

## ПАРАМЕТРЫ ПОХОДКИ КРЫС С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ II ТИПА



А.-М. В. Ерофеева

Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**Введение.** Изучение роли каннабиноидных рецепторов  $CB_2$  в эффективности мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани (ЖТ) на предотвращение нарушений двигательной активности пораженной конечности позволит углубить понимание механизмов эффектов МСК при их локальном введении.

**Цель.** Оценка влияния фармакологической стимуляции каннабиноидных рецепторов  $CB_2$  при трансплантации МСК ЖТ на изменения параметров походки крыс в модели периферической нейропатии.

**Материал и методы.** У 40 крыс-самцов Wistar моделировали периферическую нейропатию методом перерезки седалищного нерва. На седьмые сутки эксперимента проведена трансплантация МСК ЖТ без дополнительных воздействий, на фоне предварительной инъекции агониста  $CB_2$  рецепторов в мягкие ткани области перерезки седалищного нерва, а также после инкубации МСК ЖТ с данным агонистом. В течение 90 суток проведен детальный анализ походки с помощью установки CatWalk XT 10.6.

**Результаты.** Трансплантация МСК ЖТ ускорила восстановление динамических параметров походки, функционального седалищного индекса и нивелировала развитие нарушений статических параметров походки у крыс после перерезки седалищного нерва. Статистически значимых различий анализируемых параметров походки в группах исследования, в которых выполнена трансплантация МСК ЖТ, не выявлено.

**Выводы.** Фармакологическая стимуляция  $CB_2$ -рецепторов не усиливала и не подавляла влияние МСК ЖТ на скорость восстановления параметров походки у экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, нейропатическая боль, седалищный нерв, каннабиноидные рецепторы, анализ походки, catwalk

**Для цитирования:** Ерофеева, А.-М. В. Параметры походки крыс с периферической нейропатией при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и фармакологической стимуляции каннабиноидных рецепторов II типа / А.-М. В. Ерофеева // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2023. Т. 21, № 4. С. 388-392. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2023-21-4-388-392>.

### Введение

Периферическая нейропатическая боль – это хронический болевой синдром, вызванный повреждением или дисфункцией периферических звеньев соматосенсорной нервной цепочки [1]. Распространенность нейрогенных болевых синдромов варьирует в пределах 7-20% жителей Европы [1] и 30-50% населения планеты [2]. Один из относительно новых методов терапии повреждений периферических нервов – трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [3]. Использование МСК для терапии повреждений периферических нервов способствует устранению болевого синдрома и восстановлению двигательной активности, их эффективность показана в ряде недавних исследований [4-6]. Каннабиноидные рецепторы  $CB_2$  участвуют в торможении воспалительной реакции, вызванной повреждением нерва [7], вместе с тем могут быть одними из посредников репаративных эффектов МСК [8]. Исследование влияния стимуляции  $CB_2$ -рецепторов позволит оценить степень усиления эффективности МСК жировой ткани (ЖТ) при их трансплантации в область повреждения периферического нерва.

**Цель** исследования – оценка влияния фармакологической стимуляции каннабиноидных рецепторов  $CB_2$  при трансплантации МСК ЖТ на

изменения параметров походки крыс в модели периферической нейропатии.

### Материал и методы

Исследование проведено на 40 крысах-самцах Wistar с исходной массой 180-200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария Института физиологии НАН Беларуси с циклом день/ночь 12/12 ч и свободным доступом к воде и пище. Эксперименты проводили в утреннее время с соблюдением принципов, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 02.02.2023).

Методом рандомизации животных разделили на группы: 1 – крысы с моделью периферической нейропатии (НП) без лечения – НП без лечения (n=10); 2 – крысы с моделью НП и трансплантацией аллогенных МСК ЖТ в область повреждения седалищного нерва – НП+МСК ЖТ (n=10); 3 – крысы с моделью НП и трансплантацией МСК ЖТ при фармакологической стимуляции  $CB_2$  рецепторов в мягких тканях области повреждения седалищного нерва – НП+AM1241+МСК ЖТ (n=10); 4 – крысы с моделью НП и трансплантацией МСК ЖТ, которым осуществили фарма-

кологическую стимуляцию  $CB_2$  рецепторов при предварительном инкубировании с селективным антагонистом – НП+пре-AM1241-МСК ЖТ (n=10).

