

УДК 577.3

## **СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МОЛЕКУЛ С ШУНГИТОВЫМ НАНОУГЛЕРОДОМ**

**С. П. Рожков, А. С. Горюнов**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*

Изучение физико-химических взаимодействий белков и других биологически значимых молекул с шунгитовым нанокуглеродом (ShC), как представителем семейства графеновых наноматериалов, необходимо для обеспечения биобезопасности в разных областях его применения, включая биомедицину. Динамические характеристики поверхности потенциального контакта нано- и биоструктур, характеристики взаимодействия с растворителем (гидратация) несут существенную информацию о типах возникающих связей и взаимодействиях, включая взаимодействие с переносом лигандов, а также о свойствах соответствующих бионаногибридных систем. Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спинового зонда на основе стеариновой жирной кислоты (ЖК) исследовано динамическое состояние области контакта (поверхности) углеродных нанокластеров в дисперсиях ShC с молекулами белка (сывороточного альбумина быка, САБ) и других биологически значимых молекул и ионов, влияющих на гидратацию (сахароза, мочевины,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ). Показано, что в смешанной дисперсии ShC и САБ возможен перенос спин-зонда (ЖК) с белка на нанокуглерод и наоборот в зависимости от соотношения их концентраций. В переносе, вероятно, задействована белковая корона наночастиц. Эффект наблюдается при концентрации ShC на два порядка меньшей, чем концентрация белка. Это означает возможность использования нанодисперсии ShC для воздействия на связывание и транспорт ЖК сывороточным альбумином. Применение дополнительных растворенных веществ может позволить регулировать это воздействие, как это наблюдается в случае с сахарозой. Нелинейности аррениусовских зависимостей параметров спектра ЭПР спин-зонда в смешанных дисперсиях ShC могут свидетельствовать о наличии фазового перехода, как в полимерных растворах.

**Ключевые слова:** водная нанодисперсия углерода; электронный парамагнитный резонанс спин-зондов; сывороточный альбумин; сахароза; мочевины; жирная кислота.

### **S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. STRUCTURAL DYNAMIC EFFECTS OF PROTEIN AND OTHER BIOLOGICALLY SIGNIFICANT MOLECULES' INTERACTION WITH SHUNGITE NANOCARBON**

Understanding of physicochemical interactions of proteins and other biologically significant molecules with shungite nanocarbon (ShC), a graphene family nanomaterial, is required to provide biosafety in various fields of its application including biomedicine. Dynamic characteristics of potential bio-nano interface, characteristics of interaction with the solvent (hydration) carry important information about the types of arising bonds

and interactions, the interaction of ligand transfer among them, as well as about the properties of the corresponding bio-nano hybrid forms. The dynamic state of the interface (surface) of carbon nanoclusters in ShC dispersions and protein (bovine serum albumin, BSA) and other biologically significant molecules and ions (sucrose, urea, NaCl, HCl, NaOH) that can affect hydration have been studied using electron spin resonance (ESR) of spin probe based on stearic fatty acid (FA) molecule. A transfer of spin probe (FA) from protein to nanocarbon and vice versa in a mixed dispersion of ShC and BSA has been shown to occur depending on their concentration ratio. Nanoparticle protein corona is probably involved in the transfer. The effect has been observed at ShC concentration an order of magnitude lower than that of protein. This signifies the possibility to influence FA binding and transport by serum albumin using ShC dispersion. This effect can be regulated by additional solutes, as has been observed in the case of sucrose. Nonlinearities of Arrhenius dependences of ESR spin probe spectrum parameters in mixed ShC dispersions may indicate the phase transition as in polymer solutions.

**Key words:** water carbon nanodispersion; electron spin resonance; serum albumin; sucrose; urea; fatty acid.

## Введение

В последние годы исследования водных дисперсий наночастиц (НЧ) шунгитового углерода (ShC) получили интенсивное развитие, что позволило предложить сценарий происхождения шунгита и ответить на ряд вопросов о причинах его уникальных свойств [Rozhkova et al., 2016]. При всем подобии конденсационных структур, возникающих при осаждении водных дисперсий разнообразных углеродных наноматериалов, шунгитовый наноуглерод выделяется основным структурным элементом, лежащим в основе его строения. Это непланарные молекулы, которые, как показывают последние данные целого ряда экспериментальных методов, близки по свойствам к восстановленному оксиду графена (BOG) [Stankovich et al., 2007; Kim et al., 2011; Sheka, Rozhkova, 2014]. Шунгитовый углерод нерастворим в воде из-за преобладания гидрофобных участков на поверхности его ультрадисперсных частиц. Однако непланарные графеновые элементы образуют стопки (наподобие монетных столбиков) размерами до 1,5 нм с суммарным дипольным моментом около 6,5 дебай. Дипольный момент и полярные группы (гидроксильные, лактонные и др.) по дефектным краям фрагментов могут придавать наночастицам углерода гидрофильные свойства, снижать поверхностную энергию и способствовать устойчивости кластеров наночастиц в водной дисперсии и интеркаляции относительно больших количеств воды в кластерах [Xu et al., 2014]. Наряду с тем интересом, который графеновые структуры вызывают с точки зрения их физической, химической, кристаллической фазовой природы, большое внимание в настоящее время сосредоточено на изучении биологических взаимодействий этих двумерных

наноматериалов для новых разработок в области биомедицины и обеспечения охраны здоровья и безопасности человека в разных областях их применения [Wang et al., 2016].

Биологические эффекты и в конечном счете биологическая активность абиогенных наноструктур вообще определяется характером и природой взаимодействий и комплексов, возникающих при введении наноструктур в биологическую среду, а также контактов, образующихся при этом в белковых растворах, клеточных суспензиях, культурах клеток. Область контакта наноматериала и биологической системы охватывает сферу динамических физико-химических взаимодействий, кинетики и термодинамики процессов обмена между поверхностями наноматериала и биологической структуры (белка, мембраны, везикул, липидов, ДНК). Для разработки этого направления необходимо иметь ясное представление о силах и молекулярных компонентах, которые участвуют во взаимодействиях, возникающих в области контакта в ходе коллоидно-химических и компенсационных процессов как на био-, так и на нанопереходности.

Динамические характеристики состояния поверхности потенциального контакта нано-биоструктур несут существенную информацию о характере возникающих связей и взаимодействий, включая взаимодействие с переносом лигандов. Важной характеристикой является, в частности, состояние гидратации поверхности, взаимодействие с растворителем, в том числе многокомпонентным. Метод ЭПР спин-зонда – один из прямых методов, позволяющих изучать структурно-динамические свойства поверхности как белковых, так и наноструктур, а также особенности их гидратации [Рождков и др., 2007]. В работе ставится задача провести

методом ЭПР спинового зонда исследование динамического состояния области контакта (поверхности) углеродных нанокластеров в дисперсиях шунгитового углерода с молекулами белка (сывороточного альбумина быка, САБ) и других биологически значимых молекул и ионов, влияющих на гидратацию (сахароза, мочевины, соли). Мы использовали гидрофобный спин-зонд на основе жирной (стеариновой) кислоты, который хорошо связывается с сывороточным альбумином в гидрофобных участках поверхности и полостях макромолекулы белка и может удовлетворительно связываться с шунгитовым нанокластером из-за преимущественно гидрофобной природы поверхности его наночастиц. Способность нитроксильной группы зонда к образованию водородной связи с молекулами воды, так же как и его динамические свойства (константа сверхтонкой структуры, амплитуда и ширина линий спектра, время корреляции), является чувствительным инструментом для характеристики состояния гидратации и ее изменений, в том числе при фазовых превращениях.

