

УДК 546.26 ≅ 54.3: 54-148: 577.352.3

## МОРФОЛОГИЯ И АГРЕГАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В НАНОДИСПЕРСИЯХ УГЛЕРОДА

А. С. Горюнов<sup>1</sup>, А. Г. Борисова<sup>1</sup>, С. П. Рожков<sup>1</sup>,  
Г. А. Суханова<sup>1</sup>, Н. Н. Рожкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии Карельского научного центра РАН

<sup>2</sup> Институт геологии Карельского научного центра РАН

Эффекты водных нанодисперсий шунгитового углерода в отношении морфологии и цитоархитектоники эритроцитов человека и норки исследовались методом сканирующей электронной микроскопии в образцах клеток, фиксированных глутаральдегидом с напылением углерода. Показано, что изменения формы эритроцитов в суспензии под действием нанодисперсного шунгитового углерода имели необратимый характер, тогда как изменения степени агрегации клеток были обратимыми и наблюдались только в присутствии наноуглерода. Обнаруженный эффект объясняется образованием комплексов наночастиц углерода с белками мембраны эритроцитов.

Ключевые слова: шунгитовый наноуглерод; наночастица; нанодисперсия; эритроцит; клеточная мембрана; белок; сканирующая электронная микроскопия.

**A. S. Goryunov, A. G. Borisova, S. P. Rozhkov, G. A. Sukhanova,  
N. N. Rozhkova. MORPHOLOGY AND AGGREGATION OF ERYTHROCYTES  
IN CARBON NANODISPERSIONS**

The effect of shungite carbon nanostructures on morphology and cytoarchitectonics of mink erythrocytes in samples representing cells treated with glutaraldehyde and then sprayed with carbon, has been studied using scanning electron microscopy. Changes in the shape of erythrocytes on addition of shungite nanodispersion to the cell suspension and on further washing off of carbon nanoparticles appeared to be irreversible, whereas alterations in aggregation of erythrocytes were observed only in the presence of nanocarbon. The effect was assumed to be caused by formation of complexes of carbon nanoparticles with membrane proteins.

Key words: shungite nanocarbon; nanoparticles; nanodispersion; erythrocyte; cell membrane; protein; scanning electron microscopy.

### Введение

Все более широкое использование наноматериалов, в том числе наночастиц и нанодисперсий, в производстве продукции бытового, гигиенического и промышленного назначения требует тщательной оценки возможных биологиче-

ских рисков [Bharali et al., 2005; Panessa-Warren et al., 2009]. Одной из наиболее распространенных тест-систем для характеристики действия биологически активных соединений на клеточном и субклеточном уровне остаются эритроциты. Цель настоящей работы состояла в обнаружении и характеристике эффектов нанострук-

тур шунгитового углерода (ШУ) в отношении морфологии и цитоархитектоники эритроцитов *in vitro* на примере клеток человека и норки.

## Материал и методы

В качестве объектов исследований использовались эритроциты человека и американской норки (*Mustela Neovison*, ЗАО «Пряжинское», Республика Карелия). Для исследования влияния углеродных наночастиц на состояние клеточной мембраны в суспензии эритроцитов человека и норки *in vitro* вводились дисперсии шунгитового наноглерода в виде коллоидного раствора (ШК), приготовленного по методике Г. В. Андриевского [Andrievsky et al., 1995], разработанной для фуллеренов. Влияние нанодисперсий углерода на морфологию эритроцитов изучали в диапазоне концентраций наночастиц от 3 до 50 мкг/мл.

Эритроциты суспендировались в физиологическом растворе, содержащем наночастицы в различных концентрациях. Контрольные и исследуемые образцы инкубировались при комнатной температуре либо при повышенных температурах в течение определенного времени. Для исследования цитоархитектоники эритроцитов с помощью сканирующей электронной микроскопии препараты эритроцитов фиксировались в 1% растворе глутарового альдегида (Fluka) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем препарат отмывался водой. Взвесь клеток, нанесенная на стеклянные пластинки, высушивалась на воздухе и напылялась углеродом. Препараты просматривались с помощью сканирующего электронного микроскопа T-Scan (Чехия) при увеличении 2000–2500. Для получения количественной характеристики распределения морфологических форм эритроцитов в каждом препарате подсчет клеток проводился в процентах на 200–300 эритроцитов, среди которых выявлялись отдельные формы.

