

ПОЛУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ЭКТОМЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК СО СВОЙСТВАМИ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПУЛЬПЫ ПОСТОЯННЫХ ЗУБОВ

И.И. Сагитов¹, А.К. Шафигуллина², Г.Т. Салеева¹, М.О. Гомзикова²,
А.А. Ризванов², А.П. Киясов²

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет Казань, Россия

Deriving population of ectomesenchymal cells with properties of stem cells and progenitor cells from pulp of permanent teeth

I.I. Sagitov¹, A.K. Shafigullina², G.T. Saleeva¹, M.O. Gomzikova², A.A. Rizvanov², A.P. Kiasov²

¹ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

За последние годы были проведены многочисленные исследования, авторы которых утверждают, что им удалось выделить стволовые клетки пульпы зубов. Большинство клеток, которые были описаны до этого как стволовые клетки пульпы зуба, представляли собой не гомогенную популяцию клеток, а смесь мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). В отличие от ММСК костного мозга или жировой ткани, одонтобласты относятся к клеткам так называемой эктомезенхимы. Как показали исследования, ранее проведенные нашей научной группой, одонтобластам присущ ряд признаков, характерных для эктодермальных клеток, такие как экспрессия эпителиального мембранного антигена и цитокератина 18.

Цель работы — получить из пульпы постоянных зубов популяции эктомезенхимных клеток со свойствами стволовых и прогениторных и охарактеризовать их фенотип *in vitro*.

В качестве материала исследования использовали пульпу постоянных зубов пациентов в возрастной категории 18–29 лет, удаленных по ортодонтическим показаниям (всего 15 зубов). В стерильных условиях пульпу измельчали и переносили в шестилуночный планшет. Фенотип полученных клеток исследовали методом иммуноцитохимического окрашивания антителами к эпителиальному мембранному антигену, C-kit (маркер стволовых и прогениторных клеток), цитокератину 19, эпителиальному специфическому антигену, α -гладкомышечному актину, десмину, виментину, ядерному антигену пролиферирующих клеток и Bcl-2 (антиапоптотический протеин). Иммунофенотип полученных клеток определяли с помощью метода проточной цитофлуориметрии с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител к поверхностным антигенам клеток человека. Была показана выраженная экспрессия C-kit и виментина на всех пассажах; около половины клеток давали положительную реакцию с антителами к эпителиальному мембранному антигену на всех пассажах. Клетки 1 и 2 пассажей характеризовались стойкой экспрессией цитокератина 18, которая постепенно снижалась и к 5 пассажу окрашивались лишь единичные клетки. Подтверждение экспрессии эпителиального мембранного антигена и цитокератина 18 было проведено методом иммуноблоттинга. Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что клетки, полученные нами из пульпы постоянных зубов человека, характеризуются следующим фенотипом: CD29⁺, CD90⁺, CD10⁺, CD54⁺, CD56⁺, CD166⁺ / CD14⁻, CD34⁻, CD45⁻.

Ключевые слова: дентин, одонтобласт, стволовые клетки пульпы зуба, эктомезенхимные клетки.

Одним из важных вопросов биологии развития, стоматологии и регенеративной медицины является проблема наличия в пульпе зуба стволовых клеток, потомки которых могут дифференцироваться в одонтобласты. Интерес к этому вопросу поддерживается тем, что за последние годы были проведены много-

Lately a lot of research has been focused on isolation of tooth stem cells. Our earlier studies showed that odontoblasts have a number of features typical for ectodermal cells, such as expression of epithelial membrane antigen (EMA) and cytokeratin 18. Aim: to obtain populations of ectomesenchymal cells from permanent teeth pulp with properties of stem and progenitor cells and characterize their phenotype *in vitro*.

