экзацербации отмечались с частотой 1–2 раза в год. Выраженность инвалидизации по шкале EDSS на момент скрининга (23.04.2013 г.) – 4 балла.

16.05.2013 г. пациентке была выполнена АуТМСК, клеточность трансплантата – 150,5 млн клеток (2,0 млн клеток/кг). 17.03.2014 г. пациентке выполнена повторная АуТМСК, клеточность трансплантата – 150,0 млн клеток (2,0 млн клеток/кг).

ОКТ на этапе скрининга (23.04.2013 г.): правый глаз (OD) – отмечается умеренное истончение СНВС в теменном и назальном отделах. Левый глаз (OS) – наблюдается выраженное истончение СНВС в темпоральном отделе OS. Толщина СНВС OD составляла 84,10 мкм. Толщина СНВС OS равнялась 81,69 мкм.

ОКТ через 9 месяцев после 1-й АуТМСК (15.02.2014 г.): OD – умеренное истончение СНВС в теменном отделе OD. OS – выраженное истончение СНВС в темпоральном отделе OS. Таким образом, за время наблюдения отмечалась стабилизация толщины перипапиллярных нервных волокон.

ОКТ через 9 месяцев после 2-й АуТМСК (15.12.2014 г.): толщина СНВС OD без существенных изменений (84,13 мкм). Наблюдается выраженная положительная динамика в отношении OS, заключающаяся в восстановлении СНВС, его толщина составила 96,6 мкм.

Таким образом, у пациентки, которой была выполнена повторно АуТМСК, отмечается положительная динамика ОКТ в виде значительно-го увеличения толщины СНВС (рис. 6*).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, среди пациентов, которым была выполнена АуТМСК, имели место стабилизация либо положительная динамика неврологического статуса, меньшее количество активных и «свежих» очагов демиелинизации по сравнению с контрольной группой, а также увеличение толщины СНВС. Сопоставление результатов однократной и повторной АуТМСК выявило большую эффективность повторной трансплантации по сравнению с однократной. Об этом свидетельствуют статистически достоверно лучшая динамика неврологического статуса и более выраженное снижение количества очагов, накапливающих парамагнетик (омнискан) в данной группе пациентов по сравнению с пациентами, у которых трансплантация проводилась один раз.

В исследовании, проводившемся в Российской Федерации, аутологичные МСК вводились 8 пациентам с РС путем короткой внутривенной инфузии в дозе 2,0x10⁶/кг массы тела повторно с интервалом 30 дней в течение от 4 до 8 месяцев. Период наблюдения составил 12 месяцев.

* Рис. 6 см. на цветной вклейке после стр. 305.

6 (75,0%) из 8 обследованных имели отчетливую положительную симптоматику в виде снижения выраженности инвалидизации на 0,5–1,0 балла по шкале EDSS с полным отсутствием признаков прогрессирования заболевания [2].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований свидетельствуют о стабилизации или снижении неврологического дефицита при применении повторной АуТМСК на протяжении до 12 месяцев. Для трансплантации использовалась дозировка от 1 млн клеток/кг до 2 млн клеток/кг, причем преимущество применения МСК в дозе 2 млн клеток/кг по сравнению с 1 млн клеток/кг установлено не было. Эффективность повторного введения аутологичных МСК интратекально до настоящего времени не изучена, но их однократная трансплантация данным способом в соответствии с результатами большинства исследований не продемонстрировала лучшего результата по сравнению с внутривенным введением. Кроме того, инфузия МСК характеризуется хорошей переносимостью и лишь в отдельных случаях были зарегистрированы легкие побочные реакции (преходящие кожные высыпания; ОРВИ, гастроэнтерит с легким течением заболевания), в то время как их использование интратекально чревато более частыми и серьезными осложнениями (головная боль, менингизм, корешковый синдром, описан случай менингита) [9, 10].

Одной из центральных проблем повторной трансплантации МСК является решение вопроса о временном интервале между их введением. Вместе с тем имеются только немногочисленные исследования, которые освещают эту тему [2, 4, 6].