## Материалы и методы

В работе использовались препараты коммерческого необезжиренного (5-я фракция) сывороточного альбумина быка (САБ) производства PAA Laboratories GmbH. Стабильные водные дисперсии наночастиц ShC (НЧ ShC) представляли собой образцы, приготовленные из шунгитового горнорудного сырья Шуньга I согласно методике Н. Н. Рожковой [2011] и охарактеризованные с помощью спектрофотометрии UV-Vis, рамановского рассеяния и динамического рассеяния света (ДРС) с исходной концентрацией углерода 0,1 мг/мл (рН 7,2). При изучении структурно-динамических характеристик с молекулами САБ и НЧ ShC связывался гидрофобный спиновый зонд на основе молекулы 5-доксил-стеариновой кислоты (5-DOXIL-stearic acid, 5DSA) (Sigma). Спектры ЭПР спин-зонда регистрировались на радиоспектрометре ЭПР Bruker EMX 6/1 с термостатируемой ячейкой резонатора ( $\pm 0,2$  °C) при амплитуде модуляции 1 Гс и СВЧ мощности 12,6 мВт во избежание насыщения и искажения сигнала. Эффективное время корреляции  $\tau^{\text{эфф}}$  и параметр анизотропии  $\epsilon$  диффузии спин-зонда рассчитывались по известным формулам [Вассерман, Коварский, 1986], в которые входят такие параметры спектра (сигнала) ЭПР спин-зонда, как отношения интенсивностей низкополевых  $h_{(+1)}$  и высокополевых  $h_{(-1)}$  линий к центральной линии  $h_{(0)}$ :  $h_{(+1)}/h_{(0)}$ ;  $h_{(-1)}/h_{(0)}$ , отношение низкополевых и высокополевых

линий  $h_{(+1)}/h_{(-1)}$ , с учетом соответствующих значений ширины линий  $\Delta H$  спектра ЭПР [Dhami et al., 2008]:

$$\tau^{\text{эфф}} = 6,65\Delta H_{(+1)} [(h_{(+1)}/h_{(-1)})^{1/2} - 1] 10^{-10} \text{ с.} \quad (1)$$

Параметр порядка  $S$  рассчитывали по данным о сверхтонком расщеплении линий спектра:  $S = (A_{\parallel} + 2A_{\perp}) / (A_z - A_x)$ , где  $A_z$ ,  $A_x$  – главные значения тензора сверхтонкой структуры (СТС), которые для зонда 5DSA составляют 31,42 и 5,92 Гс соответственно [Вассерман, Коварский, 1986];  $A_{\parallel}$ ,  $A_{\perp}$  – главные значения тензора СТС, определяемые экспериментально как наибольшее и наименьшее расстояние между максимумами крайних линий спектра соответственно.

Зонд, изначально растворенный в хлороформе, после испарения растворителя осаждался в виде пленки, на которую затем наносили дисперсию НЧ ShC или раствор САБ. При этом часть зонда из пленки сорбировалась НЧ ShC либо молекулами САБ. Количество адсорбированного спин-зонда контролировалось по спектру ЭПР. Полученную дисперсию использовали для приготовления образцов разного состава. В отсутствие наночастиц ShC или молекул белка зонд из пленки в объемную воду не переходил. В результате в исходном образце ShC наблюдали три узких эквидистантных линии спектра с различной амплитудой, которые соответствуют быстрому анизотропному вращению зонда (рис. 1). По внешнему виду спектр оказался аналогичен спектрам зонда 5DSA, находящегося в изотропной фазе жидкого кристалла [Arcioni et al., 2002]. Параметр анизотропии  $\epsilon$  изменялся с температурой практически линейно от 0,3 до 0,9 в исследованном диапазоне температур, а параметр порядка  $S$  не превышал значения 0,15. Это соответствует быстрому вращению содержащего N-O<sup>\*</sup> группу кольца молекулы зонда вокруг молекулярной оси  $u$ , перпендикулярной N-O связи и  $p_z$  орбитали атома азота, с временем корреляции  $\tau_{\perp}$  [Arcioni et al., 2002]. При такой динамике N-O<sup>\*</sup> группы зонда эффективные значения его времени корреляции  $\tau^{\text{эфф}}$ , рассчитанные по формуле (1) модели изотропного вращения зонда, адекватно характеризуют его поведение и состояние его микроокружения [Лихтенштейн, 1974].

Спектр ЭПР спин-зонда, сорбированного молекулами САБ, за счет иммобилизации подвижности зонда, находящегося в полостях белка, характеризовался наличием сильно уширенных линий (рис. 1), на фоне которых наблюдались узкие линии от зонда, сорбированного на поверхности белка. Однако доля таких зондов не превышала 3 %.

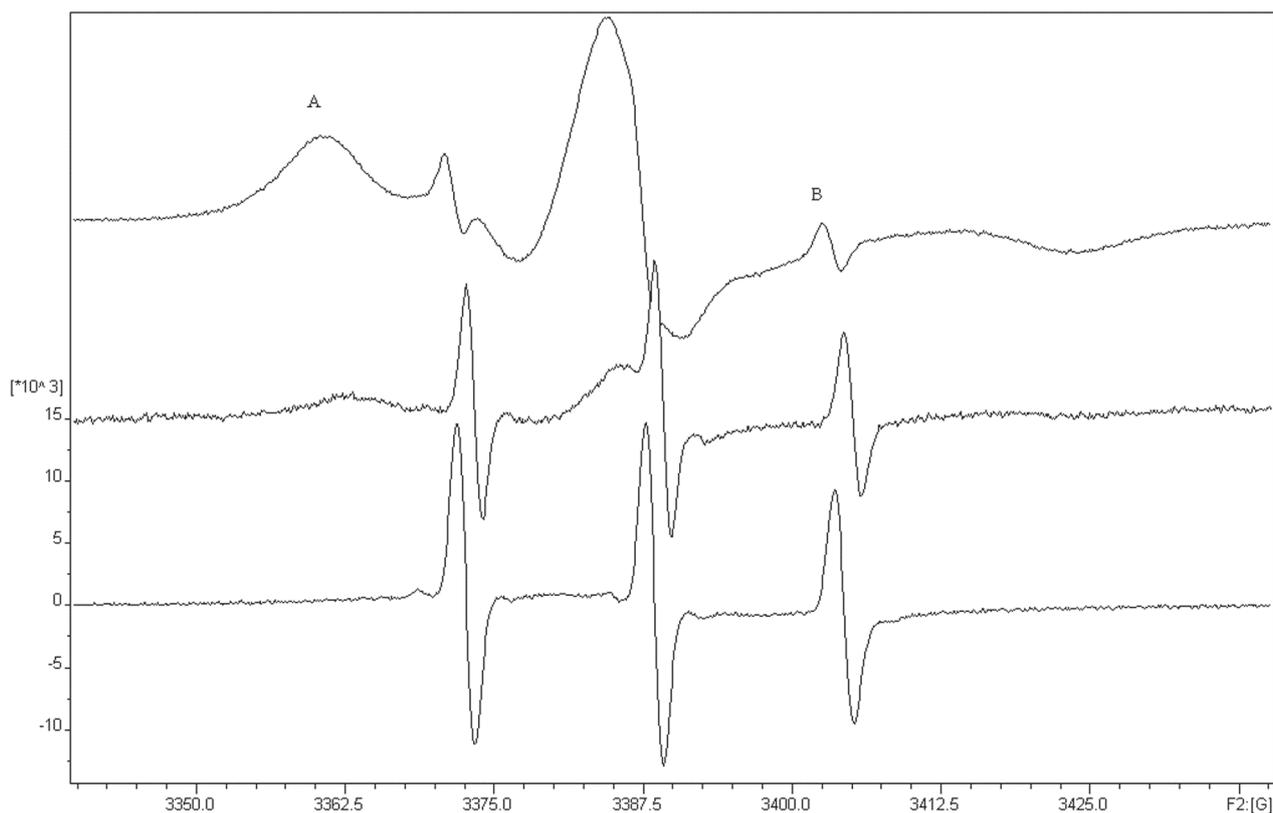


Рис. 1. Экспериментальные спектры ЭПР водных растворов и дисперсий, содержащих спин-зонд 5-доксил-стеариновую кислоту. Сверху вниз: раствор сывороточного альбумина быка (САБ); смешанная нанодисперсия САБ и шунгитового наноглерида (ShC); нанодисперсия ShC

