

Использование функциональных тестов для оценки остаточной активности канала CFTR и индивидуального подбора эффективных CFTR-модуляторов для лечения пациентов с муковисцидозом с «мягким» и «тяжелым» генетическими вариантами

Е.Л.Амелина^{1,2}, А.С.Ефремова¹ ✉, Ю.Л.Мельяновская¹, Н.В.Булатенко¹, Т.Б.Бухарова¹,
Н.Ю.Каширская¹, С.А.Красовский¹⁻³, Д.В.Гольдштейн¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»: 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства: 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени Д.Д.Плетнева Департамента здравоохранения города Москвы»: 105077, Москва, ул. 11-я Парковая, 32

Резюме

Новые функциональные методы исследования активности канала CFTR – определение разности кишечных потенциалов (ОРКП) и форсколиновый тест на кишечных органоидах, получаемых из ректальных биоптатов больных муковисцидозом (МВ), приняты в ведущих лабораториях мира для научной и клинической работы. **Целью** исследования явилась оценка возможности применения новейших функциональных методик у взрослых больных МВ – носителей генетических вариантов гена *CFTR* – N1303K и R334W. **Материалы и методы.** Получены ректальные биоптаты у пациенток с МВ ($n = 2$) в возрасте 36 и 27 лет с генотипом CFTR R334W/F508del и N1303K/3821delT соответственно. Проведены ОРКП и форсколиновый тест на кишечных органоидах; полученные результаты сопоставлены с клиническими данными. **Результаты.** По результатам ОРКП подтверждено, что генетический вариант R334W является «мягким», с сохранением высокой остаточной функциональной активности канала CFTR, тогда как генетический вариант N1303K является «тяжелым» и приводит к утрате рабочего белка CFTR, что соответствует представленной клинической картине. Результаты форсколинового теста свидетельствуют о том, что вариант R334W хорошо поддается коррекции CFTR-модуляторами. Потенциатор VX-770 и корректор VX-809 оказывают слабое действие на стимуляцию форсколином органоидов при генетическом варианте N1303K. **Заключение.** Использование метода ОРКП и форсколинового теста на кишечных органоидах позволяет количественно оценить работу белка CFTR и *in vitro* определить эффективность таргетной терапии у пациентов с МВ.

Ключевые слова: муковисцидоз, генетические варианты CFTR, определение разности кишечных потенциалов, кишечные органоиды, форсколиновый тест, таргетная терапия.

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Работа выполнена на средства государственного задания для Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» и при финансовой поддержке благотворительного фонда «Острова».

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору Е.И.Кондратьевой за консультативную помощь при подготовке статьи.

Для цитирования: Амелина Е.Л., Ефремова А.С., Мельяновская Ю.Л., Булатенко Н.В., Бухарова Т.Б., Каширская Н.Ю., Красовский С.А., Гольдштейн Д.В. Использование функциональных тестов для оценки остаточной активности канала CFTR и индивидуального подбора эффективных CFTR-модуляторов для лечения пациентов с муковисцидозом с «мягким» и «тяжелым» генетическими вариантами. *Пульмонология*. 2021; 31 (2): 167–177. DOI: 10.18093/0869-0189-2021-31-2-167-177

Functional tests for assessment of residual CFTR channel activity and personalized selection of efficacious CFTR-modulators for cystic fibrosis patients with ‘mild’ and ‘severe’ genetic variants

Elena L. Amelina^{1,2}, Anna S. Efremova¹ ✉, Yuliya L. Melyanovskaya¹, Natal'ya V. Bulatenko¹,
Tat'yana B. Bukharova¹, Nataliya Yu. Kashirskaya¹, Stanislav A. Krasovskiy¹⁻³, Dmitriy V. Goldshtein¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Center for Medical Genetics”: ul. Moskvorech'e 1, Moscow, 1115478, Russia

² Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia: Orekhovyy bul'var 28, Moscow, 115682, Russia

³ D.D.Pletnev City Teaching Hospital, Moscow Healthcare Department: ul. Odinnadtsataya Parkovaya 32, Moscow, 105077, Russia