Для оценки формы клеток использовалась классификация Г. И. Козинца и соавт. [1977], согласно которой эритроциты здоровых доноров подразделяются на 10 типов. При этом дискоциты с одним или множественными выростами, дискоциты с гребнем, эритроциты в виде тутовой ягоды (эхиноциты) относят к обратимо деформированным, т. е. способным спонтанно восстанавливать свою форму, а куполообразные эритроциты, гладкие сфероциты, сфероциты с выростами и эритроциты в виде «спущенного мяча» (стоматоциты), а также дегенеративные формы принято считать необратимо деформированными, т. е. предгемолитическими формами.

## Результаты и обсуждение

*Эритроциты человека в нанодисперсии шунгитового углерода.* На рис. 1 приведена микрофотография контрольного образца эритроцитов человека. Видно, что основная масса этих клеток представлена дискоцитами. Кроме дискоцитов были выявлены и иные присутствующие в норме известные формы эритроцитов – эхиноциты, стоматоциты и некоторые другие.

Ранее нами было показано, что количественное распределение отдельных морфологических форм красных клеток крови под влиянием дисперсии гидратированного фуллерена в концентрации 3–6 мкг/мл менялось в зависимости от времени инкубации клеток [Borisova et al., 2005]. Увеличение доли эхиноцитов в присутствии фуллеренов указывает на эхиноцитогенность последних. Вероятно, наночастицы фуллерена, будучи гидрофобными и отрицательно заряженными, вызывают увеличение отрицательного заряда во внешнем монослое мембраны, что приводит к изменению формы эритроцита. Кроме того, при взаимодействии с мембраной эритроцита фуллерены, возможно, способны встраиваться в нее, перераспределяясь между внутренним и внешним монослоями, и вызывать структурные изменения мембраны. Повышение доли эхиноцитов, видимо, связано с тем, что частицы накапливаются преимущественно в наружном слое мембраны, тем самым расширяя его.

Водные дисперсии шунгитового углерода имеют средний радиус частиц по данным динамического светорассеяния 95 нм, просвечивающей электронной микроскопии и малоуглового нейтронного рассеяния – 10–100 нм, атомно-силовой микроскопии – 63 нм [Rozhkova et al., 2007]. Шунгитовый углерод можно рассматривать как наномасштабную двухуровневую структуру с фуллереноподобными элементами размером в десятки и сотни нанометров, покрытую базовыми элементами 0,5 нм (так называемые «чашки») [Рожкова и др., 2005]. Эти структуры образуют трехмерную сетку из наночастиц углерода в результате их метаморфизма в водной среде.

Полученные данные позволяют предполагать, что наночастицы углерода с различной эффективностью способны вызывать трансформацию части эритроцитов из дискоидной формы в клетки с наружными выростами либо в стоматоциты. Данные рис. 1 и табл. 1 свидетельствуют о том, что в концентрации 3 и 7 мкг/мл ШК лишь незначительно влиял на форму клеток после инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре.

