

Биотехнология и бионанотехнология

Оригинальная статья/Original article

УДК 615.071

DOI: <http://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-4-191-196>**Особенности электронно-микроскопической визуализации мягких наночастиц на основе фосфолипидов**

Юлия Е. Полетаева	¹	fabaceae@yandex.ru
Алина Е. Григорьева	¹	feabelit@mail.ru
Илья С. Довыденко	¹	dovydenko.il@gmail.com
Елена И. Рябчикова	¹	lenryab@yandex.ru

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, пр-т ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090, Россия

Реферат. Просвечивающая электронная микроскопия (ЭМ) является одним из способов контроля структурной организации липидных наночастиц. Цель данной работы: изучить особенности ЭМ визуализации мягких наночастиц на основе смесей диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) и фосфатидиловой кислоты (РА), и фосфатидилхолина (РС) и холестерина (Chol), при контрастировании уранилом ацетатом (УА) и фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК). Суспензии наночастиц DOPE/РА (9:2) и РС/Chol (1:1) сорбировали 1 мин на формваровую подложку на медной сетке, контрастировали УА, или ФВК (рН 0,5), или ФВК (рН 7,0), 5-10 с и изучали в ЭМ Jem-1400 (Jeol, Япония). Спектры ³¹P-ЯМР препаратов регистрировали на спектрометре AV-300 (Bruker, Германия). Препарат DOPE/РА, контрастирование УА и ФВК (рН 0,5): округлые частицы, образованные нитями (2–3 нм) низкой электронной плотности (ЭП), более четкими при использовании ФВК. Морфология нитей соответствует структурам инвертированной гексагональной фазы (ИГФ). Контрастирование ФВК (рН 7,0) приводит к структуризации нитей и появлению мембранно-подобных структур, соответствующих по виду ламеллярной фазе (ЛФ). Однако, ³¹P-ЯМР анализ выявил в спектре образца один сигнал на 0,189 м.д., соответствующий ИГФ. Препарат РС/Chol, контрастирование УА и ФВК (рН 0,5): частицы неправильной формы, образованные хаотично расположенными нитями (2 нм) низкой ЭП, соответствующими липидам ИГФ. Контрастирование ФВК обнаружило в препарате стопки липидных бислоев, соответствующих ЛФ. Присутствие липидов в разных фазах подтверждено ³¹P-ЯМР: анализ спектров препарата показал ЛФ (сигнал на -0,482 м.д.), ИГФ и изотропную фазу (сигналы на -0,235, -0,362 м.д.) Вывод: ЭМ позволяет идентифицировать фазовое состояние липидов, а «традиционные» контрастирующие вещества по-разному выявляют компоненты одного и того же препарата, что говорит об их активном взаимодействии с молекулами липидов и указывает на необходимость использования разных способов контрастирования для визуализации липидных наноструктур..

Ключевые слова: электронная микроскопия, негативное контрастирование, мягкие наночастицы, фосфолипиды**Features of electron-microscopic visualization of soft phospholipid nanoparicles**

Yuliya E. Poletaeva	¹	fabaceae@yandex.ru
Alina E. Grigor'eva	¹	feabelit@mail.ru
Ilya S. Dovydenko	¹	dovydenko.il@gmail.com
Elena I. Ryabchikova	¹	lenryab@yandex.ru

¹ Institution of chemical biology and fundamental medicine, Lavrent'ev av. 8, Novosibirsk, 630090, Russia