The pulp of permanent teeth of 15 patients (age 18–29) was removed according to the orthodontic indications and used for stem cells isolation. The phenotype of derived cells was studied using the immunocytochemical staining method. Antibody staining for EMA, C-kit, cytokeratin 19, EMA, α SMA, Desmin, Vimentin, PCNA, Bcl-2. EMA and cytokeratin 18 expression was also confirmed by western blotting. The immunophenotype of obtained stem cells was determined by flow cytometry

Significant expression of C-kit and Vimentin was observed at all times of cultivation as demonstrated by immunocytochemical staining. About a half of cells expressed EMA on all passages. First and second passages cells were characterized by expression of cytokeratin 18 which gradually decreased and to the fifth passage only single cells were positively stained. EMA and cytokeratin 18 expression was confirmed by western blotting. Flow cytometry revealed that cells obtained by us from human permanent teeth pulp were positive for CD29, CD90, CD10, CD54, CD56, CD166 and negative for CD14, CD34, CD45.

Key words: odontoblast, dentin, dental pulp stem cell, ectomesenchymal cells.

численные исследования, в которых авторы утверждают, что им удалось выделить стволовые клетки пульпы зуба.

Стволовые клетки были получены из пульпы временных зубов [1], зубного зачатка [2] и его оболочки [3], пульпы постоянных зубов [4, 5]. Во всех этих

исследованиях были получены клетки с фенотипом мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). В частности, полученные клетки экспрессировали CD44, CD106 [4], STRO-1, CD146 [1], нестин и виментин [3]. При культивировании этих клеток с добавлениями различных ростовых факторов или факторов дифференцировки — костный морфогенетический белок (КМБ), фосфопротеин дентинного матрикса 1 [5], КМБ-2 [3], КМБ-4 [1] добивались дифференцировки клеток в остеогенном и адипогенном направлениях. Одонтогенная дифференцировка наблюдалась только в том случае, когда в культуру добавляли кислый фосфопротеин дентинного матрикса 1 [5] и КМБ-4 [1].

Большинство клеток, которые были описаны до этого как стволовые клетки пульпы зуба, представляли собой гетерогенную популяцию ММСК, источником развития которой является как мезодерма, так и нервный гребень [6].

В отличие от ММСК костного мозга или жировой ткани, одонтобласты не являются истинно мезенхимальными клетками и относятся к клеткам, так называемой, эктомезенхимы [7], то есть к производным мезенхимных клеток, берущих начало из региона нервного гребня. Кроме свойственных нервной ткани маркеров, в частности нестина [8], дифференцирующиеся одонтобласты экспрессируют цитокератин (ЦКР) 19 [9] — белок промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. Как показали ранее проведенные исследования, одонтобластам присущ ряд признаков, характерных для эктодермальных клеток, такие как экспрессия эпителиального мембранного антигена (ЭМА) и цитокератина 18. Более того, было обнаружено, что клетки промежуточного слоя, прилежащего к одонтобластам, наряду с эпителиальными маркерами экспрессируют ряд маркеров стволовых клеток, в частности C-kit — рецептор фактора стволовых клеток [10].

Цель работы — получить из пульпы постоянных зубов популяцию эктомезенхимных клеток со свойствами стволовых и прогениторных клеток и охарактеризовать их фенотип *in vitro*.

Материал и методы

В качестве материала исследования использовали пульпу постоянных зубов пациентов в возрастной категории 18–29 лет, удаленных по ортодонтическим показаниям (всего 15 зубов). Удаленные зубы помещали в раствор фосфатно-солевого буфера со смесью антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия)). Затем равномерной механической нагрузкой зубы раскалывали с помощью молоточка и свинцовой пластинки и в последующем осторожно стерильным пинцетом извлекали цельную пульпу. В стерильных условиях пульпу измельчали и переносили в шести-луночный планшет. Культивирование клеток было проведено в питательной среде αMEM (ПанЭко, Россия) с 10% содержанием сыворотки плодов коровы (FBS, ПанЭко, Россия), 100 ЕД/мл пенициллина-100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 146 мг L-глутамин (ПанЭко, Россия) в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂.

