

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 544.778.3+66.094.941+66.084.8+66.095.39+612.112.3+535.243.3  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-287-292>

Поступило в редакцию 26.02.2020  
Received 26.02.2020

**К. В. Лазнев, Ж. В. Игнатович, академик В. Е. Агабеков**

*Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь*

## **ФУНКЦИОНИЛИЗОВАННЫЕ ДРОЖЖЕВЫМ ЛИЗАТОМ МИКРОСФЕРЫ ИЗ СШИТОГО ГЛУТАРАЛЬДЕГИДОМ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА**

**Аннотация.** Путем сшивки глутаральдегидом поливинилового спирта (ПВС), 25 г/л раствор которого, содержащий наночастицы магнетита, был диспергирован в изооктане с добавками ПАВ Span 85 и Tween 85, получены магнитные микросферы (ММС), сопоставимые по размеру с дрожжевыми клетками. Клеточные стенки дрожжей солюбилизируются путем частичного гидролиза в муравьиной кислоте при обработке ультразвуком и температуре  $\approx 100$  °С. Добавкой лизата клеточных стенок дрожжей в сшиваемый раствор ПВС и последующей обработкой разбавленным лизатом микросферы функционализованы как мишени для фагоцитоза. Получены флуоресцентные микросферы при использовании в качестве дисперсионной среды изооктана с добавками ПАВ Span 85 и Tween 85, насыщенного флуорохромами – производными 2-аминопиримидина. Разработана методика оценки фагоцитарной активности лейкоцитов с применением функционализированных таким образом ММС.

**Ключевые слова:** микросферы, дрожжи, фагоцитоз, поливиниловый спирт

**Для цитирования:** Лазнев, К. В. Функционализированные дрожжевым лизатом микросферы из сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта / К. В. Лазнев, Ж. В. Игнатович, В. Е. Агабеков // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 287–292. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-287-292>

**Konstantin V. Laznev, Zhanna V. Ignatovich, Vladimir E. Agabekov**

*Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## **MICROSPHERES MADE BY CROSSLINKING OF POLYVINYL ALCOHOL WITH GLUTARALDEHYDE FUNCTIONALIZED WITH YEAST LYSATE**

**Abstract.** Microspheres comparable with yeast cells in size were obtained by the glutaraldehyde crosslinking of polyvinyl alcohol (PVA), whose 25 g/l water solution containing magnetite particles was dispersed in the iso-octane/Span 85/Tween 85 medium. Yeast cell walls were partially hydrolysed by sonication in formic acid near the boiling point. The microspheres were made targets for phagocytosis by the addition of yeast lysate to the crosslinkable PVA solution and a subsequent treatment of the freshly crosslinked microspheres with diluted yeast lysate. The microspheres were also made fluorescent when the emulsification medium saturated with fluorescent 2-aminopyrimidine derivatives was used. A protocol for phagocytosis assay using the thus modified microspheres was developed.

**Keywords:** microspheres, yeasts, phagocytosis, polyvinyl alcohol

**For citation:** Laznev K. V., Ignatovich Zh. V., Agabekov V. E. Microspheres made by crosslinking of polyvinyl alcohol with glutaraldehyde functionalized with yeast lysate. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 3, pp. 287–292 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-287-292>

**Введение.** Фагоцитоз – поглощение и разрушение (переваривание) клетками частиц размером от долей до десятков микрометров: микроорганизмов, апоптотических телец, пыли и т. д. – является важной составляющей резистентности организма. Исследования фагоцитарной и переваривающей активностей клеток, в первую очередь – нейтрофилов периферической крови, применяются в медицине как один из диагностических критериев [1; 2]. Объектами фагоцитоза при этом служат живые или инактивированные микроорганизмы, в т. ч. окрашенные флуорохромами, а также флуоресцентные полимерные микросферы [1–4]. Преимуществами полимерных микросфер по сравнению с препаратами биологического происхождения (бактериями, дрожжами) являются стабильность, более высокая степень стандартизации и возможность варьирования антигенного состава, а недостатком – невозможность оценки переваривающей активности

фагоцитов, так как микросферы инертны по отношению к лизосомальным ферментам и продуктам «респираторного взрыва».

