

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616-006.487-06:616.419-033.2]:577.117.2:577.21

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-216-221>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

Е. В. Кушнерова, И. В. Пахомова, И. В. Пролесковская

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минский район, Республика Беларусь*

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *TH* И *PHOX2B* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ

Аннотация. Несмотря на применение комплексного лечения, выживаемость пациентов группы высокого риска при нейробластоме не превышает 50 %, при этом основная причина смертельных исходов – развитие рецидива заболевания. Ключевыми факторами неблагоприятного прогноза в отношении выживаемости и частоты развития рецидивов являются поражение костного мозга (КМ), а также наличие минимальной остаточной болезни на различных этапах терапии.

Наиболее перспективным методом, позволяющим с высокой чувствительностью и специфичностью (за счет комбинации молекулярных маркеров) выявлять клетки нейробластомы в образцах КМ является ПЦР в режиме реального времени. В данной работе нами разработан метод оценки экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* для детекции метастатического поражения КМ при нейробластоме. Разработанный метод обладает высокой чувствительностью ($1 \cdot 10^{-4}$) и специфичностью к опухолевым клеткам. Экспрессия генов *TH* и *PHOX2B* оценена у 67 пациентов детского возраста с нейробластомой на момент постановки диагноза. Показано наличие клинического значения оценки экспрессии генов *TH* и *PHOX2B*, что проявляется достоверно худшими показателями общей и безрецидивной выживаемости в группе пациентов с гиперэкспрессией детектируемых генов. Разработанный метод может быть использован в клинической практике как для оценки степени поражения КМ, так и для стратификации пациентов по группам риска на момент постановки диагноза.

Ключевые слова: нейробластома, *TH*, *PHOX2B*, ПЦР в режиме реального времени, общая выживаемость, бессобытийная выживаемость

Для цитирования: Кушнерова, Е. В. Оценка экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* с использованием ПЦР в режиме реального времени для диагностики метастатического поражения костного мозга при нейробластоме / Е. В. Кушнерова, И. В. Пахомова, И. В. Пролесковская // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 216–221. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-216-221>

L. V. Kushniarova, I. V. Pakhomava, I. V. Praliaskouskaya

Republican Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk region, Republic of Belarus

EVALUATION OF *TH* AND *PHOX2B* GENE EXPRESSION BY REAL TIME PCR FOR DIAGNOSTIC OF BONE MARROW METASTATIC LESION IN NEUROBLASTOMA PATIENTS

Abstract. Despite on using the use of complex treatment, the survival of high risk neuroblastoma patients doesn't exceed 50 % with relapse as the main cause of death. The bone marrow (BM) lesion and presence of minimal residual disease at various stages of therapy are key factors of poor outcome and high frequency of relapse.

Real time PCR is the most promising method for detecting neuroblastoma cells in BM samples due to the high sensitivity and specificity, which achieved by combination of several molecular markers. In this study we developed a method for evaluation *TH* and *PHOX2B* expression for monitoring metastatic BM lesion in neuroblastoma patients. This method has high sensitivity ($1 \cdot 10^{-4}$) and specificity to tumor cells. Evaluation of *TH* and *PHOX2B* gene expression was performed for 67 children with neuroblastoma at the time of diagnosis. We demonstrated that patients with overexpression of these genes has significantly worse overall and relapse-free survival. So, the developed method can be used in clinical practice for evaluation BM lesion degree as well as for risk group stratification in neuroblastoma patients at the time of diagnosis.

Keywords: neuroblastoma, *TH*, *PHOX2B*, minimal residual disease, real-time PCR

For citation: Kushniarova L. V., Pakhomava I. V., Praliaskouskaya I. V. Evaluation of *TH* and *PHOX2B* gene expression by real time PCR for diagnostic of bone marrow metastatic lesion in neuroblastoma patients. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 216–221 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-216-221>

Введение. Нейробластома (НБ) является злокачественной эмбриональной опухолью симпатической нервной системы, которая составляет 10 % от всех детских онкологических заболеваний. Возраст более 1 года и наличие метастатического поражения костного мозга (КМ) на момент постановки диагноза служат основанием для отнесения пациентов к группе высокого риска, общая выживаемость (ОВ) в которой не превышает 40–50 %. Около 50 % пациентов, достигших ремиссии, рецидивируют в течение 5 лет с момента постановки диагноза. Рецидив происходит в результате активации остаточных опухолевых клеток, которые могут присутствовать как в месте локализации первичной опухоли, так и в сайтах метастазирования [1].