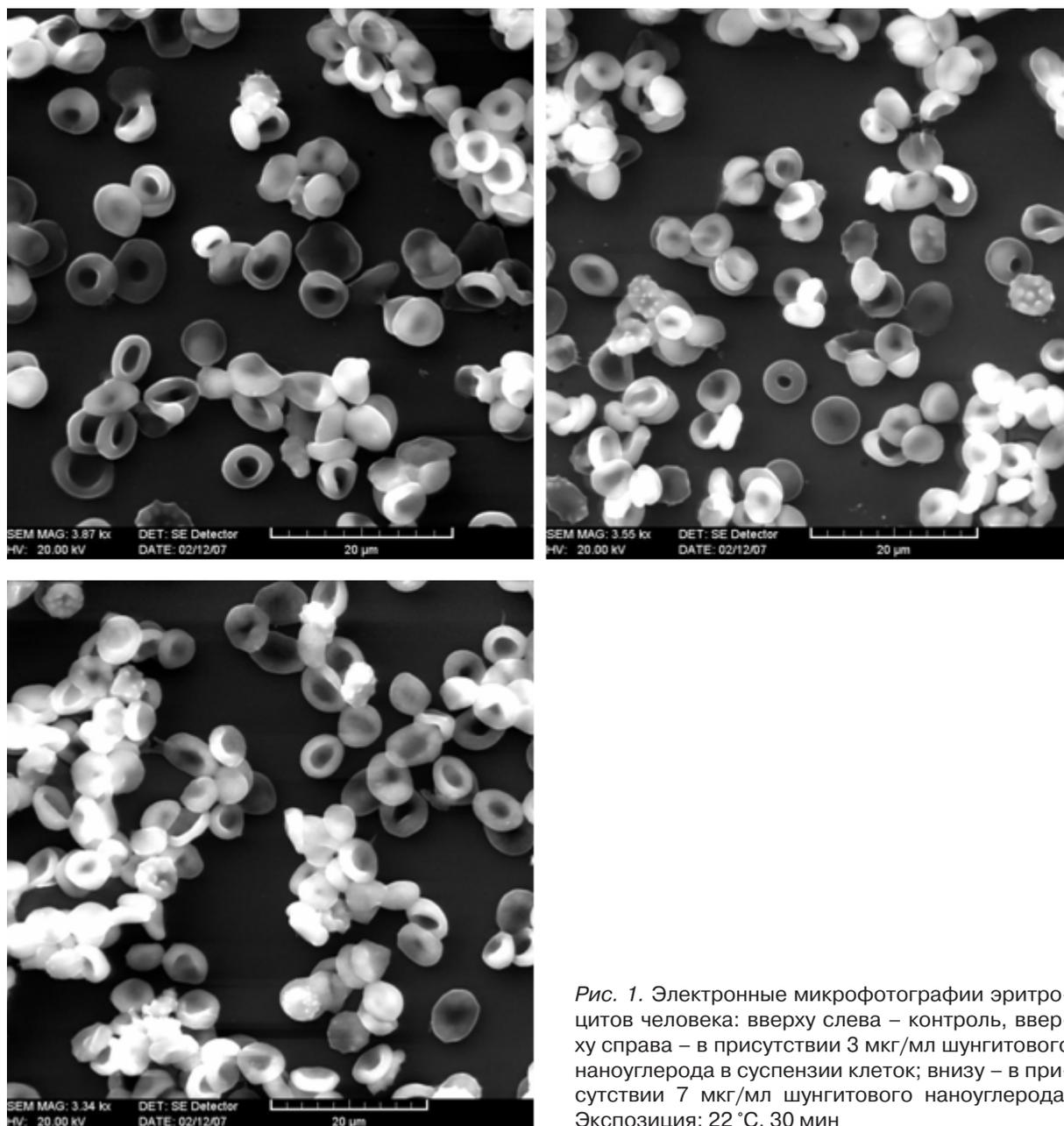


Рис. 1. Электронные микрофотографии эритроцитов человека: вверху слева – контроль, вверху справа – в присутствии 3 мкг/мл шунгитового наноуглерода в суспензии клеток; внизу – в присутствии 7 мкг/мл шунгитового наноуглерода. Экспозиция: 22 °С, 30 мин

Таблица 1. Морфологический состав эритроцитов человека (%) в зависимости от концентрации наночастиц шунгитового углерода (экспозиции: 30 мин, 22 °С)

Формы эритроцитов	Контроль	3 мкг/мл ШН	7 мкг/мл ШН
Дискоциты	68,5 ± 0,2	68,4 ± 0,2	67,3 ± 0,2
Со множественными выростами + ребристые	9,6 ± 0,1	10,9 ± 0,1	12,9 ± 0,1
Стоматоциты + куполообразные	9,7 ± 0,1	11,0 ± 0,1	9,6 ± 0,1
Эхиноциты	1,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2
Вытянутые и плоские	10,5 ± 0,1	9,2 ± 0,1	9,7 ± 0,1

Примечание. Здесь и в табл. 2–3: ШН – шунгитовый наноуглерод.

Заметна тенденция к увеличению доли клеток со множественными выростами в зависимости от концентрации шунгитового коллоида. Доля эхиноцитов при этом существенно снижалась. Очевидно, ШК в отличие от фуллерена не проявляет эхиноцитогенности.

Вероятно, наночастицы шунгитового углерода могут оказывать опосредованное действие. Будучи также гидрофобными и имея в своем составе базовый структурный элемент, несущий дипольный момент, при сближении с мембраной они могут с ней взаимодействовать, вызывая перераспределение липидов вдоль мембраны и структурные изменения. Появление множественных выростов может быть следствием накопления частиц преимущественно у

наружного слоя мембраны и сопутствующего ему растяжения.