Summary. Transmission electron microscopy (EM) is the way to control structure of lipid nanoparticles. Our work was aimed at study of EM imaging of nanoparticles based on mixtures of dioleoylphosphatidylcholine (DOPE) and phosphatidyl acid (PA), and phosphatidylcholine (PC) and cholesterol (Chol), using contrasting with uranyl acetate (UA), and phospho-tungstic acid (PTA). Suspensions of nanoparticles DOPE/PA (9:2) and PC/Chol (1:1) were adsorbed on formvar film, 1 min, and contrasted with UA, or PTA (pH 0.5), or PTA (pH 7.0), 5-10 sec, then studied in EM Jem-1400 (Jeol, Japan). Spectra of ³¹P-NMR of samples were recorded on spectrometer AV-300 (Bruker, Germany). Nanoparticles DOPE/PA, UA and PTA (pH 0.5) contrasting: rounded particles, formed by filaments (2-3 nm) of low electron density (ED). Filament morphology corresponds to structures of inverted hexagonal phase (IHP). PTA (pH 7.0) contrasting leads to filament structuring and appearance of membrane-like structures, morphologically corresponding to lamellar phase (LP). However, ³¹P-NMR analysis revealed in sample spectrum single signal on 0,189 m.d. (IHP). Nanoparticles PC/Chol, UA and PTA (pH 0.5) contrasting: irregular particles, formed by filaments (2 nm), low ED, corresponding to IHP. The PTA revealed stacks of lipid bilayers in preparation, corresponding to LP. Presence of lipid different phases is confirmed by ³¹P-NMR: analysis of preparation spectra, showed LP (signal -0,482 M. D.), IHP and isotropic phase (signals on -0,235, -0,362 M. D.). Thus, EM allows to identify lipid phase state; "traditional" contrasting agents differently identify components in same preparation, suggesting their active interaction with lipid molecules, and indicates necessity of using different contrasting for visualization of lipid nanostructures.

Keywords: electron microscopy, negative staining, soft nanoparticles, phospholipids

Для цитирования

Полетаева Ю.Е., Григорьева А.Е., Довыденко И.С., Рябчикова Е.И. Особенности электронно-микроскопической визуализации мягких наночастиц на основе фосфолипидов // Вестник ВГУИТ. 2017. Т. 79. № 4. С. 191–196. doi:10.20914/2310-1202-2017-4-191-196

For citation

Poletaeva Ju.E., Grigor'eva A.E., Dovydenko I.S., Ryabchikova E.I. Features of electron-microscopic visualization of soft phospholipid nanoparicles. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2017. vol. 79. no. 4. pp. 191–196. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2017-4-191-196

Введение

Липиды в водном окружении способны формировать разнообразные наноструктуры: сферические и цилиндрические мицеллы, планарные ламеллярные структуры (бислои) и замкнутые (липосомы), инвертированную гексагональную фазу [1, 2]. Это свойство липидов находит широкое применение в биотехнологии и медицине, в частности, наночастицы на основе липидов используют в качестве носителя лекарственных препаратов [3–5]. Рациональный дизайн и синтез систем доставки препаратов на основе липидов требует контроля их структурной организации на протяжении всего процесса их сборки. Одним из способов такого контроля является визуализация липидных частиц, контрастированных солями тяжелых металлов, с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Метод негативного контрастирования был разработан для электронно-микроскопического исследования суспензий вирусных частиц, в дальнейшем он стал основным методом визуализации наноструктур различной природы, в том числе липидных [4, 6]. Целью данной работы являлось изучение особенностей электронно-микроскопической визуализации мягких наночастиц, на основе смесей (1) диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) и фосфатидиловой кислоты (PA), и (2) фосфатидилхолина (PC) и холестерина с помощью различных контрастирующих веществ.

Материалы и методы

Диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), яичная фосфатидиловая кислота (PA), яичный фосфатидилхолин (PC) (Avanti Polar Lipids, США); холестерин (Chol) (Alfa Aesar, США); дейтерированная вода для ЯМР анализа (Астрахим, Россия); хлороформ (Реахим, Россия); метанол (Вектон, Россия). Фосфолипиды были растворены в смеси хлороформ/метанол (1:1), а холестерин – в хлороформе, до конечной концентрации 1 мМ; уранилацетат (Fluka, США), фосфорновольфрамовая кислота (Fluka, США), формвар (SPI-CHEM™, США), разведенный в дихлорэтаноле (Fluka, США).

Получение мягких наночастиц на основе фосфолипидов

Мягкие наночастицы на основе фосфолипидов получали гидратацией тонкой липидной пленки с последующей обработкой ультразвуком. В круглодонной колбе смешали растворы: DOPE (900 μ л, 1 мМ) и PA (200 μ л, 1 мМ), – смесь липидов 1; PC (500 μ л, 1 мМ) и Chol

(500 μ л, 1 мМ), – смесь липидов 2. Полученные смеси были упарены на ротационном испарителе, после отгонки органических растворителей липидные пленки дополнительно сушили в вакууме в течение 30 мин. К сформированным на дне колб липидным пленкам прилили по 750 μ л дейтерированной воды, гидратацию пленок вели 30 мин при интенсивном перемешивании и комнатной температуре. После гидратации полученные растворы были обработаны ультразвуком в течение 15 мин при комнатной температуре и максимальной мощности ультразвука 230W.