Оценка поражения КМ во время постановки диагноза и в ходе терапии позволяет контролировать эффективность лечения и определять группу с высоким риском развития рецидива. Применяемые в настоящее время методы оценки поражения КМ при НБ имеют ряд недостатков. Чувствительность цитологического исследования аспиратов КМ не превышает $1 \cdot 10^{-2}$, проточной цитофлуориметрии – $1 \cdot 10^{-3}$. Иммуноцитохимический анализ хоть и способен достигать большей чувствительности (вплоть до $1 \cdot 10^{-6}$), но основан на оценке экспрессии поверхностного маркера GD2, который не является опухолеспецифичным. Диагностика метастатического поражения КМ методом ПЦР в режиме реального времени имеет ряд преимуществ: аналитическая чувствительность метода ПЦР в режиме реального времени может достигать $1 \cdot 10^{-6}$ [2]; возможно использование нескольких молекулярных маркеров для более точной диагностики с учетом вероятной гетерогенности опухолевого фенотипа. При этом маркерный ген должен либо экспрессироваться исключительно в клетках НБ, либо его экспрессия в клетках НБ должна быть значительно выше экспрессии в клетках КМ.

В настоящее время в различных лабораториях для диагностики поражения КМ при НБ используется достаточно большое количество молекулярных маркеров, таких как *GAGE*, *MAGE*, *PGP9.5*, *DDC*, *CyclinD1*, *ELVAL4* [3–6]. При этом комплексный стандартизированный подход для решения поставленной задачи отсутствует. Одним из первых маркеров поражения КМ клетками НБ был предложен ген *TH* в связи с высокой продукцией клетками НБ катехоламинов [6]. Еще одним геном, экспрессия которого характерна для клеток НБ, является *PHOX2B*. Продуктом гена *PHOX2B* является транскрипционный фактор, регулирующий нейрогенез [7]. Согласно литературным данным, гиперэкспрессия обоих генов ассоциирована с неблагоприятным клиническим течением НБ [4–7].

Цель данной работы – разработка метода оценки экспрессии генов *PHOX2B* и *TH* с помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени для диагностики метастатического поражения костного мозга при нейробластоме.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили образцы КМ 10 здоровых доноров и 67 пациентов с диагнозом НБ, проходивших лечение в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии по протоколу NB2004 в период с 2007 по 2017 г. Забор материала производился на момент постановки диагноза. Распределение пациентов по стадиям: стадия 1 – 6 (8,9 %) человек; стадия 2 – 2 (3 %); стадия 3 – 7 (10,5 %); стадия 4 – 52 (77,6 %). Распределение пациентов по группам риска: низкий – 6 (9 %) человек, средний – 1 (1,4 %), высокий – 60 (89,5 %). Наличие поражения КМ было детектировано в 44 случаях, для 20 пациентов наличие метастазов в КМ диагностировано не было.

Для культивирования иммортализованной клеточной линии НБ человека IMR-32 использовали среду ЕМЕМ с добавлением антибиотика/антимикотика (1 %), L-глутамин (1 %) и эмбриональной телячьей сыворотки (10 %). Пассажи проводили из расчета $40 \text{ тыс/см}^2 \cdot \text{с}$ с периодичностью 72 ч. Для подсчета клеток и оценки их жизнеспособности использовали камеру Горяева, предварительно окрашивая клетки трипановым синим.

Для выделения клеток КМ применяли метод лизиса эритроцитов, для экстракции тотальной РНК – TRI-reagent (Invitrogen, США). Синтез кДНК осуществляли с помощью обратной транскриптазы SuperScript™III (Invitrogen, США) и смеси случайных гексамеров (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. ПЦР в режиме реального времени проводили в конечном

объеме 12,5 мкл с использованием TaqMan® Universal PCR MasterMix (AppliedBiosystems, США). Конечная концентрация праймеров и флуоресцентных зондов для генов *GUS* (контрольный ген), *TH* и *PHOX2B* составила 300 и 200 нмоль/мкл соответственно (табл. 1). В каждую ПЦР обязательно включали отрицательный (деионизированную воду) и положительный (кДНК клеточной линии IMR-32) контроля. Каждый образец анализировали в триplete. Пороговый цикл (*Ct*) для образца рассчитывали как среднее арифметическое *Ct* лунок в триplete, при условии, что разница *Ct* между лунками не превышает 0,5. При значении *Ct* контрольного гена более 30 образец исключали из исследования. Уровни экспрессии генов-маркеров рассчитывали методом $\Delta Ct(2^{Ct(GUS)-Ct(ген-маркер)})$.