Abstract

Intestinal current measurement (ICM) and forskolin-induced swelling (FIS) assay in human intestinal organoids from rectal biopsies of cystic fibrosis (CF) patients are the new functional tests for assessment of CFTR channel activity that are widely used in the leading laboratories worldwide for scientific and clinical studies. **The aim** of the study was to assess the use of the new functional tests in adult CF patients with identified N1303K and R334W CFTR gene variants. **Methods.** Rectal suction biopsies were obtained from the two CF patients aged 36 and 27 years with N1303K/3821delT and R334W/F508del CFTR mutations, respectively. Results of the ICM and FIS assay in intestinal organoids were compared to the clinical data. **Results.** ICM has demonstrated that R334W is a 'mild' genetic variant with high residual CFTR channel activity. At the same time, N1303K is a 'severe' genetic variant and leads to a severe loss of CFTR channel function. These findings correlate with the clinical data. CFTR modulators compensate for the reduced activity of the R334W CFTR variant, as shown by the FIS assay. But there was a limited response of the forskolin-stimulated organoids to VX-770 potentiator and VX-809 corrector in the cells with N1303K genetic variant. **Conclusion.** ICM and FIS assay in human intestinal organoids are reliable methods for quantification of CFTR channel activity. They can also predict the efficacy of the targeted therapy in CF patients *in vivo*.

Key words: cystic fibrosis, genetic variants CFTR, intestinal current measurements, intestinal organoids, forskolin-induced swelling assay, targeted therapy

Conflicts of interest. The authors did not declare any conflicts of interest.

Funding. This study was supported by the state assignment of Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Center for Medical Genetics», Russian Academy of Science and received financial support from the "Ostrova" foundation.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Professor Elena I. Kondratyeva for her consultations during the preparation of this manuscript.

For citation: Amelina E.L., Efremova A.S., Melyanovskaya Yu.L., Bulatenko N.V., Bukharova T.B., Kashirskaya N.Yu., Krasovskiy S.A., Goldshtein D.V. Functional tests for assessment of residual CFTR channel activity and personalized selection of efficacious CFTR-modulators for cystic fibrosis patients with 'mild' and 'severe' genetic variants. *Pul'monologiya*. 2021; 31 (2): 167–177 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2021-31-2-167-177

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз, — моногенное заболевание, вызванное мутацией гена *CFTR*. В результате мутации гена происходит нарушение синтеза, структуры и функции белка CFTR — трансмембранного регулятора проводимости МВ. Это нарушает проницаемость хлорных каналов эпителиальных клеток, уменьшается или прекращается транспорт ионов хлора через апикальную мембрану клетки, абсорбция ионов натрия увеличивается, вызывая поступление в клетку воды и обезвоживая слизь на поверхности железистого эпителия. Вырабатываемый секрет становится густым и вязким, развивается системная экзокринопатия. Новейшее достижение в терапии МВ — таргетная терапия — основана на патогенетическом подходе к лечению и непосредственно воздействует на функцию белка CFTR. При таргетной терапии, в отличие от симптоматической, корректируется молекулярный дефект белка CFTR и демонстрируется высокая клиническая эффективность [1].

Решение о применении CFTR-модуляторов осложнено у пациентов с редкими мутациями CFTR, не включенных в список генетических вариантов, разрешенных к терапии CFTR-потенциаторами и корректорами. Применение метода определения разности кишечных потенциалов (ОРКП) и форсколинового теста на кишечных органоидах, получаемых из ректальных биоптатов пациентов, обеспечивает персонализированный подход при подборе *in vitro* таргетной терапии всем пациентам с МВ, включая носителей редких генетических вариантов.

По данным Регистра больных муковисцидозом Российской Федерации (2018) [2], генетические варианты гена *CFTR* N1303K (с.3909C>G, р.(Asn1303Lys)) и R334W (с.1000C>T, р.(Arg334Trp)) находятся на 9-й и 13-й позициях, их аллельная частота составляет 1,55 и 0,90 % соответственно, что определяет интерес к представленным методикам и клиническим наблюдениям.

Материалы и методы

Метод ОРКП используется для диагностики функции CFTR, позволяя дифференцировать мутации без детектируемой активности CFTR и мутации с остаточной активностью CFTR.