Цель работы – получение гидрогелевых магнитных микросфер, содержащих рН-чувствительные флуорохромы и дрожжевые антигены, и использование их для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов.

Предполагалось, что флуоресценция микросфер, чувствительная к рН, способна обеспечить идентификацию и количественную оценку одного из этапов переваривания – слияния лизосом с фагосомами. В качестве носителей рН-чувствительных флуорохромов были выбраны гидрогелевые микросферы, так как их проницаемость делает доступными для протонов флуорохромы во всем объеме микросферы, а не только на ее поверхности [5]. Ранее нами был разработан метод синтеза гелевых магнитных микросфер методом сшивки глутаральдегидом гидрофильных полимеров (желатина, хитозана, поливинилового спирта) в водной фазе эмульсий «вода в масле» с использованием хлорида кальция в качестве агента, способствующего эмульгированию раствора глутаральдегида в изооктане с добавками ПАВ<sup>1</sup>. Магнитная восприимчивость обеспечивает сепарацию микросфер и поглотивших их клеток, что делает возможной оценку фагоцитарного числа и процента активных фагоцитов с помощью спектрофлуориметра, без микроскопии и цитофлуориметрии. Для сравнения в качестве традиционного объекта-мишени были выбраны пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

**Экспериментальная часть.** Флуоресцентные 2-аминопиримидин-бис-этен-бис-диалкилфениламин 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диметилфениламин) (АПМ) и 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диэтилфениламин) (АПЭ) и магнитные микросферы (ММС) получали по описанной ранее методике [6].

**Подготовка зимозана.** Зимозан (Sigma Z4250) в исходном виде или после растирания в ступке добавляли в дистиллированную воду (5–10 мг/мл) и обрабатывали погружным ультразвуковым (УЗ-) диспергатором 22 кГц 100 Вт в микропробирке 2 мл.

**Конъюгация зимозана с ММС.** Микросферы трижды отмывали буфером 2-(N-морфолино)-этансульфоновой кислоты (MES) 0,1 М при рН 6. Обрабатывали раствором 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) 20 мг/мл и N-гидроксисукцинимидом (NHS) 10 мг/мл в MES-буфере в течение 15 мин при 37 °С с периодическим перемешиванием, дважды отмывали MES-буфером, добавляли на 100 мкл осадка микросфер 450 мкл MES-буфера и 300 мкл подготовленного зимозана 1 мг/мл в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФФР), разбавленном дистиллированной водой 1 : 1, инкубировали 2,5 ч при 37 °С с периодическим перемешиванием, трижды отмывали ЗФФР с добавкой 5 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА).

**Получение лизата клеточных стенок дрожжей.** В микропробирку 2 мл помещали 50 мг сухих пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*), добавляли 1 мл дистиллированной воды, перемешивали. Для удаления содержимого клеток суспензию обрабатывали погружным УЗ-диспергатором (22 кГц, 100 Вт) на охлаждающей водяной бане; при закипании давали остыть; общая продолжительность обработки 2 мин. Осаждали на центрифуге, удаляли супернатант, дважды отмывали 90 %-ной муравьиной кислотой. Ресуспендировали в 1 мл муравьиной кислоты, обрабатывали УЗ-диспергатором 22 кГц на охлаждающей водяной бане до получения прозрачной, слегка опалесцирующей жидкости. Мощность УЗ выбиралась такой, чтобы температура обрабатываемой суспензии была близка к температуре кипения. Излучатель УЗ погружали непосредственно в микропробирку.

**Модификация микросфер дрожжевым лизатом.** При получении поливинилспиртовых ММС согласно [6] использовали магнитную жидкость, содержащую 25 г/л ПВС и 10 об. % дрожжевого лизата в муравьиной кислоте. Свежесшитые ММС инкубировали в растворе, содержащем 9 объемных частей воды и 1 – дрожжевого лизата.