В работе также использовались химически чистые реагенты: сахароза, мочеви́на, NaCl, NaOH, HCl.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

## Результаты

На рисунке 1 представлены спектры ЭПР зонда 5DSA в комплексе с САБ, в смешанной дисперсии САБ и ShC, в дисперсии ShC. Видно, что спектры зонда 5DSA, сорбированного белком (верхний спектр) и сорбированного наноглериодом (нижний спектр), существенно различаются: в случае САБ – это иммобилизованный спектр с широкими линиями, в случае ShC – узкие линии быстро вращающегося зонда. Это значит, что подвижность зонда в структуре наночастиц ShC заметно выше, чем в структуре САБ. Спектр зонда в смешанной дисперсии САБ и ShC (средний спектр на рис. 1) является промежуточным по форме, что позволяет считать его суперпозицией спектров зонда на

САБ и на ShC в отдельности. Это указывает на распределение зонда между центрами на САБ и на ShC. Соответственно, при избытке в дисперсии САБ 5DSA преимущественно сорбируется на САБ, но с ростом концентрации ShC идет перераспределение в сторону сорбции на кластерах ShC. Это может означать, что между нанокластерами ShC и молекулами САБ имеет место конкуренция за сорбцию 5DSA.

Константа изотропной сверхтонкой структуры  $2a_0^N$ , которая определяется расстоянием между крайними острыми линиями спектра ЭПР, отражает полярность окружения спин-зонда. Более полярным оказывается окружение зонда, сорбированного на САБ, а наименее полярным – в смешанной дисперсии САБ и ShC. Вероятно, это обусловлено тем, что при образовании белковой короны из молекул САБ на нанокластерах ShC зонд экранируется от взаимодействия с водой растворителя, причем как на молекулах САБ, так и на HЧ ShC.

Зависимости амплитуды низкопольной линии спектра ЭПР 5DSA от мощности СВЧ ведут себя одинаково в образцах отдельно с ShC и с САБ, что говорит о наличии в каждом из случаев единой системы спинов. В смешанной же дисперсии ShC и САБ наблюдается более

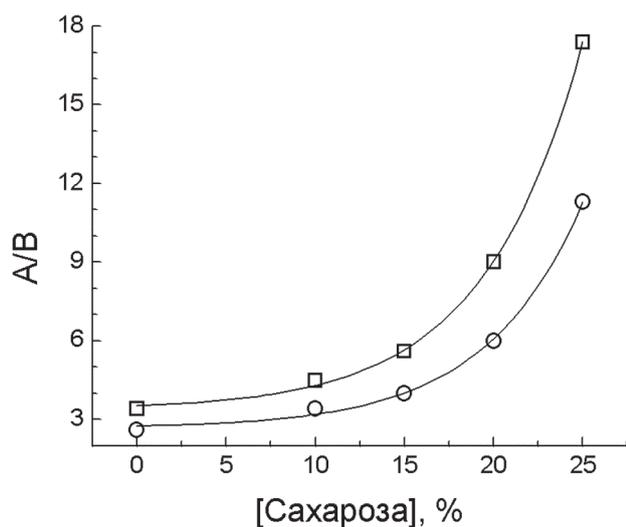


Рис. 2. Зависимости отношения амплитуд А и В линий спектра ЭПР спин-зонда 5-доксил-стеариновой кислоты, связанного молекулами САБ и наночастицами ShC, от концентрации сахарозы. Концентрация белка 10 мг/мл; шунгитового наночуглерода 0,1 мг/мл 0,015 М фосфатный буфер. Квадраты – раствор САБ, кружки – смешанная дисперсия САБ и ShC

сильное насыщение, что обусловлено, как правило, взаимодействием двух спиновых подсистем. Наиболее вероятно, это подсистема зонда на белке в растворе и в составе белковой короны наночастиц ShC и подсистема зонда в структуре собственно наночастиц, что вновь указывает на распределение зонда в смешанной дисперсии между САБ и НЧ ShC.

Для зонда, сорбированного молекулами САБ, информативным оказывается параметр, равный отношению амплитуды низкопольной широкой А-линии к амплитуде высокопольной узкой В-линии (рис. 1). Это отношение характеризует распределение зонда между состояниями свободного вращения в окружении молекул растворителя (узкие линии) и в полостях в окружении элементов структуры белка (широкие линии). Амплитуды линий растут с температурой: амплитуда узкой – экспоненциально, а амплитуда широкой – линейно с переходом в области 33 °С (305 К). При постоянной температуре амплитуда широкой А-линии растет, а узкой В-линии уменьшается с ростом концентрации сахарозы, стабилизирующей структуру белка. Отношение амплитуд А/В увеличивается экспоненциально с ростом содержания сахарозы (рис. 2). В смешанной дисперсии НЧ ShC и САБ эффект менее выражен и сдвинут в сторону больших концентраций сахарозы, т. е. ShC вызывает увеличение подвижности зонда даже в присутствии такого стабилизирующего агента, как сахароза. Эти данные, на первый взгляд,

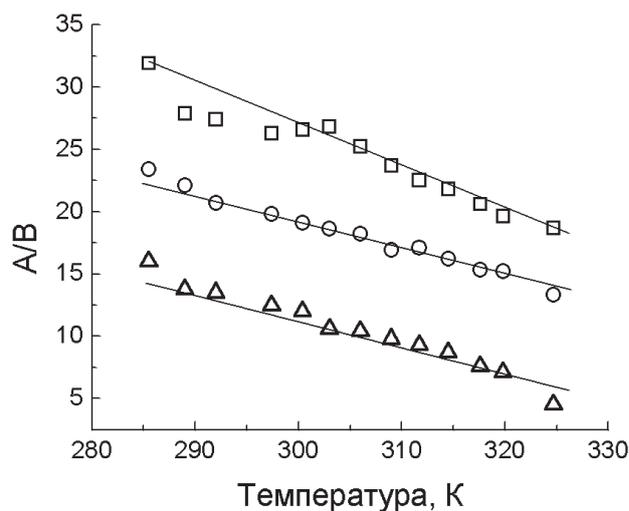


Рис. 3. Зависимость отношения амплитуд А/В линий спектра ЭПР спин-зонда 5-доксил-стеариновой кислоты, связанного с САБ, от абсолютной температуры. Квадраты – раствор САБ, кружки – смешанная дисперсия САБ и НЧ ShC, треугольники – раствор САБ в присутствии мочевины. Концентрация белка 10 мг/мл, наночуглерода 0,1 мг/мл, мочевины 2 М 0,015 М фосфатный буфер

говорят о том, что известный эффект стабилизации структуры белковой глобулы в присутствии сахарозы как бы ослабляется под влиянием ShC.

По данным о соотношении амплитуд А/В (рис. 3) видно, что присутствие ShC и дестабилизирующей структуру белка мочевины в дисперсии САБ вызывает сдвиг равновесия в сторону В-линии (А/В уменьшается). Это указывает на рост числа молекул зонда с большей подвижностью. Поскольку эффект ShC в присутствии как стабилизирующего (сахароза), так и дестабилизирующего (мочевина) структуру белка агентов состоит в увеличении подвижности зонда, то природа эффекта, скорее всего, – не в (де) стабилизации структуры САБ. Так же, как и изменение формы спектра (рис. 1), этот результат объясняется тем, что часть молекул зонда может переходить с белка в состав кластеров наночастиц ShC, где его подвижность существенно выше. Более того, при повышении содержания сахарозы эффект ShC увеличивается, что указывает на смещение распределения зонда между САБ и НЧ в сторону ShC с ростом концентрации сахарозы. Это может быть связано с агрегационными и восстановительными эффектами сахарозы в отношении графеновых фрагментов и устойчивости дисперсии НЧ ShC [Zhu et al., 2010].