Модель периферической НП формировали путем иссечения участка седалищного нерва 5 мм на уровне верхней трети бедра левой задней конечности крыс по методу Jaggi et al. [9] под общей (тиопентал натрия, 20 мг/кг внутривенно) и местной анестезией (1% раствор лидокаина гидрохлорида, 50 мкл/внутримышечно). На седьмые сутки после операции экспериментальным группам вводили МСК ЖТ в дозе  $1 \times 10^6$  клеток/кг, предварительно выделенные из жировой ткани интактных крыс по ранее описанной методике [10]. Для стимуляции  $CB_2$ -рецепторов на МСК ЖТ клетки инкубировали с агонистом AM1241 (Cayman-Chemical, США) в концентрации 2  $\mu$ M. Активацию  $CB_2$  рецепторов в мягких тканях области повреждения седалищного нерва осуществляли путем внутримышечного введения AM1241 в дозе 1 мг/кг за 15 минут до трансплантации МСК ЖТ.

На 0, 7, 14, 21, 28, 60 и 90-е сутки исследования у экспериментальных животных проводили детальный анализ походки с использованием аппаратно-программного комплекса CatWalk XT версии 10.6 (Noldus, Нидерланды). Видеозапись пробежек каждого животного регистрировали

по 3 раза с максимальным уровнем вариабельности шага 60% и длительности до 5,00 с [4-5]. Статические и динамические параметры походки, за исключением функционального седалищного индекса (ФСИ), рассчитывали для травмированной задней лапы в процентах от контралатеральной задней лапы.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием статистического пакета STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Сравнение показателей осуществляли методом дисперсионного анализа повторных измерений с последующими апостериорными сравнениями методом наименьшей значимой разницы. Вывод о статистической значимости различий делали при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В случае группы НП без лечения с седьмых суток эксперимента отмечено снижение длительности фазы опоры травмированной лапы до 91,0% от контралатеральной конечности ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными на нулевые сутки; рабочего цикла – до 95,4% ( $p < 0,001$ ) (рис. 1а, 1б). Вместе с тем длительность фазы переноса не изменялась статистически значимо ( $p > 0,05$ ). К 21-м суткам исследования наступало адаптационное восстановление длительности фазы опоры и рабочего цикла (рис. 1а, 1б).