<sup>1</sup> Способ получения биополимерных микросфер: пат. ВУ 21009 / К. В. Лазнев, Г. К. Жавнерко, А. А. Квасюк, В. Е. Агабеков. – Оpubл. 30.04.2017.

Включение флуорохромов в состав микросфер проводили согласно [6]. Флуоресценцию микросфер регистрировали в камере Горяева на оптическом микроскопе «Планар Микро МБ» с каналом возбуждения флуоресценции на основе ртутной лампы сверхвысокого давления Osram HBO 100W/2, оснащенной цветной цифровой камерой и микроспектрометром Ocean Optics STS-VIS. Для анализа изображений использовали программное обеспечение ImageJ [7]. Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel. Для оценки полидисперсности использовали индекс полидисперсности ИПД =  $(\sigma_d / d)^2$ , где  $d$  – среднее арифметическое значение диаметра частиц;  $\sigma_d$  – стандартное отклонение диаметра частиц.

*Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов.* При оценке фагоцитоза сравнивались результаты, полученные с применением ММС и инактивированных нагреванием пекарских дрожжей. Использовали метод Горчакова и соавт. [2] с изменениями. Клетки крови, разведенной в 2 раза 3ФФР (рН 7,4), осаждали центрифугированием. С поверхности полученного осадка отбирали фракцию, богатую лейкоцитами. В круглодонной микропробирке смешивали 100 мкл отобранной фракции, 100 мкл аутологичной плазмы и 100 мкл 1,0 %-ной суспензии в RPMI-1640 инактивированных нагреванием (60 °С, 30 мин) пекарских дрожжей либо ММС. Пробирку центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>). Содержимое пробирки ресуспендировали через 120 мин и в случае дрожжей окрашивали акридиновым оранжевым (АО) 10<sup>-4</sup> М; отбирали аликвоту в камеру Горяева и исследовали на люминесцентном микроскопе. В каждом образце исследовали 50 нейтрофилов, оценивая количество поглощенных ММС или дрожжевых клеток с зеленой (непереваренные,  $n_z$ ) и красной (перевариваемые,  $n_k$ ) флуоресценцией. В случае дрожжей рассчитывали: фагоцитарный индекс (ФИ =  $N_{\text{нфд}} / N_{\text{нф}}$ ); число активных фагоцитов (АФ =  $N_{\text{нфдк}} / N_{\text{нф}}$ ); фагоцитарное число (ФЧ =  $N_d / N_{\text{нф}}$ ); индекс переваривания (ИП =  $N_{\text{дк}} / N_d$ ), где  $N_{\text{нф}}$  – общее количество нейтрофилов;  $N_{\text{нфд}}$  – количество нейтрофилов, содержащих не менее 1 дрожжевой клетки;  $N_{\text{нфдк}}$  – количество нейтрофилов, содержащих не менее 1 красной (перевариваемой) дрожжевой клетки;  $N_d$  – общее количество поглощенных дрожжевых клеток;  $N_{\text{дк}}$  – количество красных (перевариваемых) дрожжевых клеток. В случае ММС рассчитывали ФИ, ФЧ и соотношение яркостей красного и зеленого каналов (G / R) изображений отдельных микросфер.

**Результаты и их обсуждение.** Диаметр микросфер, получаемых из эмульсий, приготовленных в одинаковых условиях (диаметр наконечника 0,8 мм, частота пипетирования 12 Гц, температура 65 °С, время пипетирования 5 мин), зависит от концентрации ПВС; индекс полидисперсности (ИПД) был близок к 0,1 (таблица).