В присутствии ShC и мочевины наблюдается линейное уменьшение отношения А/В с ростом температуры, тогда как в растворе САБ

при температурах меньше 305 К имеет место отклонение от линейности. Эта особенность может быть связана с закритическим фазовым переходом в растворе белка.

Переход при 305 К регистрируется и на температурной зависимости экспериментального параметра  $d_1/d$  спектра ЭПР спин-зонда 5DSA, связанного с белком, где  $d_1$  – расстояние между максимумами амплитуд крайних широких линий спектра,  $d$  – амплитуда центральной линии. Этот параметр характеризует среднее расстояние взаимодействия между нитроксильными группами меток или зондов в застеклованных матрицах, возрастая при уменьшении расстояния. Линейно возрастающая зависимость  $d_1/d$  от концентрации сахарозы в растворе белка претерпевает параллельный сдвиг в сторону больших значений  $d_1/d$  в смешанной дисперсии САБ и ShC.

На рисунке 4 представлены температурные зависимости расстояния  $2A_{zz}$  между крайними широкими линиями спектра ЭПР (параметр тензора СТС) для зонда в комплексе с САБ. Этот параметр убывает в целом линейно с ростом температуры вслед за увеличением

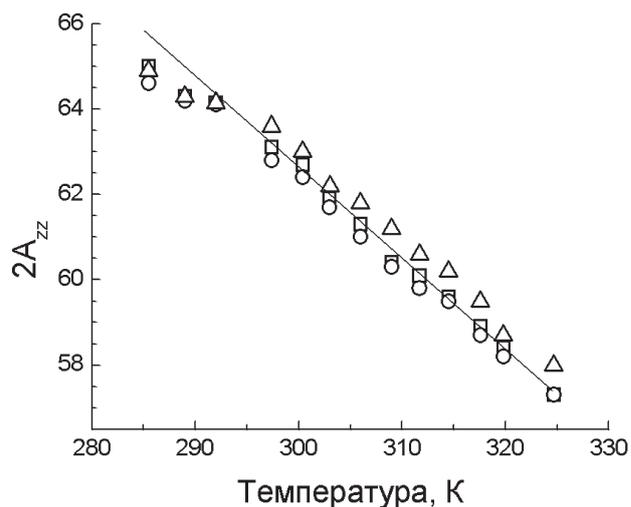


Рис. 4. Зависимость параметра  $2A_{zz}$  (Гц), соответствующего расстоянию между крайними широкими экстремумами спектра ЭПР спин-зонда 5-доксил-стеариновой кислоты, связанного с САБ, от абсолютной температуры. Условия и обозначения – как на рис. 3

подвижности зонда. Однако при температурах ниже 20 °С (273 К) здесь наблюдается

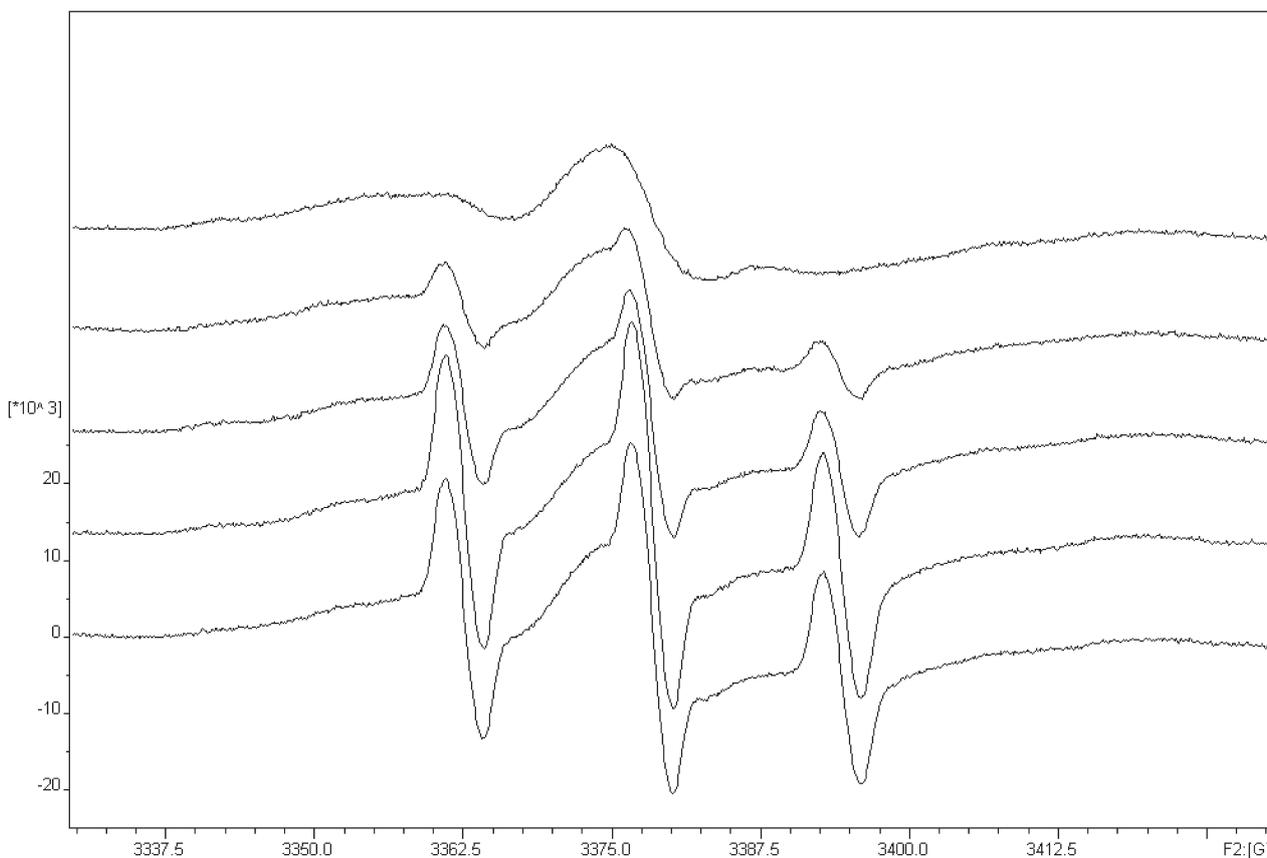


Рис. 5. Экспериментальные спектры ЭПР спин-зонда 5-доксил-стеариновой кислоты в дисперсиях нанокластеров шунгитового углерода (ShC) разного состава. Дисперсии нанокластеров ShC при внесении (сверху вниз): 0,05 н. HCl; 0,75 М NaCl; 6 М мочевины; 0,5 н. NaOH. Нижний спектр – контроль: водная дисперсия наночастиц ShC (0,05 мг/мл). Развертка 100 Гс, амплитуда модуляции 5 Гс, СВЧ-мощность 31 мВт. Температура 291 К

