



ПЕРЕДОВАЯ СТАТЬЯ

© Г.А. Янус^{1,2}, Е.Н. Суспицын^{1,2},
М.Ю. Дорофеева³,
Е.Н. Имянитов^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»

Минздрава России

²НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (С.-Петербург)

³ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздрава России

Резюме. Туберозный склероз — наследственное заболевание из группы факоматозов, характеризующееся образованием множественных гамартом головного мозга, глаз, кожи и внутренних органов. Основой диагностики туберозного склероза является выявление мутаций в генах *TSC1* и *TSC2*. В статье представлено описание клинического случая и применения молекулярно-генетических методов для подтверждения клинического диагноза.

Ключевые слова: туберозный склероз; молекулярная диагностика; секвенирование.

УДК: 616-056.7-004

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРОЗНОГО СКЛЕРОЗА

Диагностика и лечение редких (орфанных) заболеваний представляет огромные трудности. По определению, низкая частота какой-либо патологии является индикатором того, что большинство врачей никогда с ней не сталкивались; это приводит к тому, что многие необычные синдромы долго остаются нераспознанными, несмотря на привлечение самых опытных специалистов. Даже если у доктора возникает правильная гипотеза в отношении диагноза, добить подтверждающие сведения зачастую очень нелегко: большинство диагностических учреждений ограничивают спектр своих услуг лишь стандартными ситуациями и не хотят (или действительно не могут ввиду объективных ограничений) тратить несопоставимые по размеру ресурсы на анализ единичных уникальных случаев. И наконец, разработка методов лечения редких заболеваний также сталкивается с трудностями критического характера: низкая встречаемость орфанных патологий делает невозможным проведение масштабных клинических испытаний, а создаваемые фармацевтическими компаниями препараты имеют низкие шансы на окупаемость ввиду ограниченного размера рынка. Все перечисленные факторы требуют выделения редких заболеваний в отдельную, весьма специфическую категорию нозологических единиц [4]. Одним из типичных примеров редких заболеваний является туберозный склероз.

Туберозный склероз — наследственное заболевание из группы факоматозов, характеризующееся образованием множественных гамартом головного мозга, глаз, кожи и внутренних органов. Развитие болезни связано с мутациями в генах *TSC1* и *TSC2* [3, 17]. Характерен аутосомно-доминантный тип наследования, однако в большинстве случаев мутации возникают *de novo*, то есть семейный анамнез пациента негативен в отношении туберозного склероза.

Белковые продукты генов *TSC1* и *TSC2*, гамартин и туберин, образуют гетеродимер, способный ингибировать опосредованный комплекс mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) сигнальный каскад. mTORC1 является ключевым связующим звеном между уровнем клеточного метаболизма и пролиферацией. Он активируется в ответ на поступление питательных веществ и факторов роста и регулирует ряд клеточных функций, таких как трансляция, транскрипция и аутофагия. Гиперактивация каскада mTORC1, ведущая к усилению клеточной пролиферации, считается важным условием злокачественной трансформации. В клетках с мутацией *TSC1* или *TSC2* данный сигнальный путь постоянно «включен». Таким образом, гены *TSC1* и *TSC2* в норме выполняют роль опухолевых супрессоров.

Развитие гамартом у больных туберозным склерозом происходит по тем же механизмам, что и образование наследственных форм злокачественных опухолей. Одна из мутаций в гене *TSC1/TSC2* уже

содержится во всех клетках организма. В клеткородоначальнице опухолевого клона происходит инактивация второго, незатронутого наследственной мутацией, аллеля. [1, 18, 19]. В некоторых случаях соматической инактивации второго аллеля не требуется — опухоль, видимо, развивается благодаря гаплонедостаточности [11].