Каждые 2 дня проводили замену питательной среды. Всего было выполнено 5 пассажей. Фенотип полученных клеток исследовали на 3 день каждого пассажа методом иммуноцитохимического окрашивания. Окрашивание антителами к ЭМА, C-kit, и ЦКР19 проводили во всех пассажах, антителами к эпителиальному специфическому антигену (ЭСА), α-гладкомышечному актину (αГМА), десмину, виментину, ядерному антигену пролиферирующих клеток (ЯАПК) и Vcl-2 в 3 и 5 пассажах. Для проведения иммуноцитохимического анализа использовались антитела, которые представлены в таблице.

Антитела, использованные для анализа клеток, выделенных из пульпы постоянных зубов человека, методами иммуноцитохимии и проточной цитофлуориметрии

Антиген	Клон, разведение	Фирма-производитель
Виментин — белок промежуточных филаментов цитоскелета мезодермальных клеток	3B4, 1:75	Dako, Дания
Десмин — белок промежуточных филаментов цитоскелета мышечных клеток	D33, 1:30	Dako, Дания
α-ГМА — альфа-гладкомышечный актин, маркер миофибробластов, гладкомышечных клеток	1A4, 1:50	Dako, Дания
ЯАПК (PCNA) — ядерный антиген пролиферирующих клеток	PC10, 1:50	Dako, Дания
C-kit (CD117) — рецептор к фактору стволовых клеток, маркер стволовых и прогениторных клеток	T595, 1:400	Novocastra, Великобритания
ЭСА — эпителиальный специфический антиген	VU-1D9, 1:10	Novocastra, Великобритания
ЭМА — эпителиальный мембранный антиген	GF1.4, 1:100	Novocastra, Великобритания
ЦКР18 — белок промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток	DC10, 1:20	Dako, Дания

* — данные не предоставлены фирмой-производителем, окрашивание осуществляли согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Окончание таблицы

Антиген	Клон, разведение	Фирма-производитель
ЦКР19 – белок промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток	BA17, 1:20	Dako, Дания
Bcl2 – антиапоптотический протеин, маркёр стволовых и прогениторных клеток	124, 1:30	Dako, Дания
CD10 – FITC (маркер фибробластов, гранулоцитов, В-лимфоцитов, а также почечного эпителия)	–*	Sorbent
CD14 – FITC (маркер макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток)	–*	Sorbent
CD29 – APC (маркер лимфоцитов, моноцитов, а также один из маркеров МСК)	MAR4	BD, США
CD34 – Alexa 647 (маркер эндотелиальных клеток, стромальных клеток костного мозга)	ICO115	SantaCruz, США
CD45 – PE/Cy5 (маркер лейкоцитов, а также гематопозитических стволовых клеток)	HI30	BD, США
CD54 (ICAM-1) – Alexa 647 (маркер эндотелиальных клеток, лимфоцитов, моноцитов)	15.2	SantaCruz, США
CD56 (NCAM) – PE (маркер натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов, кроме того обнаружен на некоторых популяциях МСК, выделенных из костного мозга и пульпы молочных зубов [10])	–*	Sorbent
CD90 (Thy-1) – APC (маркер прогениторных клеток, один из маркеров МСК)	5E10	BD, США
CD166 (ALCAM) – PE (маркер активированных Т-клеток, моноцитов, фибробластов, эпителиальных клеток, а также один из маркеров МСК)	3A6	BD, США

Подтверждение экспрессии ЭМА и ЦКР18 было подтверждено методом иммуноблоттинга. Для этого в лунку геля наносили лизат клеток, полученных на 3, 5, 7 и 12 сут. культивирования. В качестве контроля при иммуноблоттинге использовали антитела к β-актину. Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью набора для хемилюминесцентной детекции белка Amersham TMECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE HealthcareBio – Sciences AB). Детекцию люминесценции проводили на приборе ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, Сингапур).