Электронная микроскопия

Препараты суспензий мягких наночастиц были приготовлены одновременно, в течение первых суток после их синтеза. Суспензии сорбировали в течение 1 мин на медную сетку (300 ячеек), покрытую формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, избыток жидкости оттягивали фильтровальной бумагой. Затем сетку помещали на каплю контрастирующего вещества: уранила ацетата (УА) на 10 с, фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК, pH 0,5) на 5 с или ФВК (pH 7,0) на 10 с. Избыток контрастирующего вещества оттягивали фильтровальной бумагой.

Препараты изучали в просвечивающем электронном микроскопе Jem-1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Снимки получали с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (Olympus Corporation, Япония). Измерения проводили непосредственно на экране камеры с помощью пакета программ iTEM (Olympus Corporation, Япония).

31Р-ЯМР исследование раствора мягких наночастиц на основе фосфолипидов

Спектры³¹ Р-ЯМР регистрировали на спектрометре AV-300 (Bruker, Германия). Химические сдвиги в спектрах приведены в миллионных долях относительно сигнала 85 %-ной ортофосфорной кислоты (внешний стандарт). ЯМР исследование было выполнено в химическом сервисном ЦКП НИОХ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Результаты и обсуждение

Исследование препарата липидных частиц состава DOPE/PA

В препарате при всех типах контрастирования выявляются многочисленные частицы разных размеров и формы, расположенные на сеточке в основном поодиночке (рисунок 1).

Контрастирование препарата липидных частиц состава DOPE/PA уранила ацетатом выявляет округлые частицы с четкой границей, на поверхности которых встречаются вдавления (рисунок 1 А-Б). Частицы состоят из нитей низкой электронной плотности, в расположении которых прослеживаются признаки организации. Данная структура свидетельствует о том, что липиды частиц находятся в инвертированной гексагональной фазе.

Контрастирование этого же препарата ФВК (рН 0,5) также выявило частицы округлой формы с четкой границей, состоящие из нитей (рисунок 1 В-Г), диаметром 2–3 нм, что соответствует диаметру структур, характерных для инвертированной гексагональной фазы изучаемых липидов. Контрастирующий реагент ФВК (рН 0,5) глубже проникает в промежутки между нитями в частице, чем УА, вследствие чего структура нитей выявляется более четко.

Контрастирование препарата ФВК (рН 7,0) заметно меняет вид липидных частиц, формирующие их нити выглядят более плотными и протяженными, хотя их диаметр не изменяется (рисунок 1 Д-З). Очевидно, промежутки между нитями становятся шире вследствие заполнения контрастирующим веществом. Таким образом, контрастирование препарата смеси липидов DOPE/PA с помощью ФВК (рН 7,0) приводит к структуризации нитей и появлению мембранно-подобных структур, которые могут создать ложное впечатление того, что липиды смеси находятся в ламеллярной фазе. Для точного определения фазы липидов было проведено исследование образца методом ЯМР.

Исследование типа фазового состояния смеси липидов проводили методом ЯМР спектроскопии на ядрах³¹P. Согласно данным³¹P-ЯМР в спектре образца, который содержит частицы состава DOPE/PA (9:2), присутствует один сигнал на 0,189 м.д. (рисунок 1 И). На спектре видно, что пик имеет плечо в слабом поле, что согласно литературным данным соответствует инвертированной гексагональной фазе [7].

Исследование препарата липидных частиц состава PC/Chol

В препарате при контрастировании всеми веществами наблюдаются скопления многочисленных полиморфных частиц разного размера (рисунок 2), отдельно лежащие частицы встречаются редко.

Контрастирование УА выявляет рыхлые скопления частиц неправильной формы, имеющих

четкую границу и рельефную поверхность. Частицы образованы хаотично расположенными тонкими нитями низкой электронной плотности (рисунок 2 А, Б), по морфологическим параметрам данные структуры можно отнести к липидам, находящимся в инвертированной гексагональной фазе. Между нитями отмечаются полости различной формы, видимые как структуры средней электронной плотности.

В зависимости от величины рН контрастирующего раствора ФВК, в образцах наблюдаются рыхлые скопления частиц (рН 0,5), либо плотные скопления, в которых границы между частицами плохо визуализируются (рН 7,0) (рисунок 2 В-Е).