Клиническая картина туберозного склероза была описана еще в конце XIX века французским неврологом Бурневиллем и английским дерматологом Принглом. К минимальным диагностическим признакам заболевания относятся: судороги, умственная отсталость и ангиофибромы лица («триада Фогта»). Длительное время считалось, что болезнь встречается весьма редко, однако на протяжении последних десятилетий можно отметить тенденцию к постепенному увеличению числа случаев туберозного склероза. Это связано с улучшением диагностических возможностей (особенно с появлением ДНК-диагностики), уточнением диагностических критериев, а также возросшей осведомленностью врачей о данной патологии. В настоящее время считается, что туберозный склероз возникает у 1:6000 новорожденных; частота в популяции составляет приблизительно 1:10 000 [5, 6, 10].

При выраженных клинических проявлениях диагностика туберозного склероза не вызывает значительных сложностей. В то же время относительно распространены стертыe формы, распознаваемые далеко не всегда. Так, в одном из ис-

следований у 6% больных туберозным склерозом не было обнаружено ни одного признака из «триады Фогта» [14]. В другом сообщении отмечалось, что до 12% пациентов удается диагностировать лишь во взрослом возрасте, например, после рождения у них больных детей. При этом ретроспективное исследование показало, что у ряда пациентов присутствовали (и были пропущены) признаки, указывавшие на возможный диагноз туберозного склероза [15]. К объективным трудностям при постановке диагноза по клиническим проявлениям следует отнести заметную динамику последних. Так, рабдомиомы сердца у таких больных чаще всего врожденные и спонтанно регрессируют с возрастом, тогда как ангиофибромы лица обычно начинают появляться лишь в 1–4 года [15]. Итогом накопления и уточнения клинического опыта в отношении диагностики туберозного склероза служат диагностические критерии, сформулированные в 1998 году (табл. 1).

С выявлением генов, мутации которых ответственны за развитие туберозного склероза, а также внедрением в лабораторную практику молекулярно-генетических методов, стала возможной ДНК-диагностика этого заболевания. Отсутствие выраженного «эффекта основателя» (наличия частых мутаций, характерных для конкретной популяции) диктует необходимость тщательного анализа всей кодирующей последовательности обоих генов, которая насчитывает 21 экзон для *TSC1*, и 41 экзон

Таблица 1

Диагностические признаки туберозного склероза [12]

Основные («majор») признаки	
Ангиофибромы лица или фиброзные бляшки на лбу	
Не связанная с травмой околоногтевая или подногтевая фиброма (опухоль Кенена)	
Гипопигментные пятна (три и более)	
Участок «шагреневой кожи» (соединительнотканный невус)	
Множественные узелковые гамартомы сетчатки (например, по типу «тутовой ягоды»)	
Туберы коркового вещества мозга	
Субэндемимальные узлы	
Субэндемимальная гигантоклеточная астроцитома	
Рабдомиома сердца (единичная или множественная)	
Лимфангиолейомиоматоз	
Ангиолипома почек	
Вспомогательные («минор») критерии	
Множественные, случайно распределенные углубления в зубной эмали	
Гамартомные полипы прямой кишки (предполагается гистологическое подтверждение)	
Костные кисты	
Радиальные линии миграции в белом веществе головного мозга (если выявляются туберы, данный признак не должен учитываться отдельно)	
Фибромы десен	
Гамартомы внутренних органов, исключая почечные (предполагается гистологическое подтверждение)	
Беспигментные пятна на сетчатке	
Гипопигментные пятна на коже по типу «конфетти»	
Множественные кисты почек	
Для уверенной постановки клинического диагноза туберозного склероза требуется 2 основных признака или 1 основной и 2 вспомогательных. Вероятный диагноз — 1 основной и 1 вспомогательный признак. Возможный диагноз — 1 основной или 2 или более вспомогательных	

для *TSC2*. «Золотым стандартом» выявления мутаций служит прямое секвенирование ДНК. В силу экономических соображений перед секвенированием часто применяют различные методы скрининга (анализ полиморфизма конформации однонитевых фрагментов ДНК, денатурирующий градиентный гель-электрофорез и т. п.).