Иммунофенотипирование клеток, выделенных из пульпы постоянных зубов человека. Иммунофенотип полученных клеток определяли с помощью метода проточной цитофлуориметрии с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител к поверхностным антигенам клеток человека (см. табл.) как описано ранее [11]. Клетки с чашки Петри снимали с помощью 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Sigma, США). Отмывали один раз в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в режиме центрифугирования 1400 об./мин, 5 мин, при комнатной температуре. Ресуспендировали осадок клеток в ФСБ, добавляли конъюгированные с флуорохромами антитела и инкубировали 20 мин при комнатной температуре без доступа света. Далее клетки отмывали один раз в ФСБ, ресуспендировали осадок клеток в ФСБ. Анализ проводили на проточном цитометре Guava easyCyte 8HT (Millipore, США).

Результаты

На 3 сутки мы наблюдали миграцию клеток из культивируемых кусочков пульпы зуба на периферию. Вся периферия вокруг эксплантата на 12 день была занята клетками веретенообразной формы (рис. 1).

При проведении иммуноцитохимического окрашивания наблюдали в клетках экспрессию C-kit (рис. 2) и виментина (рис. 3) на всех сроках культивирования.

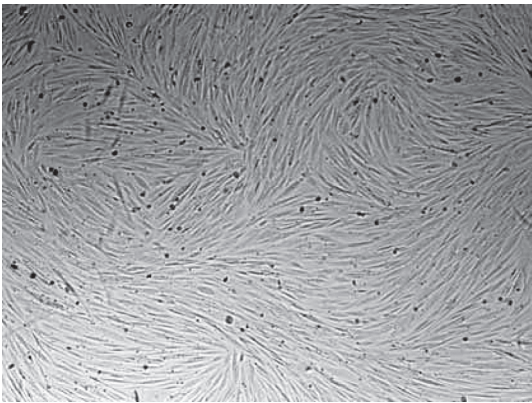


Рис. 1. Культура клеток, полученных из пульпы постоянных зубов человека, 12 сут. после эксплантации. Ув. ×10

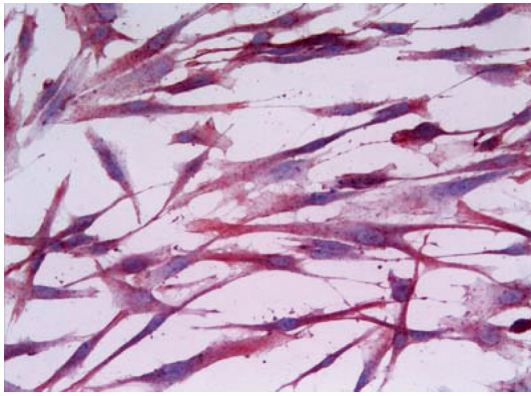


Рис. 2. Культура клеток пульпы зуба (3 пассаж), иммуноцитохимическая реакция с антителами к c-kit. Докраска: гематоксилин. Ув. $\times 20$

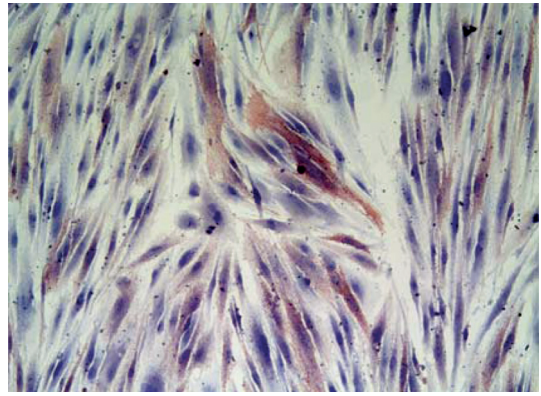


Рис. 4. Культура клеток пульпы зуба (3 пассаж), иммуноцитохимическая реакция с антителами к ЭМА. Докраска: гематоксилин. Ув. $\times 20$