#### Влияние концентрации ПВС на размер микросфер и ИПД

#### Effect of PVA concentration on microsphere size and polydispersity index (PDI)

Концентрация ПВС, г/л PVA concentration, g/l	Средний размер, мкм Mean size, мкм	ИПД PDI
25,0	2,8 ± 0,3	0,09
50,0	4,6 ± 0,3	0,08
100,0	15,0 ± 2,1	0,10

Поскольку в наших опытах средний размер поглощенных нейтрофилами дрожжевых клеток составлял 3,2 мкм, далее в экспериментах применялась концентрация ПВС 25 г/л, обеспечивающая сопоставимый средний размер ММС.

Модифицированные АПЭ и АПМ микросферы обладали рН-зависимой флуоресценцией [6]; при микроскопии в камере Горяева в режиме эпифлуоресценции (лампа HBO 100 Вт, объектив 20х/0,40, синий светофильтр) происходило их выцветание с потерей ≈80 % интенсивности флуоресценции в течение 2 мин (рис. 1). Однако соотношение яркостей изображений микросфер в зеленом и красном каналах G/R при выцветании красителей на 2/3 (1 мин освещения) практически не изменялось: у АПМ 3,56 ± 0,10 до освещения и 3,60 ± 0,10 после; у АПЭ 3,55 ± 0,15 и 3,80 ± 0,15 соответственно. Таким образом, светозависимое выцветание предположительно не оказывает существенного влияния на рН-чувствительность флуоресценции данных флуорохромов, особен-

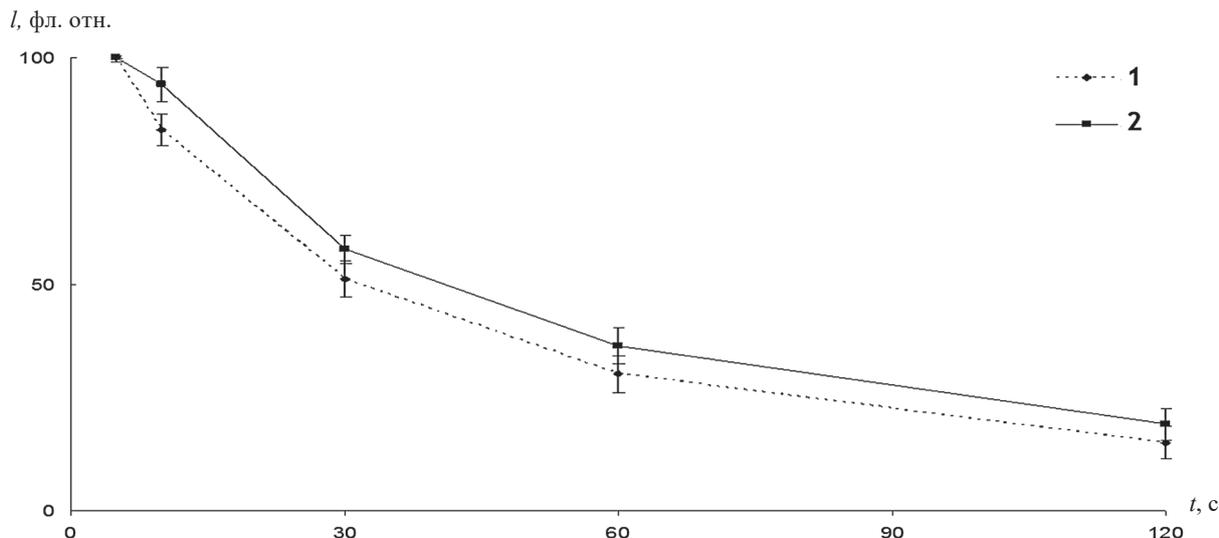


Рис. 1. Зависимость флуоресценции микросфер, содержащих АПМ (1) и АПЭ (2), от времени.