Микроизображения (рис. 1) позволяют также обнаружить другую важную тенденцию изменения состояния эритроцитов в присутствии углеродных наночастиц. Видно, что в образцах, содержащих ШК, значительно более выражена агрегация дискоцитов. В образце с 7 мкг/мл ШК почти все клетки находятся в составе более или менее крупных скоплений. Эти агрегаты не представляют собой обычные для эритроцитов в кровяном русле комплексы – «монетные столбики», т. е. не являются физиологическими агрегатами. Они имеют вид гроздьев, и у них отсутствует определенная структура. Таким образом, этот результат показывает, что введение ШК в суспензию дискоцитов человека вызывает агрегацию клеток по типу скупивания.

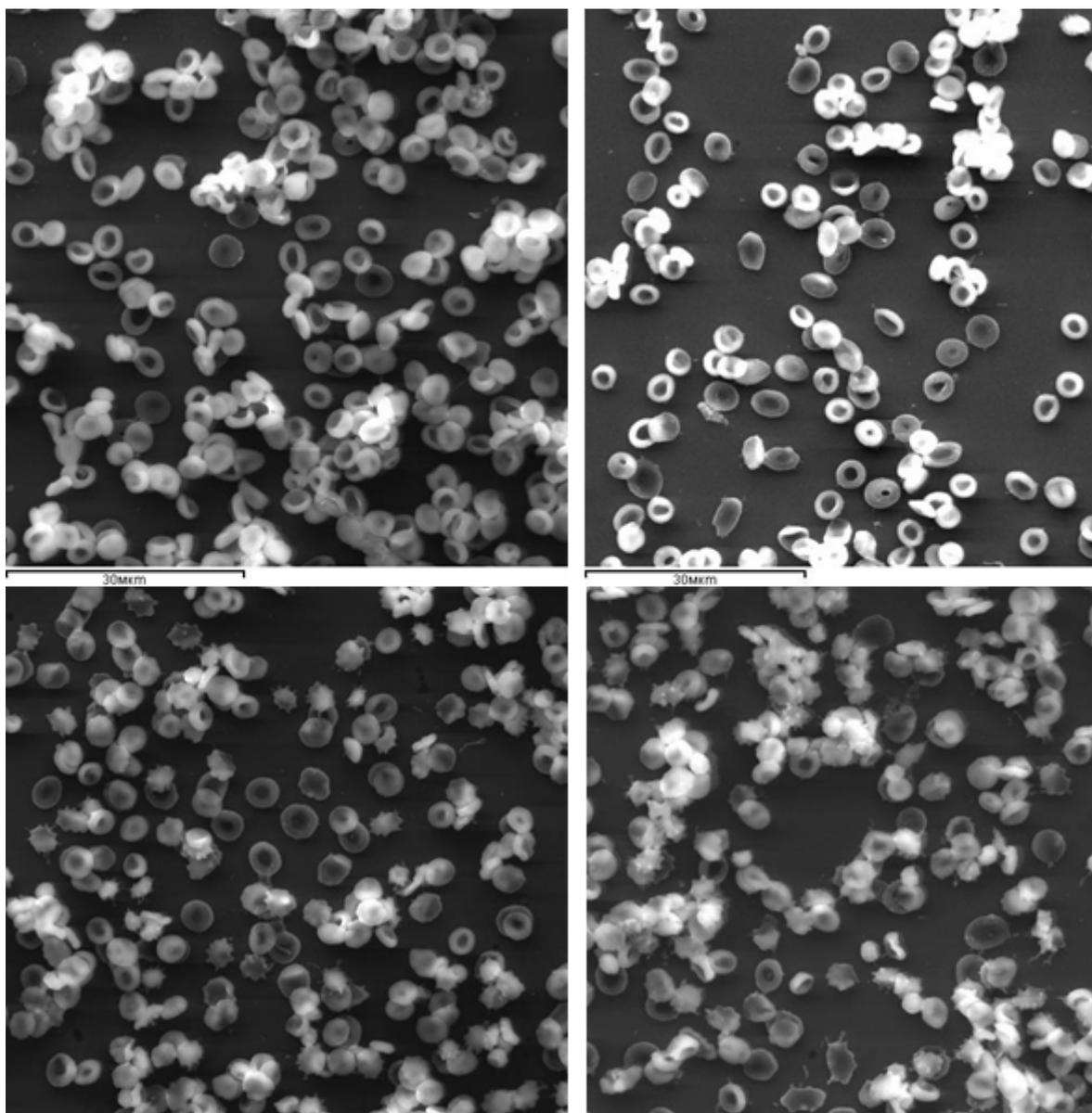
В экспериментах по влиянию повышенных температур и концентраций ШК на цитоархитектонику эритроцитов в суспензию клеток добавляли 50 мкг/мл ШК, инкубировали при температурах 34, 37, 40, 43 и 47 °С также в течение 30 мин, затем образцы фиксировали в растворе 1% глутарового альдегида и дальнейшие процедуры проводили, как описано выше. Результаты эксперимента представлены в табл. 2. На рис. 2 представлены микрофотографии эритроцитов при 37 и 47 °С. Эти данные показывают, что при нагреве суспензии клеток соотношение различных форм эритроцитов меняется как в контроле, так и в присутствии ШК. Так, в интервале 34–43 °С доля дискоцитов несколько возрастает, а затем при повышении температуры до 47 °С существенно снижается (рис. 2). Доля дискоцитов со множественными выростами и ребристых, а также эхиноцитов в интервале 34–43 °С снижается, а затем в интервале 43–47 °С резко возрастает (рис. 2). Известно, что при 43 °С наблюдается термоиндуцированный структурный переход в комплексе белков спектин-актин цитоскелета эритро-