Исследование по методу ОРКП проводилось согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 [3, 4] на клинической базе научно-клинического отдела муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова».

Алгоритм работы состоит из нескольких этапов и описан в литературе [5]:

- 1-й этап — калибровка оборудования (VCC MC 8B421 *Physiologic Instrument, San Diego, США*);
- 2-й этап — установка биоптатов (забор 3 биоптатов проводился с использованием оборудования *Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model FB-230U)* согласно инструкции) и заполнение камер раствором буфера *Meyley*;
- 3-й этап — добавление стимуляторов в последовательности: амилорид (натриевый канал), форсколин / IBMX (хлорный канал), гинестеин (хлорный канал), карбахол (кальциевый канал), ΔISC (анионный транспорт) и в конце — гистамин (кальциевый канал). Исследование заканчивалось после записи базального тока короткого замыкания.

В группу контроля вошли здоровые добровольцы. Пациенты с МВ, гомозиготные по F508del, вошли в группу сравнения (F508del/F508del) [5].

Стабильные культуры органоидов получены по методикам, приведенным в работах [6–9]. Подробное описание методов получения культур приведено в работе *A.M.Vonk et al.* [9]. До забора биоптатов каждый пациент подписал добровольное согласие на проведение исследований. Для получения культуры органоидов достаточно 2–3 биоптатов. За счет деления

стволовых клеток, находящихся в криптах, образуется первичная культура органоидов. Для выделения крипт ткань обрабатывается 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (*Thermo Fisher Scientific*, США) в течение 40 мин. Затем крипты осаждаются центрифугированием при 130 g в течение 5 мин при 4 °С. На всех этапах культивирования крипты и органоиды выращивались в каплях Матригеля (*Corning*, США). В ростовой среде для органоидов содержались Advanced DMEM/ F12 (20 %; *Thermo Fisher Scientific*, США), B27 (*Life Technologies: Gibco*, США), никотинамид (*Sigma-Aldrich*, США), N-ацетилцистеин (*Sigma-Aldrich*, США), mEGF (*Prospec*), A83-01 (*Tocris*, Великобритания), SB 202190 (*Sigma-Aldrich*, США) и примоцин (*InvivoGen*, США), а также 50-, 20- и 10%-ные среды, обогащенные факторами роста Wnt-3A, R-spondin и Noggin соответственно. Подробное описание получения кондиционированных сред приводится в работах *S.F.Boj* и *A.M.Vonk et al.* [8, 9]. При культивировании крипт дополнительно использовались гентамицин (*Life Technologies, Gibco*, США) и ванкомицин (*Sigma-Aldrich*, США). Пересев органоидов путем механического разрушения проводился 1 раз в 6–8 дней после их разрастания и появления множества почкующихся структур.

Для форсколинового теста органоиды высевались в 96-луночные планшеты по ~50 органоидов в 1 капле Матригеля. На этапе посева в соответствующие лунки добавлялся корректор VX-809 (*Selleckchem*, США). Через 24 ч проводилось окрашивание *Calcein AM* (*Biotium*) и обработка в течение 60 мин форсколином с использованием рабочих концентраций 0,02; 0,128; 0,8 и 5 мкМ. Одновременно с форсколином добавлялся потенциатор VX-770 (*Selleckchem*, США). Съемка проводилась при помощи микроскопа *Observer D1* (*Zeiss*, Германия). Результаты анализировались при помощи программ *Image J*, *Sigma Plot 12.5* и *Microsoft Excel* (2007). Исследование проводилось в лаборатории стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова».

Результаты

При миссенс-мутации R334W происходит однонуклеотидная замена цитозина в положении 1 000 в 8-м экзоне гена *CFTR* на тимин, что ведет к замене аминокислоты аргинина в 334-м положении белка на триптофан. Вариант относится к IV классу. В базе *CFTR2* данный вариант занимает 34-е место по аллельной частоте и составляет 0,3 % [10].