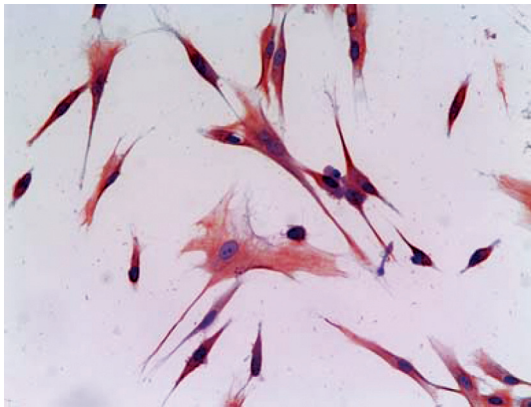
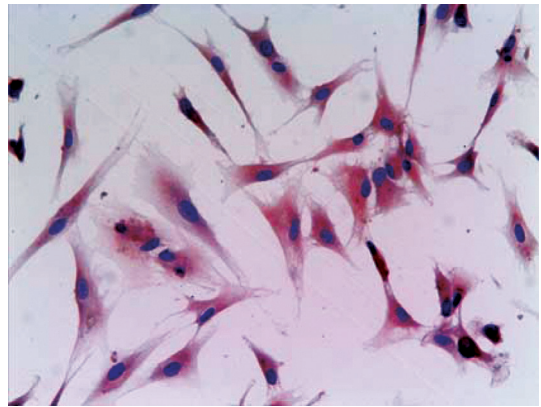


Рис. 3. Культура клеток пульпы зуба (3 пассаж), иммуноцитохимическая реакция с антителами к виментину. Докраска: гематоксилин. Ув. $\times 20$



5. Культура клеток пульпы зуба (3 пассаж), иммуноцитохимическая реакция с антителами к ЦКР19. Докраска: гематоксилин. Ув. $\times 20$

Примерно половина клеток иммуноцитохимически окрашивалась антителами к ЭМА на всех пассажах (рис. 4). Клетки 1 и 2 пассажа характеризовались стойкой экспрессией ЦКР18, однако количество окрашенных клеток с каждым последующим пассажем уменьшалось и к 5 пассажу окрашивались лишь единичные клетки. Подтверждение экспрессии ЭМА и ЦКР18 было проведено методом иммуноблоттинга. Клетки ранних пассажей не экспрессировали ЦКР19. Начиная с 3 пассажа, обнаруживались единичные ЦКР19 позитивные клетки, тогда как все клетки 5 пассажа экспрессировали ЦКР19 (рис. 5).

Окрашивание клеток против ЯАПК на 3 и 5 пассажах происходило лишь в единичных клетках. Иммуноцитохимическое окрашивание с антителами против ЭСА, α ГМА, десмина и Bcl-2 не выявило клеток, в которых присутствовали бы данные антигены. Подтверждение экспрессии ЭМА и ЦКР18 было проведено методом иммуноблоттинга (рис. 6).

Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что клетки, полученные нами из пульпы постоянных зубов человека, характеризуются следующим фенотипом: CD29⁺, CD90⁺, CD10⁺, CD54⁺, CD56⁺, CD166⁺ / CD14⁻, CD34⁻, CD45⁻ (рис. 7).