цита. Состояние спектринового цитоскелета определяет цитоархитектонику эритроцита и, в свою очередь, форму клетки. В связи с этим полученные данные можно считать прямым указанием на то, что температурные изменения морфологии эритроцитов в диапазоне 34–47 °С обусловлены структурными термопереходами денатурационного характера белков цитоскелета эритроцита.

В результате исследования изменений цитоархитектоники эритроцитов в зависимости от температуры, начиная с диапазона 37–39 °С, обнаружено резкое уменьшение содержания дискоцитов (от  $90 \pm 5\%$  до  $65 \pm 2\%$  при 47 °С) и увеличение числа других форм эритроцитов, среди которых доминировали эритроциты со множественными выростами (рост с 4%, соответственно, при температурах до 39 °С до 16% при температуре 47 °С). В присутствии ШК (50 мкг/мл) изменений в пропорциях различных форм при соответствующих температурах по сравнению с контролем не отмечено, за исключением эхиноцитов, доля которых в контроле возросла с 1 до 7% в диапазоне 39–47 °С, а в присутствии ШК осталась прежней в этом же температурном интервале. В интервале 34–38 °С доля дискоцитов была больше в суспензии, содержащей 50 мкг/мл ШК. Выше 43 °С наблюдался существенный рост количества эритроцитов со множественными выростами и куполообразных клеток, при этом число дискоцитов снижалось. Присутствие 50 мкг/мл ШК в суспензии практически не влияло на направленность этих изменений, но, тем не менее, можно обнаружить возрастание доли эритроцитов со множественными выростами с 1 до 6%, а также уменьшение доли куполообразных клеток до 4,8% при 37 °С по сравнению с контролем (8,5%) при 37 °С (табл. 2). В контроле максимальная доля стоматоцитов и куполообразных клеток наблюдалась при 37 °С, при дальнейшем нагреве она снижалась, но была заметно выше, чем при 34 °С.

Таблица 2. Морфологический состав эритроцитов человека (%) в присутствии шунгитового нанокремнезема в зависимости от температуры (экспозиция: 30 мин)

Формы эритроцитов	Контроль					50 мкг/мл ШК				
	Температура, °С									
	34	37	40	43	47	34	37	40	43	47
Дискоциты ( $\pm 0,2$ )	71,4	77,4	81,1	80,1	60,0	78,0	82,0	76,0	85,1	62,7
Дискоциты со множественными выростами + ребристые ( $\pm 0,3$ )	12,5	1,6	2,7	3,7	19,6	8,7	7,0	4,4	2,9	16,9
Эхиноциты ( $\pm 0,2$ )	0,5	0,2	0	0,7	7,1	1,2	0	0,6	0,5	5,3
Вытянутые + плоские ( $\pm 0,1$ )	10,1	4,8	6,0	4,8	2,5	7,9	4,4	5,6	5,2	3,0
Стоматоциты + куполообразные ( $\pm 0,2$ )	5,5	16	10,2	10,7	10,8	4,2	6,6	13,4	6,3	12,1