Частицы образованы тонкими нитями низкой электронной плотности, диаметром около 2 нм (рисунок 2 В-Е), что соответствует липидам в гексагональной фазе (контрастирование ФВК). Нити достаточно плотно «упакованы» внутри этих частиц, которые часто окружены стопками липидных бислоев, последние выглядят как чередование электронно-прозрачных (~ 2–3 нм) полос и полос средней электронной плотности (~ 1,3–1,6 нм), их толщина одинакова на всем протяжении и не зависит от величины рН ФВК. Такие стопки, по всей видимости, соответствуют ламеллярной фазе липидов. Они могут закручиваться в кольца различного диаметра или располагаться прямыми участками разной длины. При контрастировании ФВК (рН 0,5 и 7,0) в частицах выявляются такие же полости, как при контрастировании УА, однако, они имеют более четкую структуру.

Таким образом, контрастирование ФВК (рН 0,5 и рН 7,0) выявило в частицах состава PC/Chol присутствие липидов как в ламеллярной, так и в гексагональной фазе, что подтверждается исследованием данного препарата методом ЯМР. Анализ спектров ЯМР показал, что липидный состав PC/Chol (1:1) в полученных частицах имеет несколько фазовых состояний. На спектре выделяется три сигнала на -0,235, -0,362 и -0,482 м.д. (рисунок 2 Ж). Сигнал имеет плечо в сильном поле (обозначено стрелкой), что свидетельствует о наличии ламеллярной фазы, которой соответствует пик на -0,482 м.д. [7]. Пики на -0,235, -0,362 м.д. можно отнести к инвертированной гексагональной и изотропной (мицеллярная, инвертированная мицеллярная и кубическая) фазам, подобное поведение данной смеси липидов было описано ранее [8].