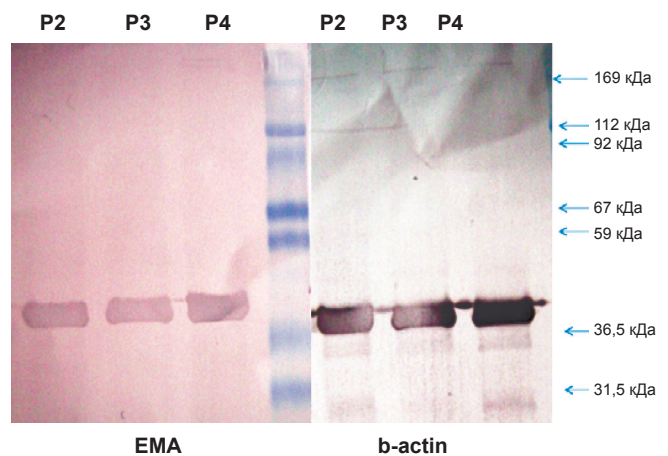


Рис. 6. Иммуноблоттинг. Контроль — антитела к β -актину

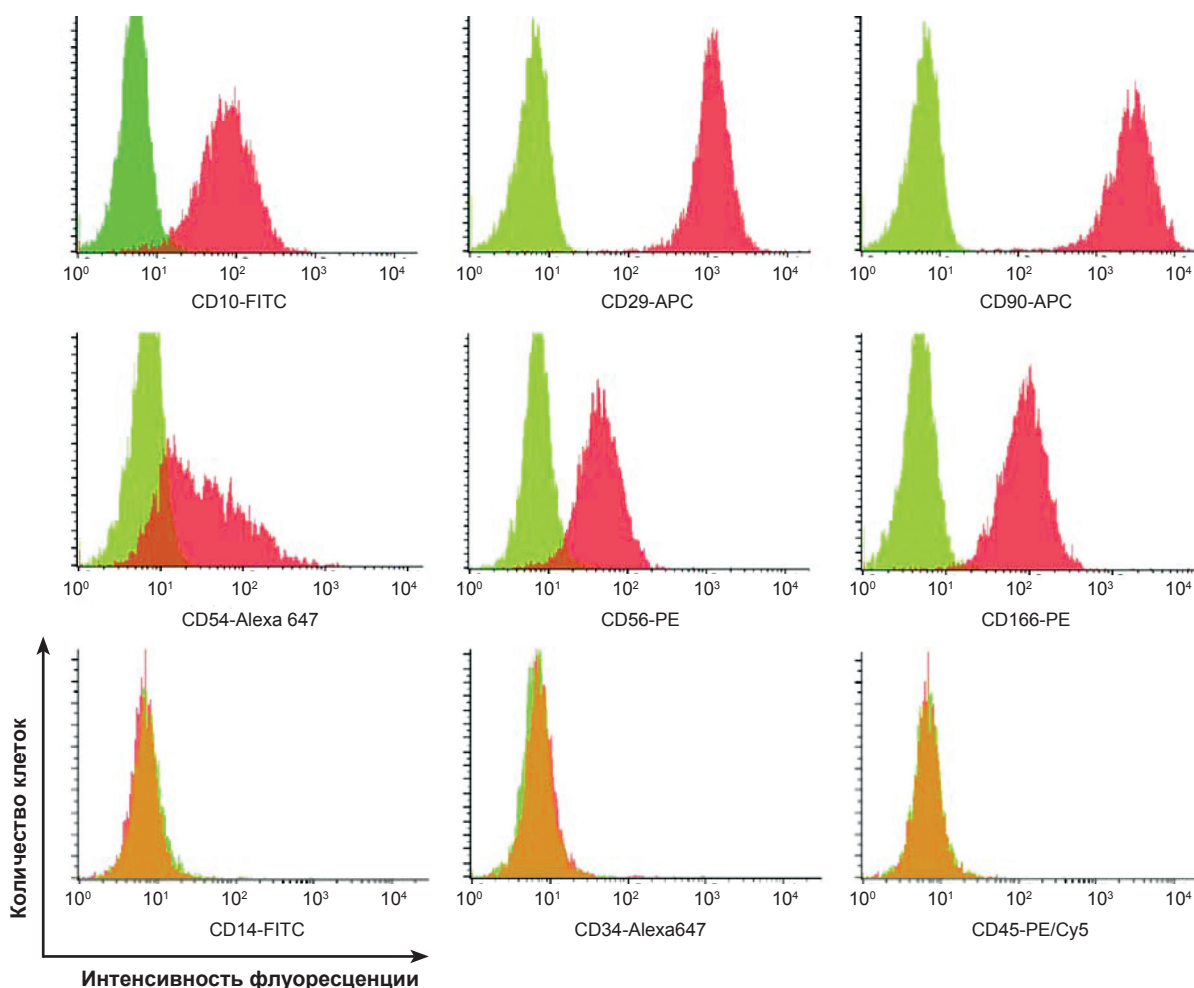


Рис. 7. Результат проточной цитофлуориметрии с определением антител CD10-FITC; CD29-APC; CD90-APC; CD54-Alexa 647; CD56-PE; CD166-PE; CD14-FITC; CD34-Alexa647; CD45-PE/Cy5; контроль — зеленые пики

Обсуждение

Пять различных типов клеток со свойствами стволовых клеток рассматриваются как потенциальные стволовые клетки пульпы зуба:

- 1) стволовые клетки, полученные из зубных зачатков;
- 2) стволовые клетки, полученные из пульпы молочных зубов;
- 3) стволовые клетки сверхкомплектных зубов;
- 4) стволовые клетки из апикального сосочка;
- 5) стволовые клетки, полученные из тканей периодонта.

Все эти типы клеток способны к самоподдержанию, обладают хорошим пролиферативным потенциалом и при изменении условий культивирования могут дифференцироваться в различных направлениях.

Стойкая экспрессия маркера стволовых клеток C-kit во всех пассажах является признаком того, что культивированные нами клетки обладают фенотипом стволовых и прогениторных клеток, и, следовательно, обладают пролиферативным потенциалом, могут быть использованы в тканевой инженерии и регенеративной медицине. C-kit — это рецептор, с которым связывается фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF). Их взаимодействие играет важную роль в пролиферации, дифференцировке и активации прогениторных клеток в различных биологических системах. Оба — и фактор, и его рецептор — были