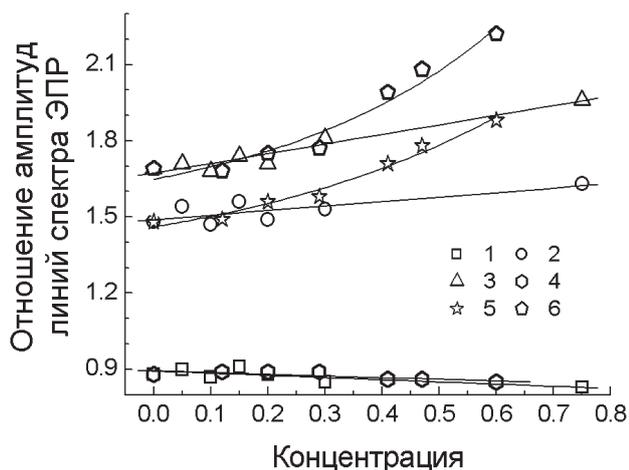


Рис. 6. Зависимости отношений амплитуд линий спектра ЭПР спин-зонда 5-доксил-стеариновой кислоты от концентрации NaCl (1, 2, 3) и сахарозы (4, 5, 6) в водной нанодисперсии шунгитового углерода (ShC). 1, 4 – отношение  $h_{+1}/h_0$ ; 2, 5 – отношение  $h_{+1}/h_{-1}$ ; 3, 6 – отношение  $h_0/h_{-1}$ . Температура 291 К

существенное отклонение от линейности, которое имеет место и в случае с мочевиной, и в случае с ShC, в отличие от зависимостей A/B (рис. 3). Уменьшение  $2A_{zz}$  может быть связано с изменением взаимодействия N-O\* группы зонда с водой.

На рисунке 5 представлены экспериментальные спектры ЭПР спин-зонда 5DSA в составе наночастиц ShC в водной дисперсии, а также в присутствии в дисперсии молекул другого типа, влияющих на гидратацию наночастиц и микроокружение зонда.

В дисперсиях ShC разного состава амплитуды и ширина линий спектров различны. С ростом уширения линий происходит уменьшение амплитуды сигнала, которое сказывается на отношении сигнал/шум. Для повышения разрешения сигнала обзорные спектры записывались при увеличенной амплитуде модуляции и СВЧ-мощности (рис. 5), что позволило продемонстрировать характер изменения подвижности зонда при переходе от одного состава дисперсии ShC к другому, хотя и привело к некоторому искажению исходной формы спектров. На рисунке 5 спектры расположены в порядке, соответствующем уменьшению подвижности (увеличению иммобилизации) зонда снизу вверх. Иммобилизация минимальна для наночастиц ShC в воде и максимальна в кислой среде (с HCl). Спектр ЭПР, близкий по форме к полученному в кислой среде, имеем также при полном выпаривании воды из дисперсии ShC (сухой образец) или при большом содержании сахарозы (на рис. 5 не приведены). Однако появление осадка при увеличении концентрации дисперсии ShC

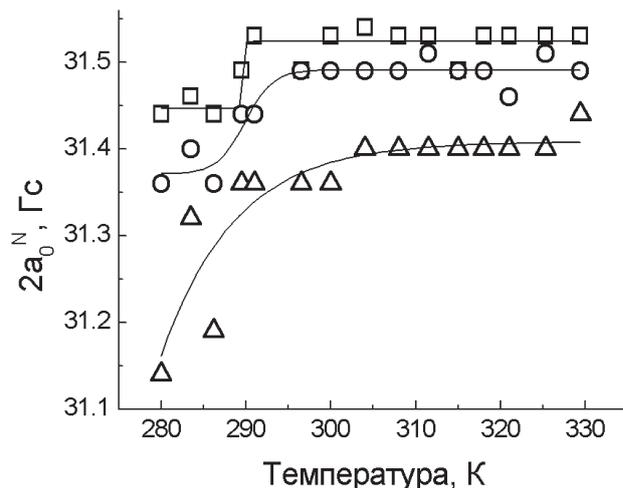


Рис. 7. Температурные зависимости константы сверхтонкого расщепления  $2a_0^N$  (Гс) спектра ЭПР спин зонда 5-доксил-стеариновой кислоты в водной нанодисперсии шунгитового углерода (ShC) при концентрациях сахарозы 0 % (квадраты), 10 % (кружки), 20 % (треугольники)

в результате частичного выпаривания воды не вызывает изменения спектра ЭПР зонда и его параметров по сравнению с исходным спектром в разбавленной дисперсии ShC. Сахароза, наряду с ростом параметра порядка S (появление широких линий, соответствующих сильной иммобилизации), вызывает обменное уширение линии в отсутствие образования осадка.

В отсутствие искажения спектров ЭПР спин-зонда (амплитуда модуляции 1 Гс, СВЧ-мощность 12,5 мВт) параметрами, наиболее чувствительными к динамическому состоянию спин-зонда, являются отношения амплитуд линий спектра:  $h_{+1}/h_0$ ;  $h_{+1}/h_{-1}$ ;  $h_0/h_{-1}$ . На рисунке 6 представлены зависимости этих параметров от концентрации NaCl и сахарозы: увеличение концентрации электролита вызывает линейный рост отношения амплитуд  $h_{+1}/h_{-1}$  и  $h_0/h_{-1}$ , в то время как увеличение концентрации углевода вызывает экспоненциальный рост. Отношение  $h_{+1}/h_0$  лишь слабо убывает. Аналогичного типа изменения наблюдаются и для величины параметра порядка S, который растет в присутствии этих агентов. Эти данные подтверждают общую тенденцию к уменьшению подвижности зонда 5DSA при внесении в дисперсию ShC различных добавок, следующую из рассмотрения формы спектров (рис. 5).

На рисунке 7 представлены температурные зависимости параметра сверхтонкого расщепления  $2a_0^N = 2/3 (A_{||} + 2A_{\perp})$  для ряда образцов с ShC. Здесь  $A_{||}$  имеет тот же физический смысл, что  $A_{zz}$  в случаях, описанных выше. Во всех образцах, в том числе и при отсутствии сахарозы, наблюдаются зависимости

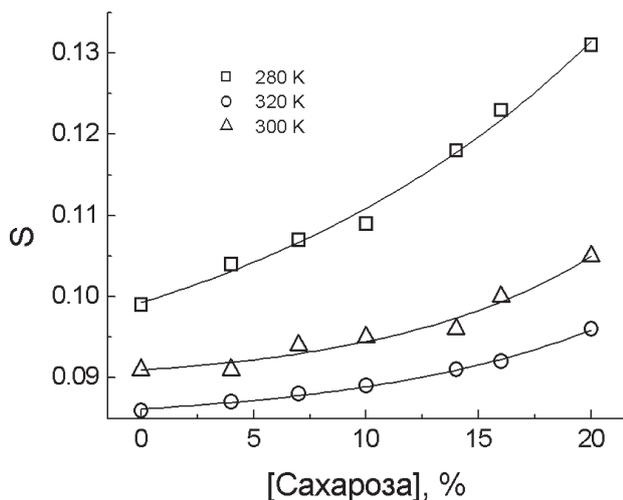


Рис. 8. Изотермы зависимости параметра порядка  $S$  спектра ЭПР спин-зонда 5-доксил-стеариновой кислоты в водной нанодисперсии шунгитового углерода (ShC) от концентрации сахарозы

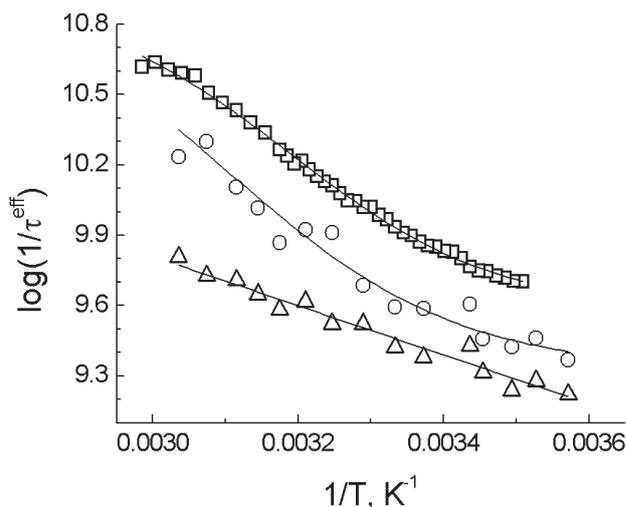


Рис. 9. Температурные зависимости частоты вращения ( $1/\tau^{\text{эфф}}$ ) спин-зонда 5-доксил-стеариновой кислоты (в координатах Аррениуса) в водной нанодисперсии шунгитового углерода (ShC) (квадраты), при внесении 10 % (кружки) и 20 % (треугольники) сахарозы