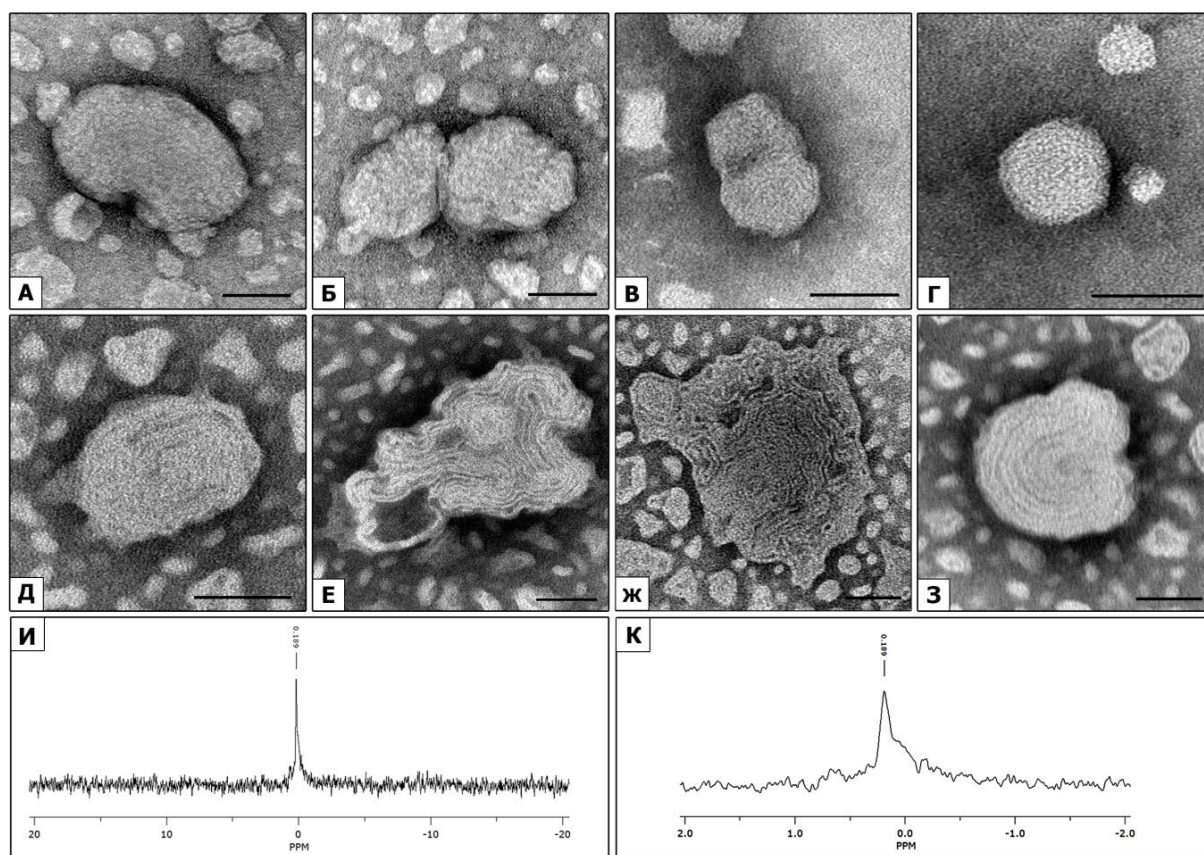


Рисунок 1. Липидные частицы состава DOPE/PA. Контрастирование: А, Б – уранила ацетатом; В, Г – ФВК pH 0,5; Д-З – ФВК pH 7,0. Длина масштабной линии соответствует 50 нм. И-К – ^{31}P -ЯМР спектр липидных частиц.

Figure 1. Lipid particles having a composition of DOPE/PA. Contrasting with: A, B – uranyl acetate; C, D – PTA (pH 0.5), E-H – PTA (pH 7.0). Scale bars correspond to 50 nm. I-G – ^{31}P -NMR spectrum of lipid particles.

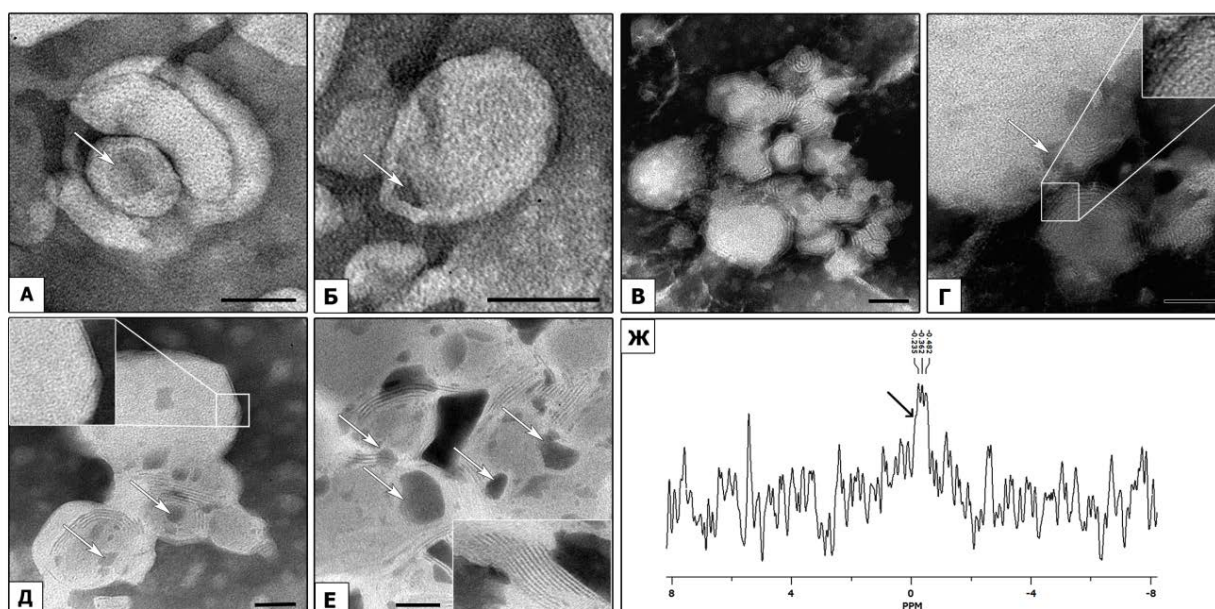


Рисунок 2. Липидные частицы состава PC/Chol. Контрастирование: А, Б – уранила ацетатом; В, Г – ФВК pH 0,5; Д, Е – ФВК pH 7,0. Е, врезка – стопка бислоев. Стрелками показаны полости в частицах. Длина масштабной линии соответствует 50 нм. Ж – ^{31}P -ЯМР спектр липидных частиц.

Figure 2. Lipid particles having a composition of PC/Chol. Contrasting with: A, B – uranyl acetate; C, D – PTA (pH 0.5), E, F – PTA (pH 7.0). Scale bars correspond to 50 nm. G – ^{31}P -NMR spectrum of lipid particles.