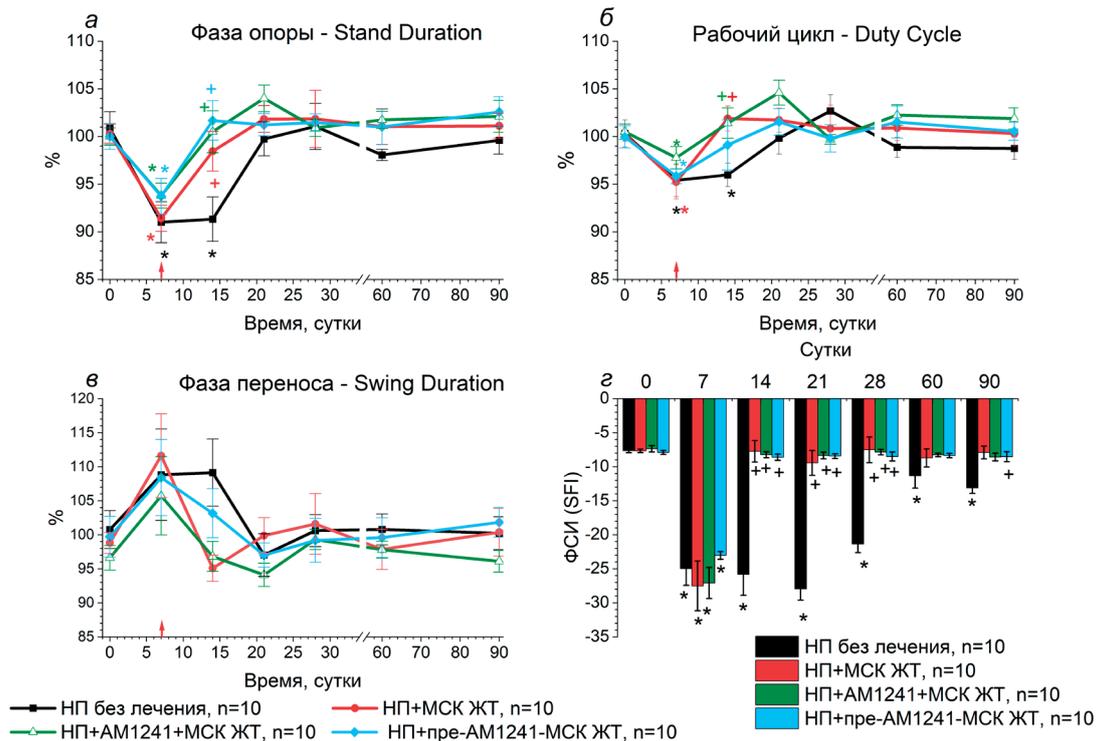


Рисунок 1. – Динамические параметры походки (а, б, в) и функциональный седалищный индекс (г) у крыс после моделирования НП и введения МСК ЖТ на фоне фармакологической стимуляции  $CB_2$  рецепторов агонистом AM1241.

Стрелкой обозначено время трансплантации; \* –  $p < 0,05$  к значениям до моделирования НП; + –  $p < 0,05$  к НП без лечения; # –  $p < 0,05$  к группе НП+МСК ЖТ; ! –  $p < 0,05$  к группе НП+AM1241+МСК ЖТ

Figure 1. – Dynamic gait parameters (a, b, c) and functional sciatic index (d) in rats after NP modeling and administration of ADMSCs upon pharmacological stimulation of  $CB_2$  receptors by the AM1241 agonist. The arrow indicates the time of transplantation; \* -  $p < 0.05$  to the values before the modeling of NP; + -  $p < 0.05$  to the NP group without treatment; # -  $p < 0.05$  to NP+ADMSC; ! -  $p < 0.05$  to the group NP+AM1241+ADMSC