Fig. 1. Time dependence of fluorescence of microspheres containing 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-aminopyrimidin-4,6-diyl) bis(ethene-2,1-diyl) bis(N,N-dimethylphenylamine) (APM, curve 1) and 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-aminopyrimidin-4,6-diyl) bis(ethene-2,1-diyl) bis(N,N-diethylphenylamine) (APE, curve 2)

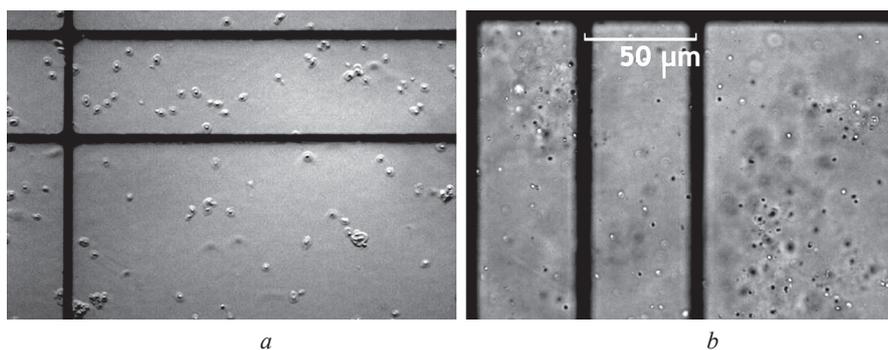


Рис. 2. Частицы зимозана до (а) и после (b) ультразвуковой обработки

Fig. 2. Zymosan particles before (a) and after (b) sonication

но АПМ. Тем не менее, время от начала микроскопирования до съемки объектов в дальнейших опытах было стандартизировано: 10 с.

Ультразвуковая обработка зимозана (20 кГц, 100 Вт, 2 мин) приводила к формированию рыхлых обводненных частиц, образующих ассоциаты (рис. 2). С помощью EDC эти ассоциаты были конъюгированы с поливинилспиртовыми ММС. Ультразвуковой обработкой отделить ММС от избыточного зимозана не удалось. Полученные конъюгаты связывались с гранулоцитами, но из-за размера, достигавшего 100 мкм, и слизистой консистенции не могли быть использованы для оценки фагоцитоза.

Модифицированные лизатом дрожжевых стенок поливинилспиртовые ММС эффективно фагоцитировались нейтрофилами, в отличие от немодифицированных. При сравнении с фагоцитозом дрожжей установлено, что ФИ совпадают ( $99,0 \pm 1,0$  %), а ФЧ в случае ММС ( $7,3 \pm 2,4$ ) недостоверно ( $p > 0,1$ ) больше, чем в случае дрожжей ( $6,6 \pm 1,8$ ). Большее количество поглощенных ММС на 1 клетку связано с тем, что средний размер микросфер несколько меньше, чем дрожжевых клеток.

По истечении 2 ч инкубации микросфер, содержащих АПМ, с нейтрофилами было отмечено, что в клетках, содержащих небольшое количество ММС (рис. 3, объекты 1–5), интенсивность