Согласно данным наиболее масштабного на сегодняшний день исследования [13], мутации гена *TSC2* встречаются примерно в 3 раза чаще, чем *TSC1*. Выявить патогенную мутацию удается не у всех пациентов: даже если клинически диагноз не вызывает сомнения, около 15% случаев остается без молекулярного подтверждения. Возможно, причина такого явления кроется в существовании третьего, пока неидентифицированного гена туберозного склероза. Некоторые авторы считают, что пациенты без мутаций *TSC1/TSC2* обладают определенными клиническими особенностями [2]. Примерно в 2% случаев мутация присутствует в мозаичном состоянии, лишь в части клеток пациента. У таких больных клинические проявления обычно менее ярки, а успех молекулярной диагностики не гарантирован. Кроме того, в *TSC1* и *TSC2* встречаются относительно крупные делеции/дупликации, затрагивающие целые экзоны или весь ген. По данным Kozlowski et al. [8], такие мутации встречаются с частотой в 0,5% в *TSC1* и 6% в *TSC2*. Выявление «крупных» повреждений требует применения специальных методик, например, мультиплексной лигазной пробозависимой амплификации (MLPA). Наконец, периодически молекулярно-генетический анализ выявляет нуклеотидные варианты (прежде всего, миссенс-мутации), функциональное значение которых неизвестно.

В ряде случаев крупные делеции и перестройки, затрагивающие регион *TSC2*, могут привести к повреждению расположенного рядом гена *PKD1*, мутации которого ответственны за развитие поликистоза почек взрослого типа. Подобного рода нарушения часто называют «синдромом близлежащего гена» (coniguous gene syndrome). У таких пациентов на фоне клиники туберозного склероза развивается тяжелая и рано манифестирующая поликистозная болезнь почек.

Наличие вышеперечисленных сложностей, а также недостаточная оснащенность необходимым оборудованием, приводит к тому, что молекулярная диагностика туберозного склероза в нашей стране проводится крайне редко. Нами разработан молекулярно-генетический тест, основанный на высокоразрешающем анализе кривых плавления продуктов ПЦР, и направленный на выявление мутаций в генах *TSC1* и *TSC2*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНК выделялась из цельной крови стандартным фенол-хлороформным методом. В качестве метода скрининга на наличие мутаций в кодирующей последовательности генов *TSC1* и *TSC2* использовалась ПЦР с последующим проведением высокоразрешающего анализа кинетики плавления ДНК (HRM-A) на приборе Biorad CFX-96 (Biorad Laboratories, USA). ПЦР-смесь (суммарный объем 20 мкл) содержала 1 мкл раствора кДНК, 0,75 ед. ДНК-полимеразы, 1-кратный ПЦР-буфер (pH 8,3), 2,5 мМ MgCl₂, 200 мКМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, 0,8 мкл прямого и обратного праймеров (10 пмоль/мкл) и 1 мкл флуоресцентного красителя Eva Green (20X). Реакция начиналась с 10-минутной активации ДНК-полимеразы при 95 °C; далее проводилось 50 циклов амплификации (денатурация: 15 с при 95 °C; отжиг: 30 с при 60–65 °C; элонгация: 30 с при 72 °C). Образцы, в которых выявлялись аномалии кривой плавления, подвергались секвенированию ДНК с использованием коммерческих наборов (Beckmann Coulter Inc., USA) согласно инструкциям производителя. Разделение продуктов секвенирования проводилось при помощи прибора для капиллярного электрофореза Beckmann 8000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для проведения молекулярно-генетического исследования нам были направлены образцы крови больного Б. и его отца. Клинический диагноз туберозного склероза был поставлен в ФГБУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» Минздрава России. Больной поступил в клинику в возрасте 1 года 7 месяцев с жалобами на эпилептические приступы, выраженную задержку психо-речевого и моторного развития. У probanda (III-1) наблюдались 4 «основных» диагностических признака туберозного склероза: гипопигментные пятна (более трех), туберы коркового вещества мозга, субэпендимальные узлы и множественные рабдомиомы сердца. Наследственность отягощена: у отца и дедушки по отцовской линии клинически определялись признаки туберозного склероза (рис. 1).