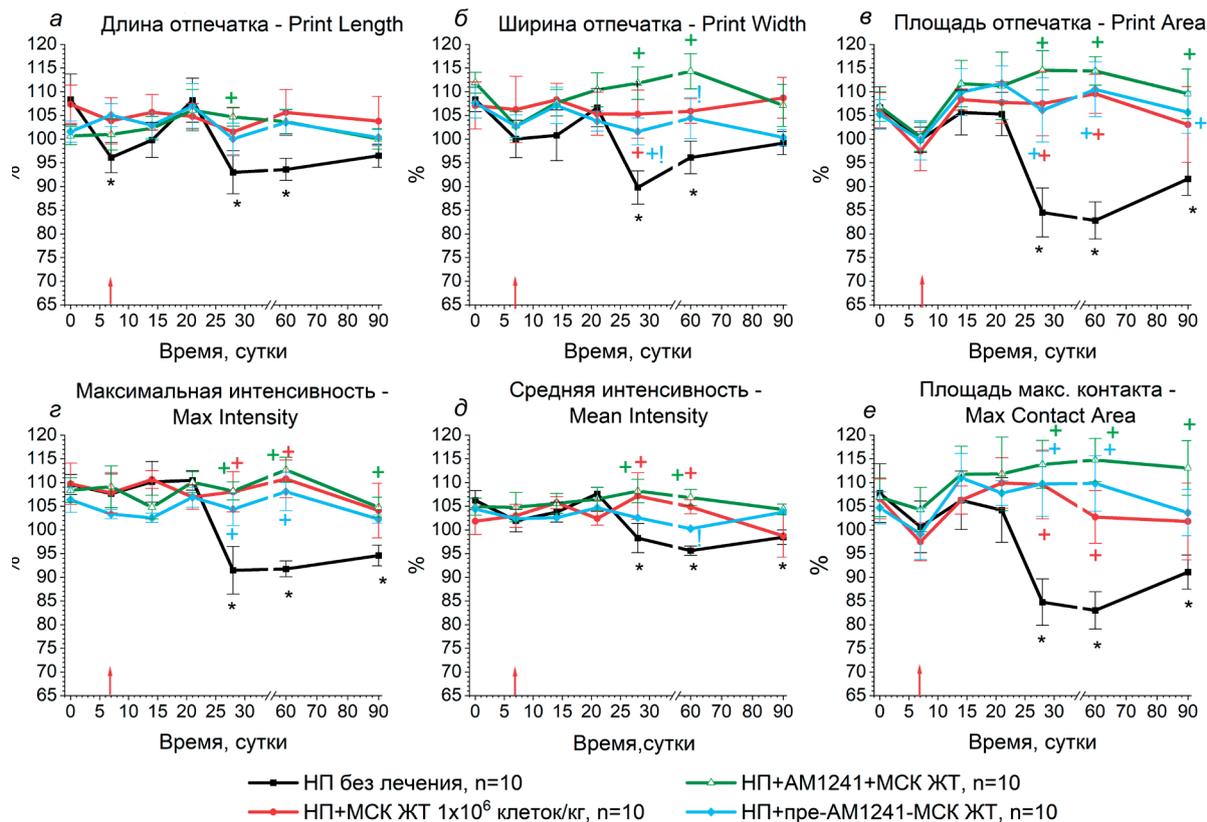
ФСИ снизился в группе НП без лечения на седьмые сутки исследования в 2,3 (на 229,9%) раза ( $-7,65 \pm 0,30$  до  $-24,99 \pm 2,45$ ,  $p < 0,001$  к нулевым суткам; рис. 1 г). К 90-м суткам восстановления ФСИ до исходного уровня не отмечено ( $p < 0,01$ , рис. 1 г).

После введения МСК ЖТ в дозе  $1 \times 10^6$  клеток/кг в область повреждения седалищного нерва наблюдали ускорение восстановления длительности фазы опоры к 14-м суткам эксперимента (до 98,4%,  $p > 0,05$  к нулевым суткам,  $p < 0,05$  к группе НП без лечения) и рабочего цикла (до 101,9%  $p > 0,05$  к нулевым суткам,  $p < 0,005$  к группе НП без лечения; рис. 1а, 1б), а также ФСИ (до  $-7,75 \pm 1,57$ ,  $p > 0,05$  к нулевым суткам,  $p < 0,001$  к группе НП без лечения). Далее на протяжении исследования не отмечено изменений данных параметров от значений на нулевые сутки.

Трансплантация МСК ЖТ через 15 минут после внутримышечного введения AM1241 в область повреждения седалищного нерва (группа НП+AM1241+МСК ЖТ) приводила к восстановлению длительности фазы опоры до 100,5%, рабочего цикла – до 101,4%, а также ФСИ – до  $-8,25 \pm 0,44$  (во всех случаях  $p > 0,05$  к нулевым суткам,  $p < 0,001$  к группе НП без лечения; рис. 1а, 1б, 1г).

Трансплантация пре-AM1241-МСК ЖТ аналогичным образом ускоряла к 14-м суткам исследования восстановление длительности фазы опоры до 101,7% ( $p > 0,05$  к нулевым суткам,  $p < 0,001$  к группе НП без лечения), рабочего цикла – до 99,1% ( $p > 0,05$  к нулевым суткам и к группе НП без лечения) и ФСИ – до  $-8,61 \pm 0,47$  ( $p > 0,05$  к нулевым суткам,  $p < 0,001$  к группе НП без лечения; рис. 1а, 1б, 1г). На фоне фармакологической стимуляции  $CB_2$ -рецепторов по сравнению с трансплантацией только МСК ЖТ, а также при сравнении обоих способов стимуляции  $CB_2$ -рецепторов не отмечено статистически значимых различий вышеуказанных параметров походки.