*Рис. 2.* Электронные микрофотографии эритроцитов человека: вверху слева – контроль при 37 °С; вверху справа – 50 мкг/мл шунгитового наноглерода в суспензии клеток при 37 °С; внизу слева – контроль при 47 °С; внизу справа – 50 мкг/мл шунгитового наноглерода при 47 °С. Экспозиция: 30 мин

Таким образом, характер изменений в соотношении различных форм красных клеток крови в температурном интервале 34–47 °С в присутствии наночастиц ШУ (концентрация 50 мкг/мл, выдерживали 30 мин) оставался практически одинаковым: с повышением температуры снижалась доля дискоцитов, увеличивалось количество эритроцитов со множественными выростами и куполообразных эритроцитов. Исключение составили эхиноциты (эритроциты в форме тутовой ягоды) – в контроле их доля значительно увеличивалась при температуре выше 43 °С, а в присутствии частиц ШУ практически не менялась в исследуемом температурном интервале.

Доля куполообразных клеток в контроле и в присутствии 50 мкг/мл ШК (табл. 2) возрастает в интервале 34–40 и 43–47 °С и резко снижается в интервале 40–43 °С. Это вновь указывает на то, что состояние спектринового цитоскелета и его термопереход при 43 °С существенным образом влияют на морфологию эритроцитов. Из табл. 2 также видно, что при температурах ниже 43 °С дискоциты являются абсолютно преобладающими по сравнению с остальными формами. При температурах выше 43 °С значительной становится доля эритроцитов со множественными выростами и ребристых, а также куполообразных клеток. Из рис. 2 следует, что при 37 °С введение ШК в суспензию сни-

жает агрегацию клеток, при 37 °С это главным образом дискоциты. При 47 °С, напротив, введение ШК приводит к усилению агрегации, в этом случае – разных форм.

Все это позволяет предположить, что наночастицы по-разному воздействуют на агрегацию клеток с различным структурным состоянием спектринового цитоскелета. Воздействие ШК на клетки с нативным актин-спектриновым комплексом (при физиологической температуре 37 °С) ослабляет их агрегацию. При повышенных температурах 47 °С, когда спектрин денатурировал, ШК способствует агрегации клеток. Можно допустить, что влияние наночастиц различно также и в отношении разных форм: они ослабляют агрегацию дискоцитов, но способствуют агрегации эритроцитов с выростами. Поскольку известно, что форма эритроцитов в значительной степени зависит от жесткости белковой сети цитоскелета, то можно предположить, что определенные количественные различия в соотношении морфологических форм этих клеток в присутствии ШУ (в исследованном температурном интервале) могут быть связаны с влиянием наночастиц углерода на белок-белковые взаимодействия в цитоскелете.

*Эритроциты норки в нанодисперсии шунгитового углерода.* Суспензию эритроцитов норки инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре с 10 мкг/мл ШК. В результате доля дискоцитов несколько возросла, а число клеток со множественными выростами и куполообразных эритроцитов снижалось (табл. 3). Для выяснения степени обратимости изменений морфологии клетки отмывали от шунгитового коллоида физиологическим раствором (трехкратное центрифугирование при 3000 об/мин в течение 10 мин). Это приводило к значительному возрастанию доли куполообразных клеток – до 28 % (в контроле – 4 %) и плоских форм – до 13 % (против 4 % в контроле), т. е. изменения формы клеток оказались не только необратимыми, но и очевидно связанными с модификацией свойств мембраны: ее организации и/или проницаемости.

На рис. 3 представлены микрофотографии эритроцитов норки. Видно, что в исходной суспензии абсолютно преобладают дискоциты. Введение нанодисперсии ШК в суспензию клеток, как и в случае эритроцитов человека, приводит к образованию агрегатов из дискоцитов. Эти агрегаты тоже имеют вид скопленных, гроздьев, и у них отсутствует определенная структура. Видно также, что при отмывании клеток от ШК происходит дезагрегация. В от-

Таблица 3. Морфологический состав эритроцитов норки (%) под влиянием шунгитового наночуглерода (экспозиция: 3 ч, 22 °С)