Т а б л и ц а 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов

T a b l e 1. Nucleotide sequences of primers and fluorescent probes

Ген	Последовательность олигонуклеотида 5'/3'			Источ-ник
	Прямой праймер	Обратный праймер	Флуоресцентный зонд	
<i>GUS</i>	gaa-aat-atg-tgg-ttg-gag-agc-tca-tt	ccg-agt-gaa-gat-ccc-ctt-ttt-a	FAM-cca-gca-ctc-tcg-tcg-gtg-act-gtt-ca-BHQ1	[5]
<i>TH</i>	att-gct-gag-atc-gcc-ttc-ca	aat-ctc-ctc-ggc-ggt-gta-ctc	FAM-aca-ggc-acg-gcg-acc-cga-ttc-BHQ1	[6]
<i>PHOX2B</i>	tgc-tga-ctt-cag-ttc-ctg-ca	ccg-tgg-tcc-gtg-aag-agt-tt	FAM-agc-agt-ccg-tac-gcc-gca-gtt-cct-BHQ1	–

Аналитическую чувствительность метода оценивали, используя 10-кратные разведения клеток НБ линии IMR-32 в клетках КМ трех здоровых доноров.

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 8.0, для сравнения количественных параметров в двух независимых группах – критерий Манна–Уитни. Влияние степени поражения КМ в каждом пороге отсечения на общую и безрецидивную выживаемость (БРВ) пациентов группы высокого риска оценивали методом Log-rank путем сравнения кривых Каплана–Мейера. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Высокие показатели экспрессии гена *PHOX2B* были характерны для клеточной линии IMR-32 и части образцов КМ с диагностированным метастатическим поражением (табл. 2). При этом экспрессия данного гена не была детектирована в КМ здоровых доноров. Детектированная в образцах КМ здоровых доноров экспрессия гена *TH* была достоверно ниже экспрессии этого гена в опухолевых клетках и образцах КМ пациентов с поражением КМ (в обоих случаях $p < 0,001$).

Т а б л и ц а 2. Показатели экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* в клетках IMR-32 и клетках костного мозга здоровых доноров и пациентов, Me (min–max)T a b l e 2. Expression indices of *TH* and *PHOX2B* genes in IMR-32 cells and bone marrow cells healthy donors and patients, Me (min–max)

Ген	IMR-32	КМ здоровых доноров ($n = 10$)	Позитивные образцы КМ ($n = 44$)	Негативные образцы КМ ($n = 20$)
<i>PHOX2B</i>	1,705	0	0,0166 (0–8,0371)	0
<i>TH</i>	0,6631	0 (0–0,0008)	0,2426 (0,001–32,2226)	0 (0–0,0007)

Таким образом, ген *PHOX2B* является опухолеспецифичным маркером, а наличие у него экспрессии является критерием присутствия в образце опухолевых клеток. Экспрессия гена *TH* ассоциирована с опухолевым фенотипом и может выступать в качестве маркера опухолевых клеток при НБ. Кроме того, комбинация изучаемых маркеров позволяет дополнительно обнаружить до 6 % позитивных образцов, в которых экспрессия *PHOX2B* не выявляется [9].