Клиническое наблюдение № 1

Пациентка Н. 1984 года рождения с 18-летнего возраста наблюдается в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства с диагнозом МВ, преимущественно легочная форма, множественные бронхоэктазы; хроническое инфицирование дыхательных путей *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Из анамнеза известно, что бронхит, а затем пневмония как первые проявления заболевания со стороны респираторного тракта появились в возрасте 3 мес., диагноз установлен в мае 1996 г. в Обособленном структурном подразделении «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е.Вельтишева» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, подтвержден положительным потовым тестом (хлориды пота – 78,7 ммоль / л по Гибсону–Куку; норма – до 40 ммоль / л; пограничные значения – 40–60 ммоль / л; положительный – > 60 ммоль / л). С мая 1997 г. – инфицирование дыхательных путей *P. aeruginosa*. Выявлены 2 мутации в гене *CFTR*: F508del/R334W. С 18 лет определяется среднетяжелая степень бронхиальной обструкции (объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁) – 60–50 %_{долж.}). Проводится ежедневная базисная и курсовая антибактериальная терапия. В марте 2008 г. родила дочь. Установлена постепенная деградация респираторной функции. С 2019 г. проводится кислородотерапия низкочастотным кислородом в ночное время. В настоящее время основными жалобами являются кашель с трудноотделяемой гнойной мокротой (около 50 мл в сутки), одышка при небольшой физической нагрузке. При осмотре выявлено снижение показателей массы тела и роста (масса тела – 40 кг, рост – 150 см, индекс массы тела (ИМТ) – 17,7 кг / м²); при аускультации грудной клетки выявлены множественные разнотональные хрипы в легких; частота дыхательных движений – 22 в минуту, сатурация гемоглобина кислородом – 89 %, частота сердечных сокращений – 90 в минуту, артериальное давление – 115 / 70 мм рт. ст. Показатели спирометрии: нарушение функции внешнего дыхания по обструктивному типу (ОФВ₁ – 0,92 л (32 %_{долж.}); форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) – 1,82 л (62 %_{долж.}); ОФВ₁ / ФЖЕЛ – 47 %). При компьютерной томографии органов грудной клетки во всех отделах обоих легких определяется расширение бронхов III–IV порядков с формированием множественных цилиндрических и варикозных бронхоэктазов, во многих определяется содержимое и перифокальная инфильтрация (рис. 1). В анализе мокроты – *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Внешнесекреторная функция поджелудочной железы до 2009 г. характеризовалась минимальными изменениями: уровень панкреатической эластазы – 250 мкг / г (норма – > 200 мкг / г), в январе 2019 г. (в возрасте 34 лет) – незначительное снижение до 197 мкг / г (норма – > 200 мкг / г).

Пациентка получает комплексную терапию, включая внутривенные и ингаляционные антибактериальные препараты в соответствии с антибиотикограммой, муколитическую, заместительную ферментную терапию, кинезитерапию. Однако несмотря на интенсивное лечение, продолжается стойкое снижение респираторной функции с нарастающей дыхательной недостаточностью. В генотипе пациентки найдена редкая миссенс-мутация R334W, для повышения эффективности проводимой терапии необходимо решить вопрос о возможности патогенетического лечения *CFTR*-модуляторами с предварительной оценкой ОРКП и результатов форсколинового теста на органоидах

для определения функции хлорного канала и ответа *in vitro* на CFTR-корректоры и потенциаторы.

Методом ОРКП получены следующие результаты (табл. 1, рис. 2): плотность тока короткого замыкания (Δ ISC)

в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $-7,67 \pm 3,21 \mu\text{A} / \text{cm}^2$. Изменение Δ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило $6,83 \pm 1,24 \mu\text{A} / \text{cm}^2$. В ответ на введение

Таблица 1
Показатели плотности тока короткого замыкания при введении стимуляторов у пациента с вариантом R334W в геномине

Table 1
Parameters of short-circuit current density after addition of stimulants in a patient with the R334W gene variant