Заключение

Метод негативного контрастирования предполагает создание электронно-плотного фона солями тяжелых металлов (контрастирующими веществами), на котором видны биологические объекты, состоящие из легких атомов и, соответственно, имеющие низкую электронную плотность [9]. Электронно-микроскопическое изучение наноструктур, содержащих органические молекулы, показало, что контрастирующие вещества могут активно взаимодействовать с объектом исследования, несмотря на адсорбцию последнего на пленке и короткий (5–10 с) период контакта объекта и контрастирующего реагента [10]. Проведенное нами исследование

структуры липидных частиц при использовании «традиционных» контрастирующих веществ, УА и ФВК, показало, что они по-разному выявляют компоненты одного и того же препарата, что говорит об их активном взаимодействии с молекулами липидов. Эти данные указывают на необходимость использования разных способов контрастирования для визуализации липидных наноструктур, а также о возможности идентификации фазового состояния липидов с помощью электронного микроскопа.

Финансовая поддержка

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 гг., VI.62.1.4, № 0309-2016-0004

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Balazs D.A., Godbey W. Liposomes for use in gene delivery // *J Drug Deliv.* 2011. V. 2011. P. 326497. doi 10.1155/2011/326497
- 2 Jouhet J. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization // *Front Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 494. doi 10.3389/fpls.2013.00494
- 3 Hope M.J. Enhancing siRNA delivery by employing lipid nanoparticles // *Ther Deliv.* 2014. V. 5. № 6. P. 663–673. doi 10.4155/tde.14.37
- 4 Belletti D., Vandelli M.A., Tonelli M., Zapparoli M. et al. Functionalization of liposomes: microscopical methods for preformulative screening // *J Liposome Res.* 2015. V. 25. № 2. P. 150–156. doi 10.3109/08982104.2014.956221
- 5 Hua H., Zhang N., Liu D., Song L. et al. Multifunctional gold nanorods and docetaxel-encapsulated liposomes for combined thermo – and chemotherapy // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 7869–7884. doi 10.2147/IJN.S143977ijn-12-7869 [pii]
- 6 Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е., Тамкович С.Н. и др. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей // *Биомедицинская химия.* 2017. Т. 63. № 1. С. 91–96. doi 10.18097/PBMC20176301091
- 7 Lewis R.N., Mcelhaney R.N. Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: calorimetric and (31) P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids // *Biophys J.* 2000. V. 79. № 3. P. 1455–1464. doi S0006-3495(00)76397-1 [pii] 10.1016/S0006-3495(00)76397-1
- 8 Dekker C.J., Geurts Van Kessel W.S., Klomp J.P., Pieters J. et al. Synthesis and polymorphic phase behaviour of polyunsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines // *Chem Phys Lipids.* 1983. V. 33. № 1. P. 93–106. doi 0009-3084(83)90012-9 [pii]
- 9 Chao F.F., Blanchette-Mackie E.J., Chen Y.J., Dickens B.F. et al. Characterization of two unique cholesterol-rich lipid particles isolated from human atherosclerotic lesions // *Am J Pathol.* 1990. V. 136. № 1. P. 169–179.
- 10 Pyshnaya I.A., Razum K.V., Dolodoev A.S., Shashkova V.V. et al. Surprises of electron microscopic imaging of proteins and polymers covering gold nanoparticles layer by layer // *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017. V. 150. P. 23–31. doi S0927-7765(16)30783-4 [pii] 10.1016/j.colsurfb.2016.11.007