В отношении статических параметров походки (рис. 2а-е), в группе НП без лечения к 28-м суткам исследования длина отпечатка травмированной конечности сократилась по сравнению с данными на нулевые сутки до 93,6% ( $p < 0,02$ ; рис. 2а), ширина отпечатка – до 96,1% ( $p < 0,001$ ; рис. 2б). Площадь отпечатка ипсилатеральной конечности снизилась на 20,9% (до 84,5%,  $p < 0,001$ ; рис. 2в), площадь максимального контакта – на 21,4% (до 84,7%,  $p < 0,005$ ; рис. 2е), максимальная интенсивность отпечатка



**Рисунок 2. – Изменения статических параметров походки (а-е) у крыс после моделирования НП, трансплантации МСК ЖТ на фоне фармакологической стимуляции  $CB_2$  рецепторов агонистом AM1241. Стрелкой обозначено время трансплантации; \* -  $p < 0,05$  к значениям до моделирования НП; + -  $p < 0,05$  к группе НП без лечения; # -  $p < 0,05$  к НП+МСК ЖТ; ! -  $p < 0,05$  к группе НП+AM1241+МСК ЖТ**

**Figure 2. – Changes in the static gait parameters (a-f) in rats after modeling of NP, transplantation of ADMSCs upon pharmacological stimulation of  $CB_2$  receptor agonist AM1241. The arrow indicates the time of transplantation; \* -  $p < 0.05$  to the values before the modeling of NP; + -  $p < 0.05$  to the NP group without treatment; # -  $p < 0.05$  to NP+ADMSC; ! -  $p < 0.05$  to the group NP+AM1241+ADMSC**

– на 16,5% (до 91,5%,  $p < 0,001$ ; рис. 2г), и средняя интенсивность – на 7,8% (до 98,3%,  $p < 0,01$ ; рис. 2д). Далее по 90-е сутки эксперимента не отмечено тенденции к восстановлению статических параметров походки.

После однократного введения исследуемой дозы МСК ЖТ в область перерезки седалищного нерва на протяжении исследования не наблюдали статистически значимых изменений статических параметров походки (рис. 3а-е). Относительно группы НП без лечения, наблюдали увеличение площади и площади максимального контакта отпечатка, а также параметров интенсивности на 28-е сутки ( $p < 0,005$ ) и 60-е сутки эксперимента ( $p < 0,02$ ).

В группе НП+АМ1241+МСК ЖТ статистически значимых изменений статических параметров походки по сравнению с нулевыми сутками не выявлено (рис. 2а-е). По сравнению с группой НП без лечения отмечено увеличение длины отпечатка на 28-е сутки исследования до 104,7% ( $p < 0,05$ ; рис. 2а); ширины отпечатка и средней интенсивности на 28 и 60-е сутки эксперимента ( $p < 0,002$ ; рис. 2б, 2д); максимальной интенсивности отпечатка, площади отпечатка и площади максимального контакта отпечатка – на 28-е ( $p < 0,001$ ), 60-е ( $p < 0,001$ ) и 90-е сутки эксперимента ( $p < 0,05$ , рис. 2в, 2г, 2е). По сравнению с группой НП+МСК ЖТ не отмечено статистически значимых различий анализируемых статических параметров походки.

После трансплантации пре-АМ1241-МСК ЖТ также не наблюдали нарушений статических

параметров походки относительно значений до моделирования НП (рис. 2а-е). По сравнению с группой НП без лечения отмечено увеличение ширины отпечатка на 28-е сутки исследования ( $p < 0,05$ ; рис. 2б); максимальной интенсивности – на 28-е ( $p < 0,005$ ) и 60-е сутки эксперимента ( $p < 0,001$ ; рис. 2г); площади максимального контакта – на 28-е ( $p < 0,002$ ) и 60-е сутки эксперимента ( $p < 0,001$ ; рис. 2е); площади отпечатка – на 28-е ( $p < 0,002$ ), 60-е ( $p < 0,001$ ) и 90-е сутки эксперимента ( $p < 0,05$ ; рис. 2в).