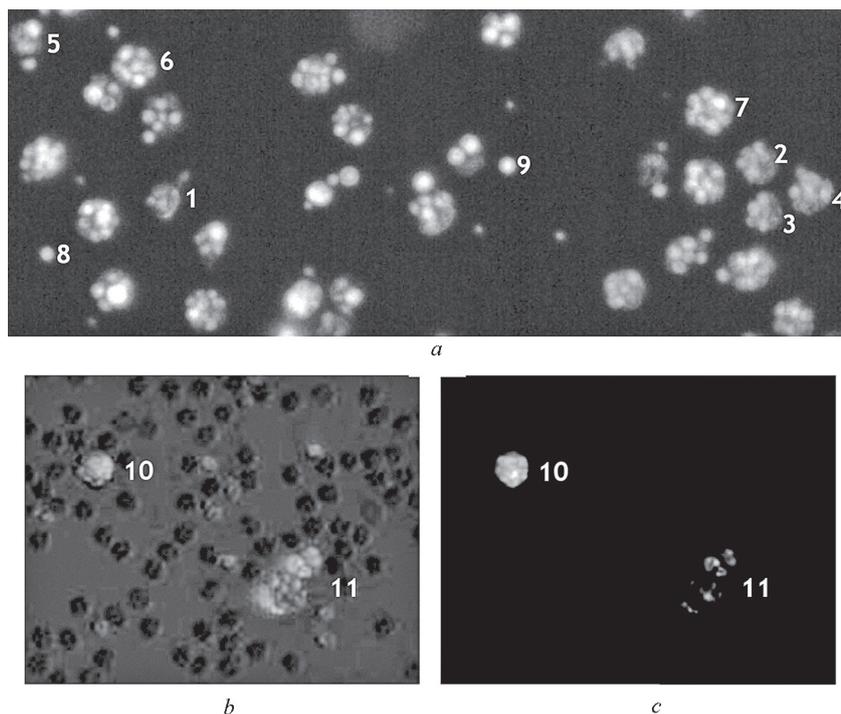


Рис. 3. Фагоцитоз нейтрофилами микросфер, содержащих АПМ (а), и дрожжей (b, c). Каналы изображения: а, b – зелёный, c – красный

Fig. 3. Phagocytosis of microspheres containing APM dye (a) and yeasts (b, c) by neutrophils. Image channels: a, b – green, c – red

флуоресценции ( $I_{\text{фл}}$ ) некоторых из них уменьшалась по сравнению со свободными ММС (рис. 3, объекты 8, 9). В то же время в клетках, содержащих большое количество микросфер (рис. 3, объекты 6, 7), уменьшения  $I_{\text{фл}}$  не происходило. При фагоцитозе дрожжей наблюдается аналогичная картина: в нейтрофилах, поглотивших меньшее количество дрожжей (рис. 3, объект 10), процент перевариваемых (красная флуоресценция акридинового оранжевого) больше. На основании этого было предположено, что выцветание АПМ в составе фагоцитированных микросфер характеризуется его разрушением под действием тех же факторов, которыми обусловлено переваривание дрожжей.

Если считать тусклые ММС аналогом перевариваемых дрожжевых клеток, то можно рассчитать АФ и ИП по вышеприведенным формулам, заменив  $N_{\text{нфлк}}$  на количество нейтрофилов, содержащих не менее 1 ММС с  $I_{\text{фл}}$  ниже пороговой, а  $N_{\text{дк}}$  – на количество ММС с интенсивностью флуоресценции ниже пороговой. Близкие значения АФ ( $45,0 \pm 11,0$  % с дрожжами,  $46,0 \pm 15,0$  % с ММС) и ИП ( $27,0 \pm 6,0$  % с дрожжами,  $33,0 \pm 9,0$  % с ММС) получены по результатам исследования 8 образцов крови, когда в качестве порогового было выбрано значение  $I_{\text{фл}}$  в  $\geq 1,5$  раза меньше, чем среднее у свободных ММС (за вычетом фона).

Таким образом, результаты, полученные с применением ММС(АПМ), близки к полученным традиционным способом [2]. Однако необходимость определения интенсивности флуоресценции делает способ оценки фагоцитоза с помощью ММС требовательным к равномерности освещенности поля зрения и зависящим от выбора порогового значения  $I_{\text{фл}}$ , ниже которого микросферы считаются перевариваемыми. Первое из двух перечисленных ограничений может быть преодолено при наличии референс-объектов (например, несвязанных с клетками микросфер) в поле зрения.

**Заключение.** Для модификации микросфер с целью придания им антигенности, необходимой для использования в качестве объектов-мишеней фагоцитоза, применим лизат клеточных стенок *S. cerevisiae*, полученный из сухих пекарских дрожжей ультразвуковой обработкой в муравьиной кислоте после разрушения дрожжевых клеток и удаления их содержимого. Как

и дрожжи, поливинилспиртовые ММС диаметром  $\approx 3,0$  мкм, модифицированные дрожжевым лигандом и АПМ, позволяют оценивать не только фагоцитарную, но и переваривающую активность нейтрофилов, т. е. обладают расширенными возможностями по сравнению с существующими синтетическими мишенями фагоцитоза [4].