Δ ISC, $\mu\text{A} / \text{cm}^2$	Амилорид	Форсколин / IBMX	Генистеин	Карбахол	DIDS	Гистамин
Биоптат:						
• 1	-12,5	8,5	0	26,5	0	21,5
• 2	-3,5	5	0	10,5	0	6,5
• 3	-7	7	0	19,5	0	16,5
<i>M</i> \pm <i>m</i>	$-7,67 \pm 3,21$	$6,83 \pm 1,24$	0	$18,83 \pm 5,67$	0	$14,83 \pm 5,4$
F508del/F508del	$-18,39 \pm 5,62$	$3,06 \pm 0,89$	$1,83 \pm 0,35$	-	$1,83 \pm 0,35$	$21,50 \pm 5,46$
Здоровые пациенты	$-7,67 \pm 1,76$	$26,72 \pm 2,66$	$2,08 \pm 0,38$	$117,44 \pm 4,32$	$1,92 \pm 0,37$	$109,76 \pm 8,18$

Примечание: DIDS (4,4-diisothiocyano stilbene-2,2-disulfonic acid) – 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота.

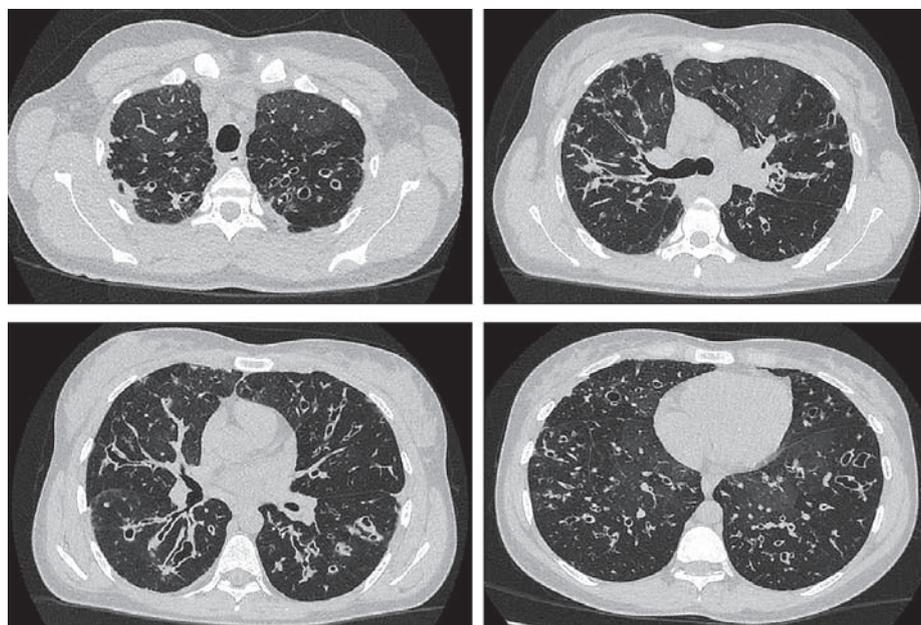


Рис. 1. Компьютерная томограмма пациентки Н. 1984 года рождения
Figure 1. Computed tomography scan of patient N., born in 1984

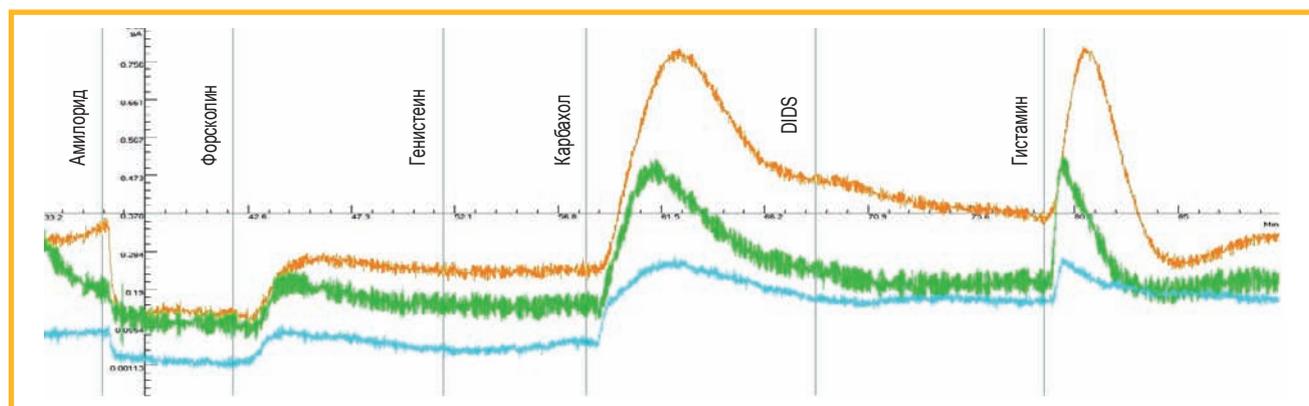


Рис. 2. Метод определения разности кишечных потенциалов. Пациент с генотипом F508del/R334W