Формы эритроцитов	Контроль	10 мкг/мл ШН	10 мкг/мл ШН (отмытые)
Дискоциты	75,6 ± 0,2	81,5 ± 0,2	56,6 ± 0,2
С одиночными и множественными выростами и с гребнем	14,2 ± 0,2	10,5 ± 0,2	0,3 ± 0,2
Стоматоциты + куполообразные	5,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	30,1 ± 0,1
Эхиноциты	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0 ± 0,1
Плоские	4,4 ± 0,1	4,1 ± 0,1	13,0 ± 0,2

мытом состоянии после взаимодействия с нанодисперсией клетки изменяют свою форму: они представлены преимущественно стоматоцитами. Последние же образуют небольшое количество агрегатов уже физиологического типа, имеющих вид «монетных столбиков». Эти микроизображения эритроцитов норки позволяют обнаружить несколько новых обстоятельств. Во-первых, дезагрегация в результате отмывки означает, что агрегация под действием наночастиц обратима. Во-вторых, обратимость агрегации указывает на то, что взаимодействие наночастиц с клетками представляет собой непрочную физическую адсорбцию на поверхности и не состоит во встраивании в мембрану на уровне бислоя; иначе эффект не был бы таким нестойким, т. е. связывание наночастиц с клетками также обратимо. В-третьих, эффект, вероятно, не связан с таким явлением, как автоокисление гемоглобина, которое возможно в присутствии наночастиц как анти/прооксиданта, поскольку такое автоокисление необратимо.

Таким образом, воздействие наночастиц на поведение клеток состоит во влиянии на их агрегацию, так же как и в случае белковых макромолекул в растворе. Очевидно, и механизм воздействия состоит во влиянии на поверхностные белки эритроцитов, которые, агрегируя в присутствии наночастиц, вызывают и агрегацию самих клеток. Происходящие под действием молекул гидратированных углеродных наночастиц морфологические изменения эритроцитов, которые состоят в увеличении доли отличающихся устойчивостью к различным физико-химическим воздействиям деформированных форм, имели второстепенный характер. Исходя из приведенных данных можно полагать, что углеродные наночастицы способны значительно модифицировать состояние эритроцитов, причем проявление этого действия зависит от концентрации наночастиц и температуры, при которой инкубируются клетки.

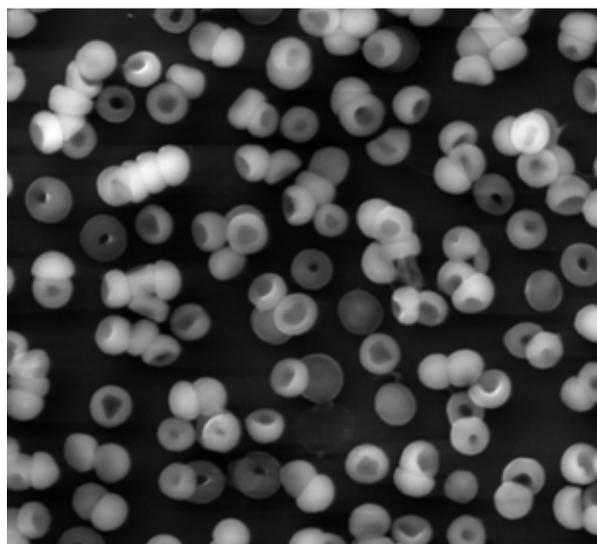
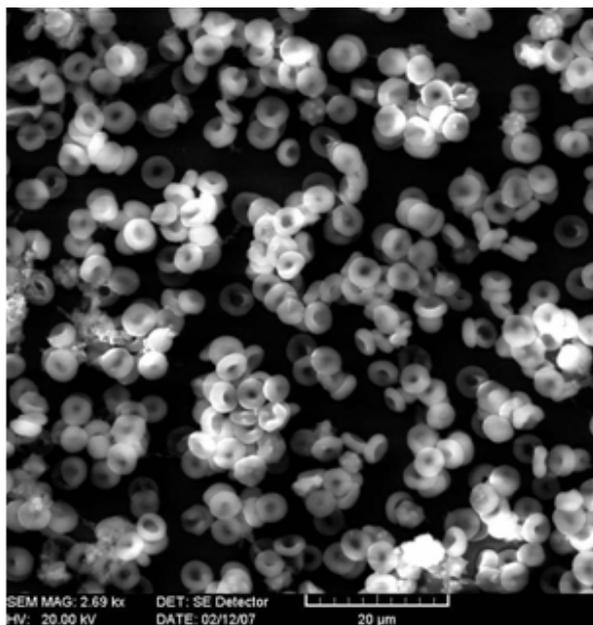
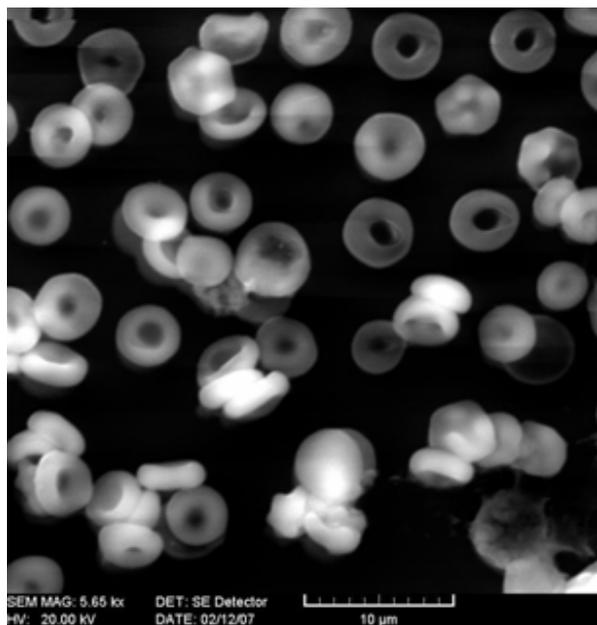