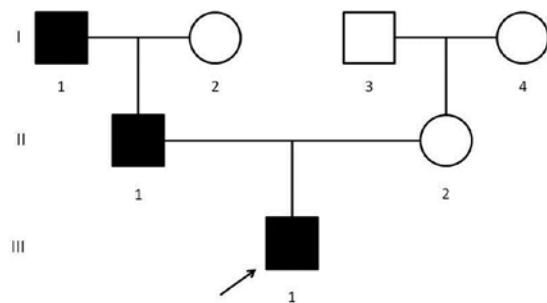


Рис. 1. Родословная больного Б. (III-1)

У отца probanda (II-1) наблюдались фиброзные бляшки на лбу и других участках тела, ангиофибромы лица, околоногтевые фибромы, гипопигментные пятна на коже (четыре «основных» признака). У деда (I-1) отмечались ангиофибромы лица, околоногтевые фибромы, гипопигментные пятна на коже (три «основных» признака). В результате проведения молекулярно-генетического анализа в образцах крови probanda Б. и его отца была обнаружена мутация гена *TSC1* c.1525C>T (p.R509X), приводящая к преждевременной терминации синтеза гамартина (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженная нами мутация *TSC1* c.1525C>T (p.R509X) неоднократно выявлялась в других исследованиях: например, в международной базе данных по мутациям при туберозном склерозе приводится 21 случай подобного генного дефекта [9]. Судя по всему, нуклеотид c. 1525 является «горячей точкой» для мутагенеза. Мутация *TSC1* c.1525C>T

(p.R509X) выявлялась в разных географических регионах (Западная Европа, Тайвань, Япония), как в семейных, так и в спорадических случаях.

Какие задачи преследует молекулярная диагностика туберозного склероза? Во-первых, выявление патогенных мутаций позволяет окончательно подтвердить клинический диагноз. Во-вторых, если молекулярное повреждение, ответственное за развитие болезни в данной семье, уже идентифицировано, можно выявить (или исключить) его наличие у членов семьи больного. Кроме того, появляется возможность проведения пренатальной диагностики. Обнаружение определенной мутации обладает и некоторой прогностической ценностью: как правило, мутации туберина и взаимодействующего с туберином домена гамартина вызывают более тяжелые состояния [13, 16]. Впрочем, ограниченность прогностического значения, к сожалению, демонстрирует и описанный нами случай. Обнаруженная нами мутация *TSC1* лежит за пределами домена, взаимодействующего с туберином, однако проявления