Примечание: DIDS (4,4-diisothiocyano stilbene-2,2-disulfonic acid) – 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота; при введении амилорида выявлено снижение плотности тока короткого замыкания, ответ на форсколин / IBMX – ослабленный, на добавление карбахола наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную, а на добавление гистамина – в положительную сторону.

Figure 2. Intestinal current measurements. Patient with F508del/R334W genotype

Note. With the addition of amiloride, a decrease in short circuit current (Δ ISC) occurred. The response to forskolin/IBMX was weak. A negative change in the short circuit current was observed after the addition of carbachol, and a positive change, after histamine.

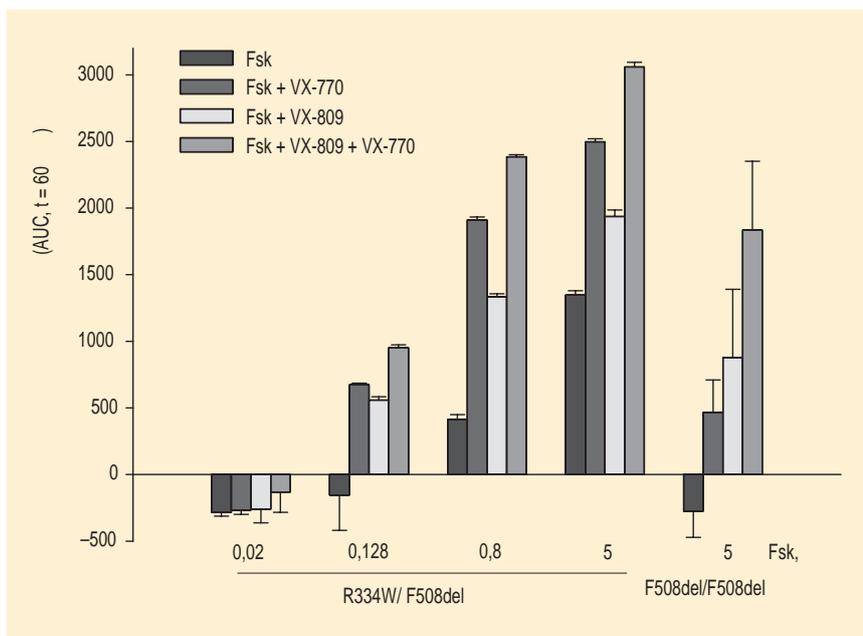


Рис. 3. Результаты количественной оценки набухания органоидов при действии форсколина и CFTR-модуляторов для пациента с генотипом R334W/F508del в сравнении с контролем (генотип F508del/F508del)
Figure 3. Quantitative evaluation of organoid swelling upon treatment with forskolin and CFTR modulators in a patient with R334W/F508del gene variant as compared to control (F508del/F508del gene variant)

карбахола Δ ISC изменился в отрицательную сторону и составил $18,83 \pm 5,67 \mu\text{A} / \text{cm}^2$. При введении гистамина Δ ISC изменяется в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила $14,83 \pm 5,4 \mu\text{A} / \text{cm}^2$.

Заключение: результаты теста свидетельствуют о сниженной функции канала CFTR.

При сравнении данных пациента с показателями группы контроля и группы гомозигот по варианту F508del показано, что у пациента с вариантом R334W ответ на амилорид не отличается от группы контроля, но ниже, чем в группе F508del/F508del (см. табл. 1). Изменение Δ ISC на введение фосколина у пациента с генетическим вариантом R334W было выше, чем в группе гомозигот F508del/F508del, но ниже, чем в контрольной группе. При этом ответ на гистамин у пациента с R334W в генотипе был ниже, чем в других группах (группа F508del/F508del и контроля).