сигмоидного типа с выходом на насыщение по мере роста температуры  $T$ :

$$a_0^N = (a_0^{N_1} - a_0^{N_2}) / [1 + e^{(T-T_0)/\lambda}] + a_0^{N_2} c,$$

где  $a_0^{N_1}$  и  $a_0^{N_2}$  – предельные значения для неполярного и полярного окружения спин-зонда,  $\lambda$  – эмпирический параметр [Marsh, 2001]. С ростом концентрации сахарозы  $a_0^N$  уменьшается, а точка наибольшей крутизны сдвигается в область более низких температур. Это связано с уменьшением диэлектрической проницаемости в присутствии углевода. Значение  $a_0^N$  для 5DSA при отсутствии связи N-O<sup>+</sup> группы зонда с водой находится в интервале от 14,1 до 14,5 Гс при диэлектрической проницаемости в пределах от 2 до 80. Однако при наличии такой связи  $a_0^N$  может возрасти до 15,7 Гс и более [Marsh, 2001]. Судя по рисунку 6, все полученные нами значения  $a_0^N$ , в том числе и при отсутствии сахарозы, находятся в интервале, соответствующем наличию водородной связи N-O<sup>+</sup> группы с водой. В таком случае переход к более высоким значениям  $a_0^N$  в области температур 290 К и выше свидетельствует о том, что в структуре водного окружения наночастиц ShC происходят изменения, приводящие к увеличению средней прочности водородной связи между N-O<sup>+</sup> группой и молекулами воды. Это может быть результатом того, что с ростом температуры меняется распределение по энергиям водородных связей в сторону связей с более высокой энергией. В присутствии сахарозы этот процесс происходит в более широком интервале температур.

Сахароза в методе спиновых зондов может также использоваться как вязкостный агент при определении размеров эффективного эллипсоида вращения, которым экстраполируется спиновый зонд [Вассерман, Коварский, 1986]. Время корреляции вращающейся частицы радиуса  $r$  определяется по закону Стокса вязкостью раствора:  $\tau_c = 4\pi\eta r^3 / kT$ . Построение изотерм зависимости  $\tau^{\text{эфф}} = \varphi(\eta / T)$  для зонда 5DSA в комплексе с наночастицами ShC при 10 и 18 °С позволило оценить эффективный радиус Стокса  $r$  спин-зонда в 0,25 нм, что хорошо соответствует известному размеру молекулы 5DSA. Также при экстраполяции изотерм  $\tau_c$  к нулевым значениям  $\eta/T$  имеем нулевые значения времени корреляции в пределах ошибки измерений, т. е. изотермы описываются законом Стокса. Это может означать, что при данных температурах подвижность спин-зонда не ограничена в заметной степени стерическими барьерами и близка к вращательному диффузионному пределу, а доступ сахарозы к спин-зонду не затруднен и она действует как вязкостный агент по отношению к его подвижности. Вместе с тем изотермы, снятые при более высоких температурах, дают отрицательные значения  $\tau_c$  при  $(\eta/T) \rightarrow 0$ . При этом существенно возрастает разброс экспериментальных точек: коэффициент корреляции  $R$  уменьшается с 0,99 до 0,86–0,94. Это означает, что при температурах выше 20 °С подвижность зонда хотя и зависит от присутствия сахарозы, но ограничена либо возникающими при этих температурах стерическими барьерами, либо доступом к зонду сахарозы, т. е. оказывает не связанное с механизмом вязкости влияние на динамику спин-зонда.

На рисунке 8 представлены зависимости параметра порядка  $S$  спин-зонда 5DSA в комплексе с наночастицами ShC от концентрации сахарозы. Во всех случаях имеем монотонное увеличение  $S$  с ростом концентрации сахарозы, причем принципиальных отличий в поведении зависимостей при разных температурах не наблюдается. Следовательно, сахароза при всех исследованных температурах оказывает влияние на подвижность зонда, определяющееся ее содержанием в среде. Очевидно, здесь реализуется другой механизм опосредованного воздействия содержания сахарозы на динамику зонда, возможно, наряду с вязкостным. И все же изменение характера отношения  $2a_0^N$  (рис. 7) при температуре около 20 °C указывает на то, что в системе происходят превращения в сфере взаимодействий зонда и растворителя.

На рисунке 9 в координатах Аррениуса представлены температурные зависимости частоты вращения спин-зонда  $1/\tau^{\text{эфф}}$  в бессахарозной дисперсии наночастиц ShC и при внесении в дисперсию сахарозы. Видно, что при отсутствии либо в присутствии 10 % сахарозы зависимости имеют форму сигмоиды вида  $1/(1 + \exp(-kT(t - t_0) / \lambda))$ , где  $t_0$  – температура перегиба линии,  $\lambda$  – эмпирический параметр,  $k$  – константа Больцмана. Экстраполяция линейными участками в диапазоне высоких  $t > t_0$  и низких  $t < t_0$  температур позволяет оценить энергию активации  $E_1 \approx 12,2$  кДж/моль, предэкспоненциальный множитель  $1/\tau_0 \approx 7 \cdot 10^{14}$  с.<sup>-1</sup> и  $E_2 \approx 7,5$  кДж/моль и  $1/\tau_0 \approx 2 \cdot 10^{13}$  с.<sup>-1</sup> соответственно. Форма сигмоиды заметно изменяется при внесении сахарозы. При концентрации 20 % зависимость становится линейной и характеризуется единым значением энергии активации, близким к значению для низкотемпературной зоны. При этом переход около 35 °C исчезает или сдвигается в диапазон более низких или более высоких температур. Зависимость сигмоидного типа может отражать распределение зонда между двумя динамическими состояниями.

## Обсуждение

Общий вид спектров ЭПР нерастворимого в воде спин-зонда 5DSA свидетельствует о том, что он хорошо сорбируется (связывается) не только с САБ, но и с НЧ ShC, т. е. НЧ имеют высокую сорбционную способность по отношению к стеариновой ЖК. Это обеспечивает достаточный для исследований интенсивный сигнал (спектр) ЭПР зонда.

Подвижность спин-зонда на НЧ ShC довольно велика и близка к вращательному диффузионному пределу, поскольку вычисленный по

параметрам спектра ЭПР радиус Стокса близок к молекулярным размерам зонда. Это говорит о быстрой вращательной диффузии зонда в водном окружении без стерических ограничений, а также об экспонированности зонда (его нитроксильной группы) в растворитель. При этом, судя по высоким значениям константы СТС  $a_0^N$ , образуется водородная связь нитроксильной группы  $\text{NO}^+$  с  $\text{H}_2\text{O}$ .

Введение любых добавок в дисперсию ShC (кислота, щелочь, NaCl, мочевины, сахароза, САБ) приводит к снижению подвижности (иммобилизации) зонда, хотя и в разной степени.

Судя по аррениусовским зависимостям частоты вращения (рис. 9), спин-зонд на НЧ ShC имеет более одного (минимум два) состояния, различающихся по подвижности, в зависимости от температуры и присутствия молекул растворенных в дисперсии веществ. Перераспределение между этими состояниями, вероятно, происходит при температуре около 20 °C (293 K), т. к. зависимости большинства параметров спектра ЭПР зонда имеют при этой температуре особенности: скачок константы СТС в области 20 °C, что может быть обусловлено изменением состояния гидратной оболочки, связанной с перестройкой системы водородных связей; переход к невязкостному характеру влияния сахарозы на время корреляции и параметр порядка. Такие особенности указывают на превращения в системе связей «зонд – растворитель» с участием Н-связи нитроксильной группы зонда  $\text{NO}^+$  с  $\text{H}_2\text{O}$ .