Рис. 3. Электронные микрофотографии эритроцитов норки: сверху слева – контроль; сверху справа – в присутствии 10 мкг/мл шунгитового наноуглерода в суспензии клеток; внизу – 10 мкг/мл шунгитового наноуглерода (после отмывания клеток от наноуглерода). Экспозиция: 22 °С, 3 ч

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Института геологии Карельского НЦ РАН А. Н. Терновому и А. Н. Сафронову за помощь в получении электронномикроскопических изображений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-98825).

## Литература

- Козинец Г. И., Ряполова И. В., Шишканова З. Г. и др. Морфологическая характеристика эритроцитов периферической крови здоровых людей (сканирующая электронная микроскопия) // Проблемы гематологии и трансфузиологии. 1977. Т. 22, № 7. С. 19–21.
- Рожкова Н. Н., Голубев Е. А., Сиклицкий В. И., Байдакова М. В. Структурная организация фуллереноподобного шунгитового углерода // Фуллерены и фуллереноподобные структуры / Ред. П. А. Витязь и др. Минск: ИТМО БАН, 2005. С. 100.

Andrievsky G. V., Kosevich M. V., Vovk O. M. et al. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. Vol. 12. P. 1281–1282.

Bharali D. J., Klejbor I., Stachowiak E. K. et al. Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2005. Vol. 102. P. 11539–11544.

Borisova A. G., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. et al. The effect of hydrated fullerenes on erythrocyte membrane // Hydrogen Materials Science & Chemistry of Carbon Nanomaterials (ICHMS'2005): proceedings of IX International Conference (Sevastopol, Crimea, Ukraine, September 5–11, 2005). P. 946–947.

Panessa-Warren B. J., Maye M. M., Warren J. B., Crosson K. M. Single walled carbon nanotube reactivity and cytotoxicity following extended aqueous exposure // Environ Pollut. 2009. Vol. 157, N 4. P. 1140–1151.

Rozhkova N. N., Gribanov A. V., Khodorkovskii M. A. Water mediated modification of structure and physical chemical properties of nanocarbons // Diamond and Related Materials. 2007. Vol. 16. P. 2104–2108.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### **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

### **Борисова Александра Григорьевна**

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

### **Рожков Сергей Павлович**

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

### **Суханова Галина Антоновна**

главный физик  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: sukhanova@krc.karelia.ru  
тел. (8142) 765264

### **Рожкова Наталья Николаевна**

зав. лаб. физико-химических исследований  
наноуглеродных материалов, к. т. н.  
Институт геологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: rozhkova@krc.karelia.ru  
тел. (8142) 780189

### **Goryunov, Andrey**

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

### **Borisova, Alexandra**

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

### **Rozhkov, Sergey**

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

### **Sukhanova, Galina**

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

### **Rozhkova, Natalia**

Institute of Geology, Karelian Research Centre, Russian  
Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: rozhkova@krc.karelia.ru  
tel. (8142) 7801889