### Список использованных источников

1. Колісник, Н. В. Біологія нейтрофілів, сучасний погляд. Огляд / Н. В. Колісник, Ж. С. Качанова // Вісн. Запорізь. нац. ун-ту. – 2009. – № 1. – С. 80–91.
2. Метод комплексной оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Инструкция по применению / А. М. Горчаков [и др.]. – Минск, 2003. – 15 с.
3. pHrodo™ BioParticles® phagocytosis kits for flow cytometry [Electronic resource]. – Mode of access: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp10025.pdf>. – Date of access: 21.10.2019.
4. Cayman Chemical™ phagocytosis assay kit (IgG FITC) [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.caymanchem.com/pdfs/500290.pdf>. – Date of access: 21.10.2019.
5. Kuwana, E. Fluorescence lifetime spectroscopy of a pH-sensitive dye encapsulated in hydrogel beads / E. Kuwana, F. Liang, E. M. Sevick-Muraca // *Biotechnol Prog.* – 2004. – Vol. 20, N 5. – P. 1561–1566. <https://doi.org/10.1021/bp034328i>
6. Поливинилспиртовые магнитные микросферы, содержащие 2-аминопиримидин-бис-этенбис-диалкилфениламины в качестве флуоресцентных индикаторов pH / К. В. Лазнев [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 563–568. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-563-568>
7. ImageJ: Image processing and analysis in Java [Electronic resource]. – Mode of access: <https://imagej.nih.gov/ij/>. – Date of access: 25.02.2020.

### References

1. Kolisnik N. V., Kachanova Zh. S. Biology of neutrophils, modern look. A review. *Visnik Zaporizkoho nacional'noho universitetu* [Bulletin of Zaporizhzhia National University], 2009, no. 1, pp. 80–91 (in Ukrainian).
2. Gorchakov A. M., Kruchinski N. G., Gorchakova F. T., Korosteliyova I. N. *Method for complex assay of phagocytic activity of neutrophils. Manual*. Minsk, 2003. 15 p. (in Russian).
3. *pHrodo™ BioParticles® phagocytosis kits for flow cytometry*. Available at: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp10025.pdf> (accessed 21 October 2019).
4. *Cayman Chemical™ phagocytosis assay kit (IgG FITC)*. Available at: <https://www.caymanchem.com/pdfs/500290.pdf> (accessed 21 October 2019).
5. Kuwana E., Liang F., Sevick-Muraca E. M. Fluorescence lifetime spectroscopy of a pH-sensitive dye encapsulated in hydrogel beads. *Biotechnology Progress*, 2004, vol. 20, no. 5, pp. 1561–1566. <https://doi.org/10.1021/bp034328i>
6. Laznev K. V., Ignatovich Zh. V., Kukhta I. N., Agabekov V. E. Polyvinyl alcohol magnetic microspheres containing 2-aminopyrimidin-bis(ethene)-bis(dialkylphenylamine) compounds as fluorescent pH indicators. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 5, pp. 563–568 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-563-568>
7. *ImageJ: Image processing and analysis in Java*. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/> (accessed 25 February 2020).

### Информация об авторах

Лазнев Константин Владимирович – науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [kvlaznev@mail.ru](mailto:kvlaznev@mail.ru).

Игнатович Жанна Владимировна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ignatovichz@inbox.ru](mailto:ignatovichz@inbox.ru).

Агабеков Владимир Енокович – академик, д-р хим. наук, профессор, директор. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ichnm@ichnm.basnet.by](mailto:ichnm@ichnm.basnet.by).

### Information about the authors

Laznev Konstantin V. – Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [kvlaznev@mail.ru](mailto:kvlaznev@mail.ru).

Ignatovich Zhanna V. – Ph. D. (Chemistry), Leading researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [ignatovichz@inbox.ru](mailto:ignatovichz@inbox.ru).

Agabekov Vladimir E. – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [ichnm@ichnm.basnet.by](mailto:ichnm@ichnm.basnet.by).