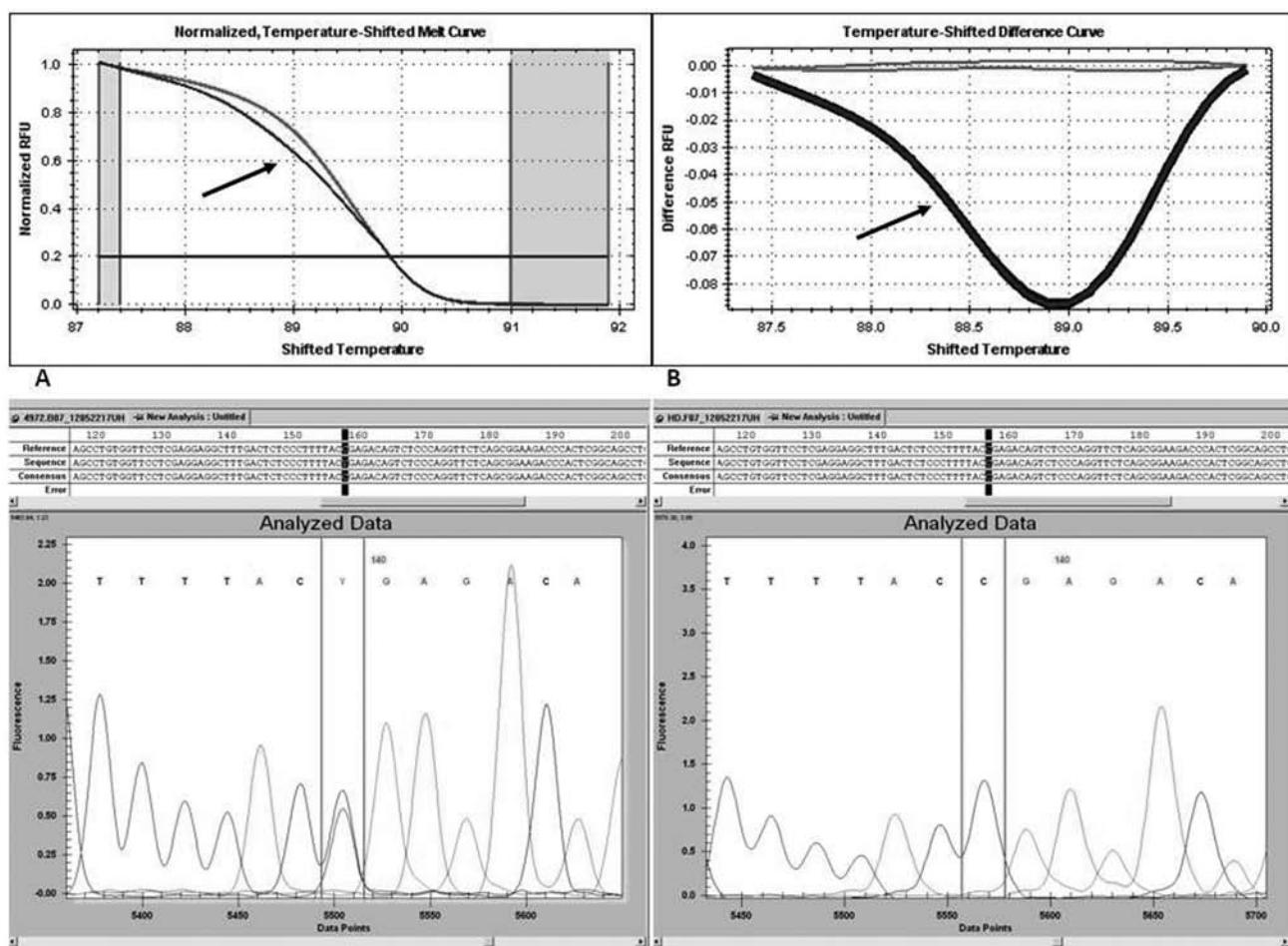


Рис. 2. А, В: Высоточный анализ кинетики плавления продуктов ПЦР. Стрелкой отмечена кривая плавления образца с мутацией; С: Мутация *TSC1* c.1525C>T (p.R509X); D: Нормальная нуклеотидная последовательность

болезни у пробанда Б. весьма тяжелы: симптомы заболевания проявились сразу после рождения, и судорожные припадки с большим трудом поддаются консервативной терапии.