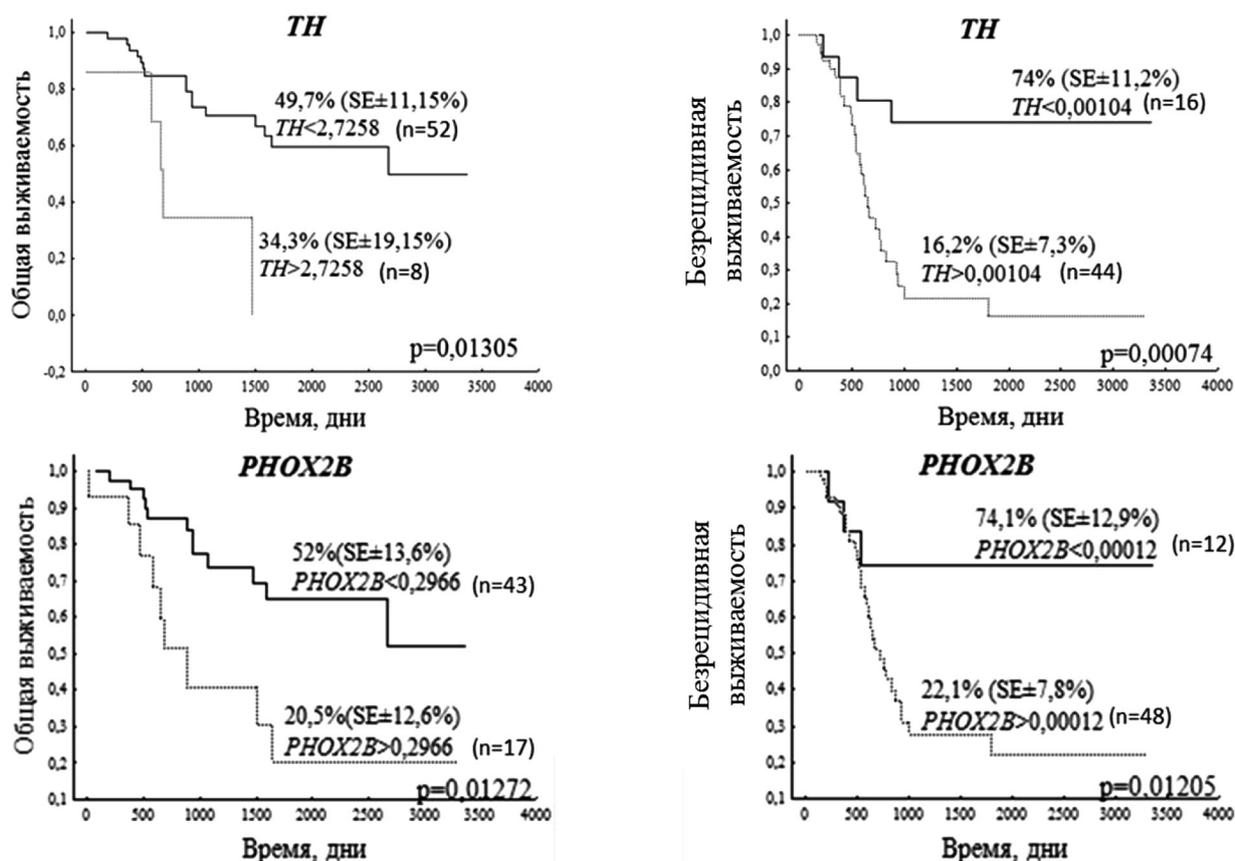
Аналитическая чувствительность при анализе серийных разведений клеток IMR-32 в клетках КМ здоровых доноров достигла $1 \cdot 10^{-4}$ для обоих генов. Согласно представленным в табл. 3 характеристикам стандартных кривых для генов *TH* и *PHOX2B*, основные критерии качества амплификации соблюдены [10].

Т а б л и ц а 3. Амплификационные характеристики стандартных кривых по генам *TH* и *PHOX2B*

Table 3. Amplification characteristics of standard curves for *TH* and *PHOX2B* genes

Клетки КМ	Эффективность, %		Коэффициент R ²		Тангенс угла наклона кривой		Интерсепт	
	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>
Донор 1	95,6	89,2	0,992	0,999	-3,433	-3,612	23,841	19,827
Донор 2	97,2	94,3	0,996	0,984	-3,391	-3,467	19,426	16,976
Донор 3	99,6	95,7	0,994	0,999	-3,333	-3,429	21,924	19,884
Среднее значение	97,5	93,1	0,994	0,994	-3,386	-3,501	21,73	18,896
Коэффициент вариации, %	2,07	3,68	0,20	0,87	1,48	2,76	10,19	8,80

С целью отработки метода и оценки перспективности его использования в клинической практике проведена оценка экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* в образцах КМ 67 пациентов с НБ. Наличие экспрессии гена *TH* было детектировано у 50 пациентов (медиана составила 0,15015, минимальное значение – 0,00011, максимальное – 32,22258), в то время как 17 пациентов не имели экспрессии указанного гена в образцах КМ. Экспрессия гена *PHOX2B* была детектирована у 48 пациентов (медиана составила 0,08381, минимальное значение – 0,00011, максимальное – 8,03705), отсутствие экспрессии – у 19 пациентов. При изучении влияния уровня экспрессии маркерных генов на выживаемость пациентов с НБ высокой группы риска на момент постановки диагноза ($n = 60$) установлено, что гиперэкспрессия обоих генов ассоциирована с худшими показателями ОВ и БРВ (см. рисунок). Полученные результаты указывают на целесообразность использования разработанного метода в клинической практике с целью определения прогностически неблагоприятной группы пациентов детского возраста с диагнозом НБ.