Основной эффект САБ на динамику зонда (исходя из формы спектров (рис. 1), характера насыщения спектров, отношения А/В (рис. 2)) в дополнение к тем, которые имеют место в присутствии только малых биологически значимых молекул и ионов, состоит в том, что происходит частичный перенос зонда между САБ и ShC. В результате устанавливается равновесие в распределении зонда по центрам связывания на белке и наноглереде. Уровень этого баланса определяется в первую очередь соотношением концентрация ShC и САБ. В это, судя по величинам константы  $a_0^N$  и деполяризации окружения зонда, определенный вклад вносит белковая корона, образующаяся за счет сорбции белка на НЧ при совместном присутствии белка и наноглереда в дисперсии. При этом состояние белка в короне отличается от состояния в растворе, т. к. степень деполяризации окружения зонда в составе комплекса белок – НЧ повышена.

Механизм иммобилизации зонда на НЧ в случае САБ и других биологически значимых молекул очевидно различен. В случае сахарозы, мочевины и ионов наиболее вероятно воздействие на

подвижность зонда через влияние на гидратацию НЧ. Это связано с тем, что все эти компоненты дисперсионной среды способны оказывать дегидратационное воздействие, взаимодействуя, например, по дефектным краям непланарных графеновых фрагментов и изменяя степень гидрофильности и поверхностную энергию наночастиц ShC. С другой стороны, эффект иммобилизации совершенно отсутствует при частичной дегидратации путем концентрирования дисперсии. Также вероятен вклад фактора коллоидной устойчивости дисперсии. Так, в щелочной среде при высоких pH дзета-потенциал наночастиц, как правило, велик (~40 мВ) и коллоидная устойчивость высокая. В кислой среде дзета-потенциал <30 мВ, устойчивость дисперсии значительно ниже и близка к границе устойчивости. Кроме того, однотипность изменений может быть обусловлена влиянием добавок на устойчивость прослоек дисперсионной среды (воды), препятствующих контакту гидрофобных поверхностей графеноподобного углерода. Это следует из того, что сахароза и NaCl способны повышать поверхностное натяжение и влиять на расклинивающее давление прослоек воды [Рожков, 1991], а мочевины и изменения pH влияют на состояние и прочность водородных связей. Это также может приводить к различию механизмов действия.

Механизм же иммобилизации в случае САБ связан с переносом части высокоподвижного зонда с НЧ ShC на САБ, где его подвижность ограничена по причине локализации в белковых полостях.

Таким образом, в смешанной дисперсии шунгитового наноуглерода и сывороточного альбумина возможен перенос жирной кислоты с белка на наноуглерод и наоборот в зависимости от соотношения их концентраций, то есть имеет место конкуренция белка и наноуглерода за жирную кислоту. При этом эффект наблюдается при концентрации ShC на два порядка меньше концентрации белка. Это означает возможность использования нанодисперсии шунгитового углерода для влияния на связывание и перенос жирной кислоты сывороточным альбумином, то есть для воздействия на транспортную функцию белка. Этот результат согласуется с данными, полученными нами методом дифференциальной сканирующей калориметрии для таких же смешанных дисперсий [Горюнов и др., 2016]. Более того, применение дополнительных растворенных веществ может позволить регулировать это влияние, как это наблюдается в случае с сахарозой (рис. 2).

В порядке обсуждения также необходимо отметить, что нелинейность либо сигмоидный характер аррениусовских зависимостей частоты

вращательной или поступательной диффузии спиновых зондов от температуры может свидетельствовать о наличии фазового перехода в таких системах, как это имеет место в полимерных растворах [Вассерман, Коварский, 1986] или растворах глобулярных белков [Rozhkov, Goryunov, 2012]. Активационные зависимости в координатах Аррениуса на рисунке 9 не имеют особенностей в диапазоне около 20 °С, в то время как на эту особенность указывают данные рисунка 7. Возможно, это обусловлено тем, что и кластеры, и метастабильная фаза существуют независимо в низкотемпературной области. При этом кластеры играют роль своего рода ПАВ [Щукин и др., 1982] для низкотемпературной фазы, если последняя представлена каплями микроскопических размеров. В этом случае формируется наноземля из кластеров, стабилизирующая эти капли более плотной метастабильной фазы. Поэтому исчезновение последней после 20 °С не влияет на динамику зонда. Вместе с тем точка перегиба активационных кривых в координатах Аррениуса наблюдается в диапазоне температур выше 305 К. Согласно предложенной нами ранее фазовой диаграмме (ФД) для дисперсии фуллеренов и ShC [Rozhkova et al., 2016], этот диапазон может соответствовать закритической (мезофазной) области ФД, в которой происходят структурно-динамические изменения раствора, соответствующие закономерностям закритического фазового перехода. В частности, можно предположить наличие линии Френкеля, разделяющей два различающихся по времени релаксации динамических состояния дисперсии ShC в закритической области [Brazhkin et al., 2012]. При этом промежуточное, коллоидное состояние мезофазы может быть представлено исключительно динамическими кластерами и различными олигомерами, получающимися в результате агрегации стопочных структур графеноподобного углерода.

## Заключение

При внесении различных по химической природе биологически значимых веществ в нанодисперсию ShC наблюдается иммобилизация структур на поверхности наночастиц ShC, в частности, происходят превращения в системе водородных связей спин-зонда с водой растворителя. При введении САБ в дисперсию ShC происходит взаимодействие с переносом лиганда: обмен спин-зондом на основе жирной кислоты между белком и наноуглеродом. Направление переноса и уровень баланса обмена определяются соотношением концентраций белка и наноуглерода, а также присутствием малых органических молекул (сахароза).

Особенности, наблюдаемые на зависимостях параметров спектра ЭПР спин-зонда 5DSA, могут быть связаны и с фазовыми превращениями в нанодисперсии в целом. По своему поведению дисперсии наночастиц ShC имеют некоторое сходство с мицеллярными системами, в которых истинная растворимость и критическая концентрация мицеллообразования молекул ВОГ чрезвычайно мала, но за счет объединения вытянутых стопок, обладающих дипольным моментом и полярными группами, в кластеры осуществляется экранирование неполярных поверхностей от прямого контакта с объемной водой. Это ведет к существенному снижению поверхностного натяжения, и существование таких кластеров становится термодинамически оправданно [Щукин и др., 1982]. Аналогичный эффект характерен и для белковых систем, хотя растворимость последних несравненно выше. Вероятно, обнаруженная рядом методов кластерная природа наночастиц ShC [Rozhkova et al., 2016] и глобулярных белков [Rozhkov, Goryunov, 2012] может находить свое отражение в нелинейности аррениусовских зависимостей энергии активации диффузии спиновых зондов в широком диапазоне температур. Изменение состояния гидратации может быть сопряжено с термоиндуцированным разрушением структур воды в метастабильной кристаллосольватной низкотемпературной фазе, обнаруженной нами ранее в диапазоне 1–18 °С, и переходом к кластерной форме организации при более высоких температурах. В ней сохраняются остатки молекул воды в полостях, обладающие более прочными водородными связями, в том числе с N-O<sup>•</sup> группой нитроксильных радикалов. Эти молекулы воды могут формировать структурный барьер, препятствующий непосредственному гидрофобному контакту неполярных участков наночастиц ShC.

*Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ 0221-2014-0010).*

## Литература

- Вассерман А. М., Коварский А. Л. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров. М.: Наука, 1986. 246 с.
- Горюнов А. С., Рожков С. П., Суханова Г. А., Борисова А. Г. Термодинамические эффекты взаимодействия сывороточного альбумина с шунгитовым нанокремнеземом // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 11. С. 33–38. doi: 10.17076/eb428
- Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974. 256 с.

Рожков С. П. Стабилизация белка сахарозой по данному методу спиновой метки // Биофизика. 1991. Т. 36, № 4. С. 571–576.

Рожкова Н. Н. Нанокремнезем шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.

Рожков С. П., Ковалевский В. В., Рожкова Н. Н. Фуллеренсодержащие фазы, получаемые из водных дисперсий наночастиц углерода // Журнал физической химии. 2007. Т. 81, № 6. С. 952–958.

Щукин Е. Д., Перцов А. В., Амелина Е. А. Коллоидная химия. М.: МГУ, 1982. 250 с.

Arcioni A., Vacchiocchi C., Grossi L. et al. Electron spin resonance study of order and dynamics in a nematic liquid crystal containing a dispersed aerosol // J. Phys. Chem. B. 2002. Vol. 106 (36). P. 9245–9251. doi: 10.1021/jp020554j

Brazhkin V. V., Fomin Yu. D., Lyapin A. G. et al. Two liquid states of matter: a dynamic line on a phase diagram // Physical Review. E. 2012. Vol. 85, no. 3. P. 031203. doi: 10.1103/PhysRevE.85.031203

Dhami A. K., Bhat S., Sharma A. et al. Spin probe ESR dynamics of single walled carbon nanotubes // Spectrochimica Acta. Part A. 2008. Vol. 69. P. 1178–1182. doi: 10.1016/j.saa.2007.06.034

Kim J. E., Han T. H., Lee S. H. et al. Graphene oxide liquid crystals // Angew. Chem. Int. Ed. 2011. Vol. 50. P. 3043–3047. doi: 10.1002/anie.201004692

Marsh D. Polarity and permeation profiles in lipid membranes // PNAS. 2001. Vol. 98, no. 14. P. 7777–7782. doi: 10.1073/pnas.131023798

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Salt induced thermodynamic instability, concentration heterogeneity and phase transitions in lysozyme solutions // Biophysical Chemistry. 2012. Vol. 170. P. 34–41. doi: 10.1016/j.bpc.2012.08.001

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon // Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamond. Vol. 1 / Ed. K. D. Sattler. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2016. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679–9

Sheka E. F., Rozhkova N. N. Fractals of graphene quantum dots in photoluminescence of shungite // Int. J. Smart Nano Math. 2014. Vol. 118, no. 5. P. 735–746. doi: 10.1134/S1063776114050161

Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D. et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide // Carbon. 2007. Vol. 45. P. 1558–1565. doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034

Wang Z., Zhu W., Qiu Y. et al. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials // Chem. Soc. Rev. 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Zhu C., Guo S., Fang Y. et al. Reducing sugar: New functional molecules for the green synthesis of graphene nanosheets // ACS Nano. 2010. Vol. 4. P. 2429–2437. doi: 10.1021/nn1002387

Xu Y., Watermann T., Limbach H.-H. et al. Water and small organic molecules as probes for geometric confinement in well-ordered mesoporous carbon materials // Phys. Chem. Chem. Phys. 2014. Vol. 16. P. 9327–9336. doi: 10.1039/C4CP00808A

Поступила в редакцию 20.07.2016

## References

Goryunov A. S., Rozhkov S. P., Sukhanova G. A., Borisova A. G. Termodinamicheskie jeffekty vzaimodejstvija syvorotochnogo al'bmina s shungitovym nanouglerodom [Thermodynamic effects of serum albumin interaction with shungite nanocarbon]. *Trudy KarNC RAN [Trans. of KarRC of RAS]*. 2016. No 11. P. 33–38. doi: 10.17076/eb428

Lihtenshtejn G. I. Metod spinovyh metok v molekulyarnoj biologii [Spin label technique in molecular biology]. Moscow: Nauka, 1974. 256 p.

Rozhkov S. P. Stabilizacija belka saharozoj po danym metoda spinovoj metki [Protein stabilization by sucrose according to the data of spin label technique]. *Biofizika [Biophysics]*. 1991. Vol. 36, no. 4. P. 571–576.

Rozhkova N. N. Nanouglerod shungitov [Shungite nanocarbon]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2011. 100 p.

Rozhkov S. P., Kovalevskij V. V., Rozhkova N. N. Fullerenosoderzhashhie fazy, poluchaemye iz vodnyh dispersij nanochastich ugleroda [Fullerene-containing phases obtained from aqueous dispersion of carbon nanoparticles]. *Zhurnal fizicheskoy himii [Russian Journal of Physical Chemistry]*. 2007. Vol. 81, no. 6. P. 952–958. doi: 10.1134/S0036024407060209

Shhukin E. D., Percov A. V., Amelina E. A. Kolloidnaja himija [Colloid Chemistry]. Moscow: MGU, 1982. 250 p.

Wasserman A. M., Kovarsky A. A. Spinovye metki i zondy v fizikohimii polimerov [Spin labels and probes in polymer physicochemistry]. Moscow: Nauka, 1986. 246 p.

Arcioni A., Bacchiocchi C., Grossi L. et al. Electron spin resonance study of order and dynamics in a nematic liquid crystal containing a dispersed aerosol. *J. Phys. Chem. B*. 2002. Vol. 106 (36). P. 9245–9251. doi: 10.1021/jp020554j

Brazhkin V. V., Fomin Yu. D., Lyapin A. G. et al. Two liquid states of matter: a dynamic line on a phase diagram. *Physical Review. E*. 2012. Vol. 85, no. 3. P. 031203. doi: 10.1103/PhysRevE.85.031203

Dhami A. K., Bhat S., Sharma A. et al. Spin probe ESR dynamics of single walled carbon nanotubes.

*Spectrochimica Acta. Part A*. 2008. Vol. 69. P. 1178–1182. doi: 10.1016/j.saa.2007.06.034

Kim J. E., Han T. H., Lee S. H. et al. Graphene oxide liquid crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. Vol. 50. P. 3043–3047. doi: 10.1002/anie.201004692

Marsh D. Polarity and permeation profiles in lipid membranes. *PNAS*. 2001. Vol. 98, no. 14. P. 7777–7782. doi: 10.1073/pnas.131023798

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Salt induced thermodynamic instability, concentration heterogeneity and phase transitions in lysozyme solutions. *Biophysical Chemistry*. 2012. Vol. 170. P. 34–41. doi: 10.1016/j.bpc.2012.08.001

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon. Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamond. Vol. I. Ed. K. D. Sattler. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2016. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

Sheka E. F., Rozhkova N. N. Fractals of graphene quantum dots in photoluminescence of shungite. *Int. J. Smart Nano Math*. 2014. Vol. 118, no. 5. P. 735–746. doi: 10.1134/S1063776114050161

Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D. et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*. 2007. Vol. 45. P. 1558–1565. doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034

Wang Z., Zhu W., Qiu Y., Yi X., von dem Bussche A., Kane A., Gao H., Koski K., Hurt R. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Zhu C., Guo S., Fang Y. et al. Reducing sugar: New functional molecules for the green synthesis of graphene nanosheets. *ACS Nano*. 2010. Vol. 4. P. 2429–2437. doi: 10.1021/nn1002387

Xu Y., Watermann T., Limbach H.-H. et al. Water and small organic molecules as probes for geometric confinement in well-ordered mesoporous carbon materials. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014. Vol. 16. P. 9327–9336. doi: 10.1039/C4CP00808A

Received July 20, 2016

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru

### Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,  
Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 765264

## CONTRIBUTORS:

### Rozhkov, Sergey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

### Goryunov, Andrey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 765264