Наконец, по-видимому, самым важным в практическом плане представляется использование мутаций *TSC1/TSC2* в качестве предиктивного маркера. В последние годы интенсивно разрабатывается стратегия фармакологической терапии туберозного склероза ингибиторами белка mTOR. Давно известны препараты, подавляющие активность фермента mTOR, и, следовательно, пролиферацию опухолевых клеток. Прежде всего, это антибиотик рапамицин, впервые выделенный еще в 1975 году. Как показали эксперименты на животных и клеточных культурах, применение рапамицина и его аналогов может функционально заместить дефектный *TSC1/2* и привести к регрессу гамартом, развитие которых связано с неограниченной активацией mTOR. За последние несколько лет проведен целый ряд успешных клинических испытаний по применению аналогов рапамицина для лечения наиболее агрессивных опухолевых проявлений туберозного склероза: гигантоклеточной астроцитомы, почечной ангиомолипомы и легочного лейомиоматоза. Результаты впечатляют значительный оптимизм, так как помимо весьма частого регресса соответствующих опухолей, нередко наблюдался эффект в отношении снижения частоты эпилептических припадков, уменьшения выраженности корковых туберов, улучшения микроархитектоники белого вещества [7]. В 2012 году FDA (Food And Drug Administration) одобрила применение препарата эверолимус (коммерческое название — афинитор) для лечения гигантоклеточной субэндемимальной астроцитомы и ангиомолипомы почек у больных туберозным склерозом. Ведутся клинические испытания по применению рапамицина (сиролимуса) и эверолимуса с целью лечения когнитивных нарушений, аутизма и эпилепсии. Так как в основе данного терапевтического подхода лежит воздействие на патогенез заболевания, в клинические испытания включаются лишь те больные, у которых подтверждено наличие патогенной мутации в *TSC1* или *TSC2*. Именно поэтому молекулярная диагностика туберозного склероза приобретает большое практическое значение.

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-00535-а

ЛИТЕРАТУРА

1. Au K-S., Williams A.T., Gambello M.J., Northrup H. Molecular Genetic Basis of Tuberous Sclerosis Complex: From Bench to Bedside // *J. Child. Neurol.* – 2004. – Vol.19 – N.9 – P. 699–709.
2. Camposano S.E., Greenberg E., Kwiatkowski D.J., Thiele E.A. Distinct clinical characteristics of tuberous sclerosis complex patients with no mutation identified // *Ann. Hum. Genet.* – 2009 – Vol. 73 – N. 2 – P. 141–146.
3. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16 // *Cell.* – 1993. – Vol. 75 – N. 7 – P. 1305–1315.
4. Griggs R.C., Batshaw M., Dunkle M. et al. Rare Diseases Clinical Research Network Clinical research for rare disease: opportunities, challenges, and solutions // *Mol. Genet. Metab.* – 2009. – Vol. 96, N.1 – P. 20–26.
5. Hunt A., Lindenbaum R.H. Tuberous sclerosis: a new estimate of prevalence within the Oxford region // *J. Med. Genet.* – 1984. – Vol. 21, N. 4. – P. 272–277.
6. Józwiak S., Schwartz R.A., Janniger C.K., Bielicka-Cymerman J. Usefulness of Diagnostic Criteria of Tuberous Sclerosis Complex in Pediatric Patients. // *J. Child Neurol.* – 2000. – Vol. 15, N. 10. – P. 652–659.
7. Kohrman M.H. Emerging treatments in the management of tuberous sclerosis complex // *Pediatr Neurol.* – 2012. – Vol. 46, N. 5 – P. 267–275.
8. Kozlowski P., Roberts P., Dabora S. et al. Identification of 54 large deletions/duplications in *TSC1* and *TSC2* using MLPA, and genotype-phenotype correlations. // *Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 121, N. 3–4. – P. 389–400.
9. Leiden Open Variation Database, *TSC1* (tuberous sclerosis 1) database URL: <http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/home.php> (состояние на 29.08.12).
10. Osborne J.P., Fryer A., Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1991. – Vol. 615. – P. 125–127.
11. Qin W., Chan J.A., Vinters H.V. et al. Analysis of TSC cortical tubers by deep sequencing of *TSC1*, *TSC2* and KRAS demonstrates that small second-hit mutations in these genes are rare events // *Brain Pathol.* – 2010. – Vol. 20, N. 6. – P. 1096–1105.
12. Roach E.S., Gomez M.R., Northrup H. Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference: Revised Clinical Diagnostic Criteria // *J. Child Neurol.* – 1998. – Vol. 13, N. 12 – P. 624–628.
13. Sancak O., Nellist M., Goedbloed M. et al. A Mutational analysis of the *TSC1* and *TSC2* genes in a diagnostic setting: genotype – phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 13, N. 6. – P. 731–741.
14. Schwartz R.A., Fernandez G., Kotulska K., Jozwiak S. Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2007. – Vol. 57, N. 2. – P. 189–202.