обнаружены в клетках пульпы, причём есть клетки, которые одновременно экспрессируют и лиганд, и рецептор [12]. При помощи проточной цитометрии и сортировки клеток группа итальянских исследователей под руководством G. Парассио (1988) выделила из постоянных и молочных зубов популяцию c-kit⁺/CD34⁺/CD45⁻ клеток [13]. Эти клетки при создании определенных условий *in vitro* дифференцируются в остеобласты, мышечные трубочки, жировые или эндотелиальные клетки [14–19]. По своим свойствам и фенотипу полученные из пульпы клетки были очень близки к ММСК, которые в настоящий момент с успехом получают из самых различных органов и тканей.

На всех сроках нашего исследования мы наблюдали стойкое специфическое иммуноцитохимическое окрашивание полученных нами клеток из пульпы постоянных зубов человека к маркеру мезенхимальных клеток — виментину. Методом проточной цитофлуориметрии нами показано, что полученные клетки экспрессируют основные маркеры ММСК (CD29, CD56, CD90, CD166), кроме того, у полученных клеток отсутствует экспрессия маркеров не характерных для ММСК (CD14, CD34), а также маркера, характерного для гемопоэтических стволовых клеток (CD45) [20, 21]. При этом клетки оказались положительны в отношении маркеров, характерных для широкого круга клеток, в том числе для эпителиальных клеток (CD10, CD54).