REFERENCES

- 1 Balazs D.A., Godbey W. Liposomes for use in gene delivery. *J Drug Deliv.* 2011. vol. 2011. pp. 326497. doi 10.1155/2011/326497
- 2 Jouhet J. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Front Plant Sci.* 2013. vol. 4. pp. 494. doi 10.3389/fpls.2013.00494
- 3 Hope M.J. Enhancing siRNA delivery by employing lipid nanoparticles. *Ther Deliv.* 2014. vol. 5. no. 6. pp. 663–673. doi 10.4155/tde.14.37
- 4 Belletti D., Vandelli M.A., Tonelli M., Zapparoli M. et al. Functionalization of liposomes: microscopical methods for preformulative screening. *J Liposome Res.* 2015. vol. 25. no. 2. pp. 150–156. doi 10.3109/08982104.2014.956221
- 5 Hua H., Zhang N., Liu D., Song L. et al. Multifunctional gold nanorods and docetaxel-encapsulated liposomes for combined thermo – and chemotherapy. *Int J Nanomedicine.* 2017. vol. 12. pp. 7869–7884. doi 10.2147/IJN.S143977ijn-12-7869 [pii]
- 6 Grigor'eva A.E., Dyrkheeva N.S., Bryzgunova O.E., Tamkovich S.N. et al. Contamination of exosome preparations, isolated from biological fluids. *Biomedical Chemistry.* 2017. vol. 63. no. 1. pp. 91–96. doi 10.18097/PBMC20176301091 (in Russian)
- 7 Lewis R.N., Mcelhaney R.N. Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: calorimetric and (31) P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids. *Biophys J.* 2000. vol. 79. no. 3. pp. 1455–1464. S0006-3495(00)76397-1 [pii] 10.1016/S0006-3495(00)76397-1
- 8 Dekker C.J., Geurts Van Kessel W.S., Klomp J.P., Pieters J. et al. Synthesis and polymorphic phase behaviour of polyunsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines. *Chem Phys Lipids.* 1983. vol. 33. no. 1. pp. 93–106. 0009-3084(83)90012-9 [pii]
- 9 Chao F.F., Blanchette-Mackie E.J., Chen Y.J., Dickens B.F. et al. Characterization of two unique cholesterol-rich lipid particles isolated from human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1990. vol. 136. no. 1. pp. 169–179.
- 10 Pyshnaya I.A., Razum K.V., Dolodoev A.S., Shashkova V.V. et al. Surprises of electron microscopic imaging of proteins and polymers covering gold nanoparticles layer by layer. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017. vol. 150. pp. 23–31 doi S0927-7765(16)30783-4 [pii] 10.1016/j.colsurfb.2016.11.007

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Юлия Е. Полетаева аспирант, группа микроскопических исследований, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, пр-т ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090, Россия, fabaceae@yandex.ru

Алина Е. Григорьева к.б.н., старший лаборант, группа микроскопических исследований, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, пр-т ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090, Россия, feabelit@mail.ru

Илья С. Довыденко к.х.н., ведущий инженер, лаборатория биомедицинской химии, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, пр-т ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090, Россия, dovydenko.il@gmail.com

Елена И. Рябчикова д.б.н., профессор, заведующая группой микроскопических исследований, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, пр-т ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090, Россия, lenryab@yandex.ru

КРИТЕРИЙ АВТОРСТВА

Юлия Е. Полетаева обзор литературных источников по исследуемой проблеме, провёл эксперимент, выполнил расчёты

Алина Е. Григорьева написала рукопись, корректировала её до подачи в редакцию и несёт ответственность за плагиат

Илья С. Довыденко предложил методику проведения эксперимента

Елена И. Рябчикова консультация в ходе исследования

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ПОСТУПИЛА 29.09.2017

ПРИНЯТА В ПЕЧАТЬ 22.11.2017

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Yuliya E. Poletaeva graduate student, group of microscopy, Institution of chemical biology and fundamental medicine, Lavrent'ev av. 8, Novosibirsk, 630090, Russia, fabaceae@yandex.ru

Alina E. Grigor'eva Cand. Sci. (Biol.), group of microscopy, Institution of chemical biology and fundamental medicine, Lavrent'ev av. 8, Novosibirsk, 630090, Russia, feabelit@mail.ru

Ilya S. Dovydenko Cand. Sci. (Chem.), lead engineer, laboratory of biomedical chemistry, Institution of chemical biology and fundamental medicine, Lavrent'ev av. 8, Novosibirsk, 630090, Russia, dovydenko.il@gmail.com

Elena I. Ryabchikova Dr Sci. (Biol.), professor, head of microscopy group, Institution of chemical biology and fundamental medicine, Lavrent'ev av. 8, Novosibirsk, 630090, Russia, lenryab@yandex.ru

CONTRIBUTION

Yuliya E. Poletaeva review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, performed computations

Alina E. Grigor'eva wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

Ilya S. Dovydenko proposed a scheme of the experiment and organized production trials

Elena I. Ryabchikova consultation during the study

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

RECEIVED 9.29.2017

ACCEPTED 11.22.2017