Показатели выживаемости пациентов группы высокого риска на момент постановки диагноза в зависимости от уровня экспрессии генов *TH* и *PHOX2B*

Survival rates of patients at high risk at the time of formulation diagnosis, depending on the expression levels of the *TH* and *PHOX2B* genes

Заключение. С помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени разработан метод оценки экспрессии генов *PHOX2B* и *TH*. Используемые молекулярные маркеры обладают высокой специфичностью к клеткам НБ, а сам метод позволяет с чувствительностью $1 \cdot 10^{-4}$ определять наличие целевых молекул в образце. Таким образом, предлагаемый метод удовлетворяет основным критериям, необходимым для использования в клинической практике, и позволяет решить такие задачи, как детекция метастатического поражения КМ при НБ и оценка прогноза заболевания (высокие показатели экспрессии генов *PHOX2B* и *TH* связаны с худшими показателями ОВ и БРВ ($p < 0,05$)). Кроме того, разработанный метод может быть использован для оценки минимальной остаточной болезни на различных этапах терапии НБ у пациентов высокой группы риска, а детектируемая aberrантная экспрессия генов *PHOX2B* и *TH* может выступать в качестве дополнительного фактора прогноза в ходе терапевтического процесса.

Список использованных источников

1. Hallet, A. A review and update on neuroblastoma / A. Hallet, H. Traunecker // *Pediatr. Child Health*. – 2012. – Vol. 22, N 3. – P. 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2011.08.005>
2. Szewczyk, K. Methods for detection of minimal residual disease in neuroblastoma peditric tumor / K. Szewczyk, W. Balwierz // *Eur. J. Med. Technol.* – 2017. – Vol. 2, N 15. – P. 23–28.
3. Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma / I. Y. Cheung [et al.] // *J. Mol. Diagn.* – 2007. – Vol. 9, N 2. – P. 237–241. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060130>
4. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers / J. Stutterheim [et al.] // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55, N 7. – P. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>
5. Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma / I. Y. Cheung [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, N 21. – P. 7020–7027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-0541>
6. Minimal disease monitoring by QRT-PCR: guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials / V. Viprey [et al.] // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 216, N 2. – P. 245–252. <https://doi.org/10.1002/path.2406>
7. Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells / Z. Kuçi [et al.] // *Anticancer Res.* – 2006. – Vol. 26, N 3A. – P. 2075–2080.
8. *PHOX2B* is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma / J. Stutterheim [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, N 33. – P. 5443–5449. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.6531>
9. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers / J. Stutterheim [et al.] // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55, N 7. – P. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>
10. Fraga, D. Real-time PCR overview and principles / D. Fraga, T. Meulia, S. Fenster // *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* – 2008. – Vol. 1. – P. 10.3.1–10.3.34. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>

References

1. Hallet A., Traunecker H. A review and update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health*, 2012, vol. 22, no. 3, pp. 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2011.08.005>
2. Szewczyk K., Balwierz W. Methods for detection of minimal residual disease in neuroblastoma peditric tumor. *European Journal of Medical Technologies*, 2017, vol. 2, no. 15, pp. 23–28.
3. Cheung I. Y., Feng Y., Vickers A., Gerald W., Cheung N.-K. V. Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2007, vol. 9, no. 2, pp. 237–241. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060130>
4. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Yalcin B., Dee R., van Noesel M. M. [et al.]. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clinical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 7, pp. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>
5. Cheung I. Y., Feng Y., Gerald W., Cheung N.-K. V. Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 2008, vol. 14, no. 21, pp. 7020–7027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-0541>
6. Viprey V. F., Lastowska M. A., Corrias M. V., Swerts K., Jackson M. S., Burchill S. A. Minimal disease monitoring by QRT-PCR: guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials. *Journal of Pathology*, 2008, vol. 216, no. 2, pp. 245–252. <https://doi.org/10.1002/path.2406>
7. Kuçi Z., Seitz G., Kuçi S., Kreyenberg H., Schumm M., Lang P., Niethammer D., Handgretinger R., Bruchelt G. Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells. *Anticancer Research*, 2006, vol. 26, no. 3A, pp. 2075–2080.

8. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Kleijn I., Dee R., Hooft L. [et al.]. *PHOX2B* is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, no. 33, pp. 5443–5449. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.6531>

9. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Yalcin B., Dee R., van Noesel M. M. [et al.]. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clinical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 7, pp. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>

10. Fraga D., Meulia T., Fenster S. Real-time PCR overview and principles. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 2008, vol. 1, pp. 10.3.1–10.3.34. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>

Информация об авторах

Кушнерова Елизавета Викторовна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: elizaveta.kushnerova@gmail.com

Пахомова Ирина Вениаминовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: Pachomova.Irina@gmail.com

Пролесковская Инна Витальевна – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: proleskai@mail.ru

Information about the authors

Lizaveta V. Kushniarova – student. Belarusian State University Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elizaveta.kushnerova@gmail.com

Iryna V. Pakhomava – Junior researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: Pachomova.Irina@gmail.com

Inna V. Praliaskouskaya – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Department. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: proleskai@mail.ru