Продолжительность иммуномодулирующего действия МСК определяется тем, что они транслируют свои функции (способность ингибировать пролиферацию и цитолитическую активность натуральных киллеров и др.) другим клеткам, в частности регуляторным Т-лимфоцитам, что определяет эффективность клеточной терапии даже после лизиса МСК. Исследование иммунного статуса пациентов с РС в динамике показало, что к 9 месяцу после АуТМСК отмечается снижение количества циркулирующих Т-клеток памяти и супрессии миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов, что свидетельствует об антипролиферативном действии МСК *in vivo*, которое увеличивает их иммуномодулирующий эффект. Результаты мониторинга (по данным ОКТ) толщины СПНВ у пациентов с РС указывают на наличие нейропротекторного влияния аутологичных МСК спустя 12 месяцев после их инфузии [4, 6]. Следовательно, с учетом указанных межклеточных взаимодействий, в наиболее полной степени иммуномодулирующий и нейропротекторный эффекты трансплантации аутологичных МСК развиваются к 9–12 месяцу после инфузии и их повторное введение целесообразно осуществлять через указанный интервал времени.

Развитие перспективного направления клеточной иммунотерапии основывается на использовании иммуномодулирующих и нейропротективных свойств МСК. Способность МСК оказывать регуляторное или супрессорное влияние на аутоиммунный процесс и, вероятно, вызывать ремиелинизацию позволяет рассматривать их введение в качестве



нового метода патогенетической терапии РС. Двойственная природа МСК способствует приспособлению этих клеток к невральному микроокружению при патологическом процессе и проявлению не только иммуномодулирующей, но и нейропротективной активности. Итак, полученные результаты указывают на клиническую эффективность АуТМСК и целесообразность использования повторного введения аутологических МСК пациентам с рецидивно-ремиттирующей формой РС.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Meamar R, Nematollahi S, Dehghani L. (2016) The role of stem cell therapy in multiple sclerosis: An overview of the current status of the clinical studies. *Adv Biomed Res.*, Mar 16;5:46. doi: 10.4103/2277-9175.178791. Review.
2. Odinak M.M., Bisaga G.N., Novitskii A.V. (2011) Transplantatsiya mezenhimal'nih stvolovih kletok pri rasseyannom skleroze [Transplantation of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova. Rasseyannii skleroz.*, no 2, pp. 72–76.
3. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. (2013) Mesenchymal stem cells as treatment for MS – progress to date. *Mult Scler.*, Apr;19(5):515–9.
4. Fedulov A.S., Borisov A.V., Zafranskaya M.M., Ionova. O.A. (2014) Dinamika neurologicheskogo statusa patsientov s rasseyannim sklerozom posle AuTMSK. Aktual'nie problemi i dostizheniya v meditsine [Dynamics of the neurological status of patients with multiple sclerosis after AuTMSK. Actual problems and achievements in medicine]. *ITSRON, g. Samara*, pp. 75–77.
5. Fedulov A.S., Borisov A.V., Zafranskaya M.M., Karapetyan G.M., Krivenko S.I., Andreeva M.A. (2014) Dinamika neurovizualizatsionnih parametrov u patsientov s rasseyannim sklerozom, shodivshih AuTMSK. Aktual'nie problemi i dostizheniya v meditsine [Dynamics of neuroimaging parameters in patients with multiple sclerosis who have undergone AuTMSK. Actual problems and achievements in medicine]. *ITSRON, g. Samara*, pp. 72–78.
6. Zafranskaya M.M., Fedulov A.S., Demidchik YU.E. (2016) *Effekt mezenhimal'nih stvolovih kletok pri kletochnoi terapii rasseyannogo skleroza* [The effect of mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis]. Minsk.
7. Connick P, Kolappan M, Crawley C. (2012) Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol.*, Feb; 11(2): 150–156.
8. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B. (2013) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Mult Scler.*, Apr;19(5):515–9.
9. Karussis D, Petrou P, Kassis I. (2013) Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases. *J Neurol Sci.*, Jan 15;324(1–2):1–9.
10. Sahraian M.A., Bonab M.M., Karvigh S.A. (2014) Intrathecal Mesenchymal stem cell therapy in Multiple Sclerosis: a follow-up study for five years after. *Injection Archives of Neuroscience*, July; 1(2): 71–75.

Поступила/Received: 27.04.2017

Контакты/Contacts: fedulov@tut.by