Более интересным на наш взгляд является то, что часть клеток, высевшихся из пульпы зуба, на своей поверхности экспрессировали ЭМА, который, безусловно, может рассматриваться как маркер эпителиальных клеток, хотя экспрессия ЭМА описана для некоторых популяций лимфоцитов [21]. Дополнительными доказательствами того, что в ходе наших экспериментов мы получили из пульпы зуба именно эктомезенхимные клетки, являются наличие в культивированных клетках белков промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток цитокератинов 18 и 19. Недавно опубликованы данные о возможности образования предшественников одонтобластов из глиальных клеток, которые в составе нервов входят в пульпу зуба [22] и которые по своей природе являются, как и эктомезенхима, производными нервного гребня.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Miura M., Gronthos S., Zhao M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. PNAS USA 2003; 100: 5807–12.
2. Ramazanoglu M., Rizvanov A.A., Sahin F. et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neuro-genesis. Pharmacogenomics J. 2010; 10(2): 105–13.
3. Morscizek C., Gotz W., Schierholz J. et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix. Biol. 2005; 24: 155–65.
4. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. PNAS USA. 2000; 97: 13625–30.
5. Prescott R.S., Alsanea R., Fayad M.I. et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. Endod. 2008; 34(4): 421–6.
6. Komada Y., Yamane T., Kadota D. et al. Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. PLoSOne 2012; 7(11): e46436.
7. Trubiani O., Di Primio R., Triani T. et al. Morphological and cytofluorometric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2005; 18: 213–21.
8. Laino G., Graziano A., d'Aquino R. et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. J. Cell Physiol. 2006; 206(3): 693–7.
9. d'Aquino R., Graziano A., Sampaioles M. et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endothelial cells: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ. 2007; 14(6): 1162–71.
10. Шамсутдинов М.И. Стволовые и прогениторные клетки пульпы и их характеристики после ортопедического препарирования твердых тканей зуба. Автореферат дисс. ... кандидата мед. наук. Казань: Казанский ГМУ, 2009.
11. Соловьева В.В., Блатт Н.Л., Шафигуллина А.К., Ризванов. Исследование эндогенной секреции сосудистого эндотелиального фактора роста мультипотентными мезенхимными стромальными клетками из зачатков третьих моляров человека. Клеточная трансплант. и тканевая инженерия 2012; 7(3): 155–8.
12. Alipour R., Sadeghi F., Hashemi-Beni B. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. Int. J. Prev. Med. 2010; 1(3): 164–71.
13. Orstavik D. Antibacterial properties of endodontic materials. Int. Endod J. 1988; 21: 61–169.
14. Johnson W.B. A new guttapercha technique. J. Endod. 1978; 4: 184–8.
15. Asmussen E., Peutzfeldt A., Heitmann T. Stiffness, elastic limit, and strength of newer types of endodontic posts. J. Dent. 1999; 27: 275–8.
16. Browne R.M. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials: does it have a role? Int. Endod. J. 1988; 21: 50–8.
17. Cox C.F., Hafez A.A. Biocomposition and reaction of pulp tissues to restorative treatments. Dent. Clin. North Am. 2001; 45: 31–48.
18. Ida K., Maseki T., Yamasaki M. et al. The pH values of pulp capping agents. J. Endod. 1989; 15: 365–8.
19. Trubiani O., Di Primio R., Triani T. et al. Morphological and cytofluorometric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2005; 18: 213–21.
20. Juskeviciute E., Vadigepalli R., Hoek J.B. Temporal and functional profile of the transcriptional regulatory network in the early regenerative response to partial hepatectomy in the rat. BMC Genomics 2008; 9: 527.
21. Mafi P., Hindocha S., Mafi R. et al. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization – A Systematic Review of the Literature. The Open Orthop. J. 2011; 5: 253–60.
22. Dominici M., Le Blanc K., Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315–7.
23. Самцов А.В., Белоусова И.З. Клинические, гистологические и иммуногистохимические особенности лимфом кожи на современном этапе. Вестник дерматологии и венерологии 2006; 1: 3–6.
24. Kaukua N., Shahidi M.K., Konstantinidou C. et al. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. Nature 2014; 513(7519): 551–4.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

А.А. Ризванов поддержан грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых докторов наук МД-433.2013.4. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Поступила: 20.07.2014