15. Staley B.A., Vail E.A., Thiele E.A. Tuberous Sclerosis Complex: Diagnostic Challenges, Presenting Symptoms, and Commonly Missed Signs // Pediatrics. – 2011. – Vol. 127 – P. 117–125.
16. Van Eeghen A.M., Black M.E., Pulsifer M.B. et al. Genotype and cognitive phenotype of patients with tuberous sclerosis complex // Eur. J. Hum. Genet. – 2012. Vol. 20 – N. 5 – P. 510–515.
17. Van Slegtenhorst M., de Hoogt R., Hermans C. Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34 // Science. – 1997. – Vol. 277, N. 5327. – P. 805–808.
18. Young J., Povey S. The genetic basis of tuberous sclerosis // Mol. Med. Today. – 1998. – Vol. 4, N.7. – P. 313–319.
19. Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2011. – Vol. 12, N.1. – P. 21–35.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF TUBEROUS SCLEROSIS

Yanus G.A., Suspitsyn Ye.N., Dorofeyeva M.Yu., Imyanitov Ye.N.

◆ **Resumé.** Tuberous sclerosis is a hereditary disease of phakomatoses group, characterized by the development of multiple hamartomas of brain, eyes, skin and visceral organs. Diagnostics of tuberous sclerosis requires identification of pathogenic mutations within *TSC1* or *TSC2* genes. Here we present a description of clinical case of tuberous sclerosis followed by detection of the causative mutation.

◆ **Key words:** tuberous sclerosis; molecular diagnostics; DNA sequencing.

◆ Информация об авторах

Янус Григорий Аркадьевич – клинический ординатор кафедры медицинской генетики. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2, кафедра медицинской генетики. 197758, Санкт-Петербург, ул. Ленинградская, д. 68, лаборатория молекулярной онкологии. E-mail: octavedoctor@yandex.ru.

Суспицын Евгений Николаевич – к.м.н., доцент кафедры медицинской генетики. НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 197758, Санкт-Петербург, ул. Ленинградская, д. 68, лаборатория молекулярной онкологии. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2, кафедра медицинской генетики. E-mail: evgeny.suspectsin@gmail.com.

Дорофеева Марина Юрьевна – к.м.н., старший научн. сотр. отдела психоневрологии и эпилептологии. ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздрава России. 125412, Москва, ул. Талдомская, д. 2. E-mail: mdorofeeva@inbox.ru.

Имянитов Евгений Наумович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медицинской генетики. НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 197758, Санкт-Петербург, ул. Ленинградская, д. 68, лаборатория молекулярной онкологии. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2, кафедра медицинской генетики. E-mail: evgeny@imyanitov.spb.ru.

Yanus Grigoriy Arkadyevich – resident doctor, Department of Medical Genetics. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, N.N. Petrov Institute of Oncology. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. 68, Leningradskaya St., St. Petersburg, 197758, Russia. E-mail: octavedoctor@yandex.ru.

Suspitsyn Yevgeniy Nikolayevich – MD, PhD, Associate Professor. N.N. Petrov Institute of Oncology. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 68, Leningradskaya St., St. Petersburg, 197758, Russia. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: evgeny.suspectsin@gmail.com.

Dorofeeva Marina Yuryevna – MD, PhD, Senior Researcher Department of Psychoneurology and Epileptology. Moscow Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery. 2, Taldomskaya St., Moscow, 125412, Russia. E-mail: mdorofeeva@inbox.ru.

Imyanitov Yevgeniy Naumovich – MD, PhD, Dr Med Sci, Prof., Head of the Department of Medical Genetics. N.N. Petrov Institute of Oncology. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 68, Leningradskaya St., St. Petersburg, 197758, Russia. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: evgeny@imyanitov.spb.ru.