При сравнении обоих способов стимуляции СВ<sub>2</sub>-рецепторов в группе НП+АМ1241+МСК ЖТ отмечено увеличение ширины отпечатка на 28-е и 60-е сутки эксперимента ( $p < 0,05$ ; рис. 2б), а также средней интенсивности на 60-е сутки эксперимента ( $p < 0,05$ ; рис. 2д) относительно трансплантации пре-АМ1241-МСК ЖТ.

### Заключение

На основании полученных результатов можно заключить, что фармакологическая стимуляция СВ<sub>2</sub>-рецепторов как на мембранах МСК ЖТ, так и в области перерезки седалищного нерва не усиливала и не подавляла влияние МСК ЖТ на скорость восстановления параметров походки у крыс после перерезки седалищного нерва. Вместе с тем стимуляция СВ<sub>2</sub>-рецепторов в мягкой тканях области повреждения седалищного нерва приводила к более выраженному восстановлению статических параметров походки и может рассматриваться в качестве способа усиления эффективности МСК ЖТ.

### Литература

1. Bouhassira, D. Neuropathic pain: definition, assessment and epidemiology / D. Bouhassira // *Rev. Neurol.* – 2019. – Vol. 175, № 1-2. – P. 16-25. – doi: 10.1016/j.neurol.2018.09.016.
2. Neuropathic pain / L. Colloca [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primer.* – 2017. – Vol. 3. – Art. 17002. – doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
3. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches / E. Cavalli [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 33. – P. 2058738419838383. – doi: 10.1177/2058738419838383.
4. Ерофеева, А.-М. В. Влияние фармакологической блокады каннабиноидных рецепторов 1 типа на эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальной периферической нейропатии / А.-М. В. Ерофеева // *Вестник Витебского государственного медицинского университета.* – 2022. – Т. 21, № 6. – С. 46-57. – doi: 10.22263/2312-4156.2022.6.47. – edn: LZJBSO.
5. Ерофеева, А.-М. В. Влияние трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на ноцицептивные реакции и параметры походки крыс с экспериментальной периферической нейропатией / А.-М. В. Ерофеева, А. Ю. Молчанова // *Вестні Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сeryя медыцынскіх навук.* – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 404-412. – doi: 10.29235/1814-6023-2022-19-4-404-412. – edn: ZPSVFT.
6. Evaluation of Functional Recovery in Rats After Median Nerve Resection and Autograft Repair Using

Computerized Gait Analysis / J. C. Heinzel [et al.] // *Front Neurosci.* – 2021. – Vol. 14. – Art. 93545. – doi: 10.3389/fnins.2020.593545.

7. Peripheral sensory neuron CB2 cannabinoid receptors are necessary for both CB2-mediated antinociceptive efficacy and sparing of morphine tolerance in a mouse model of anti-retroviral toxic neuropathy / L. M. Carey [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2023. – Vol. 187. – Art. 106560. – doi: 10.1016/j.phrs.2022.106560.
8. The endocannabinoid receptors CB1 and CB2 affect the regenerative potential of adipose tissue MSCs / T. Ruhl [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2020. – Vol. 389, № 1. – Art. 111881. – doi: 10.1016/j.yexcr.2020.111881.
9. Jaggi, A. S. Animal models of neuropathic pain / A. S. Jaggi, V. Jain, N. Singh // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 25, № 1. – P. 1-28. – doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.
10. Морфофункциональное состояние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс в условиях подавления окислительного стресса / И. Б. Василевич [и др.] // *Вестні Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сeryя біялагічных навук.* – 2014. – № 2. – С. 82-88.

### References

1. Bouhassira D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Rev Neurol (Paris)*. 2019;175(1-2):16-25. doi: 10.1016/j.neurol.2018.09.016.
2. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17002. doi: 10.1038/nrdp.2017.2.

3. Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2019;33:2058738419838383. doi: 10.1177/2058738419838383.
4. Erofeeva AMV. The impact of pharmacological blocking of type I cannabinoid receptors on the effectiveness of mesenchymal stem cell transplantation in experimental peripheral neuropathy. *Vitebsk Medical Journal*. 2022;21(6):46-57. doi: 10.22263/2312-4156.2022.6.47. edn: LZJBSO. (Russian).
5. Erofeeva AMV, Molchanova AYu. Impact of adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cell transplantation on nociceptive reactions and gait parameters in rats with experimental peripheral neuropathy *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*. 2022;19(4):404-412. doi: 10.29235/1814-6023-2022-19-4-404-412. edn: ZPSVFT. (Russian).
6. Heinzel JC, Oberhauser V, Keibl C, Swiadek N, Längle G, Frick H, Kolbenschlager J, Prahm C, Grillari J, Hercher D. Evaluation of Functional Recovery in Rats After Median Nerve Resection and Autograft Repair Using Computerized Gait Analysis. *Front Neurosci*. 2021;14:593545. doi: 10.3389/fnins.2020.593545.
7. Carey LM, Xu Z, Rajic G, Makriyannis A, Romero J, Hillard C, Mackie K, Hohmann AG. Peripheral sensory neuron CB2 cannabinoid receptors are necessary for both CB2-mediated antinociceptive efficacy and sparing of morphine tolerance in a mouse model of anti-retroviral toxic neuropathy. *Pharmacol Res*. 2023;187:106560. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106560.
8. Ruhl T, Karthaus N, Kim BS, Beier JP. The endocannabinoid receptors CB1 and CB2 affect the regenerative potential of adipose tissue MSCs. *Exp Cell Res*. 2020;389(1):111881. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.111881.
9. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011;25(1):1-28. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.
10. Vasilevich IB, Pinchuk SV, Lobanok ES, Volotovskii ID. Morphology-function state of rat adipose-derived mesenchymal stem cells under the suppression of oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*. 2014;(2):82-88. (Russian).

## GAIT PARAMETERS OF RATS WITH PERIPHERAL NEUROPATHY AFTER MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION AND PHARMACOLOGICAL STIMULATION OF TYPE II CANNABINOID RECEPTORS

A.-M. V. Yerofeyeva

*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

*Background.* The study of the role of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors in the effectiveness of adipose-derived (AD) mesenchymal stem cells (MSCs) in preventing motor activity disorders in the affected limb will deepen understanding of the mechanisms of MSCs effects when administered locally.

*Aim.* To evaluate the effect of pharmacological stimulation of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors during transplantation of AD MSCs on changes in gait parameters in rats in a model of peripheral neuropathy.

*Material and methods.* In 40 male Wistar rats peripheral neuropathic pain was modeled by sciatic nerve transection. On the 7th day after NP modeling, AD MSCs transplantation was performed without additional interventions upon the pharmacological stimulation of CB<sub>2</sub> receptors in the area of sciatic nerve transection, as well as after stimulation of CB2 receptors on the AD MSCs membranes during pretreatment. Within 90 days a detailed analysis of the gait was carried out using the CatWalk XT 10.6.

*Results.* Transplantation of AD MSCs accelerated the recovery of dynamic gait parameters, as well as sciatic functional index, and abolished the development of static gait disturbances in rats after sciatic nerve transection. Significant differences in the analyzed gait parameters in the study groups with AD MSCs transplantation were not found.

*Conclusion.* Pharmacological stimulation of CB<sub>2</sub> receptors did not enhance or suppress the effect of AD MSCs on the rate of recovery of gait parameters in experimental animals.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, neuropathic pain, sciatic nerve, cannabinoid receptors, gait analysis, catwalk

**For citation:** Yerofeyeva A-MV. Gait parameters of rats with peripheral neuropathy after mesenchymal stem cell transplantation and pharmacological stimulation of type II cannabinoid receptors. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2023;21(4): 388-392. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2023-21-4-388-392>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.  
**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

**Об авторе / About the author**  
Ерофеева Анна-Мария Вадимовна / Yerofeyeva Anna-Maria, e-mail: amyerofeyeva@zoho.eu