Таким образом, генетический вариант R334W характеризуется остаточной функцией хлорного канала, функция натриевого канала соотносится с таковой в группе здоровых лиц, а функция кальциевых каналов снижена, поэтому его можно отнести к «мягким» вариантам.

Из ректальных биоптатов пациента с генотипом R334W/F508del получена стабильная культура кишечных органоидов для исследования остаточной функции канала CFTR и влияния CFTR-модуляторов (корректора VX-809 и потенциатора VX-770) на активность канала при генетическом варианте R334W.

Для генетического варианта R334W обнаружена высокая остаточная активность CFTR (рис. 3, 4) — после 1 ч обработки 5 мкМ форсколина размер органоидов увеличивается на 50 % по сравнению с исходным. Ответ обусловлен только «вкладом» мутации R334W, поскольку F508del/F508del органоиды (контроль) не набухают при действии одного лишь форсколина (рис. 3). Оба используемых модулято-

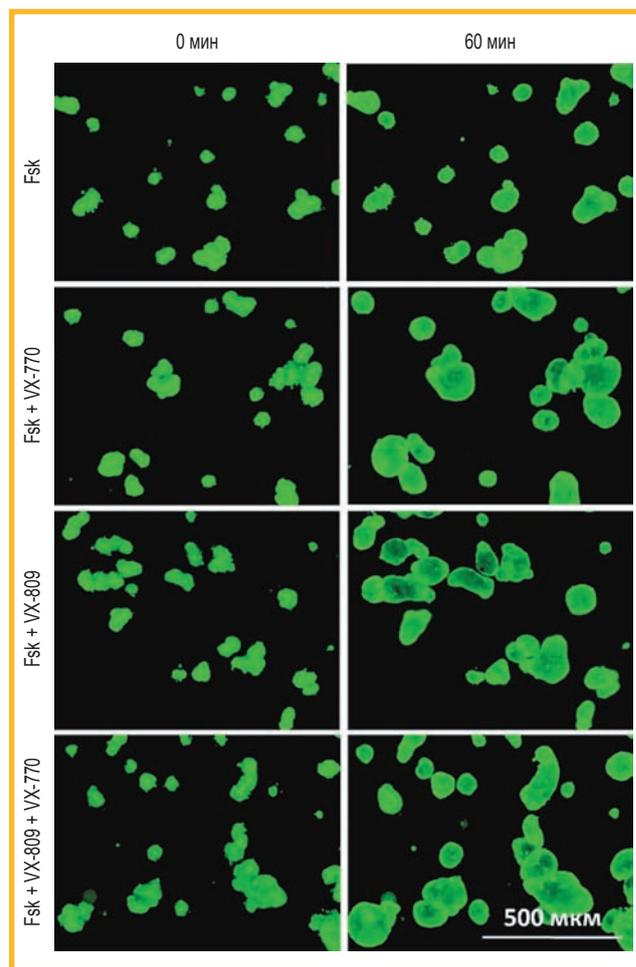


Рис. 4. Характерные изображения кишечных органоидов с генотипом R334W/F508del до воздействия форсколина (5 мкМ) и таргетных препаратов (оба – 3 мкМ) и после завершения обработки
Примечание: окраска – calcein (0,84 мкМ, 1 ч), объектив $\times 5$, масштабная шкала – 500 мкм

Figure 4. Representative images of intestinal organoids with R334W/F508del gene variant before and after the treatment with forskolin (5 μM) and targeted drugs (both at 3 μM)

Note: Calcein stain (0.84 μM , 1 h), $\times 5$ magnification, scale bar 500 μm

ра положительно влияют на восстановление функциональных характеристик канала CFTR – в присутствии потенциатора VX-770 размер органоидов увеличивается на 100 % по сравнению с исходным размером, после инкубации с VX-809 – на 90 %, при сочетании потенциатора и корректора – на 110 % по сравнению с исходным размером (при обработке 5 мкМ форсколина). Эффективность модуляторов выше, чем у контрольной F508del/F508del культуры, мутация R334W относится к «мягким», пациентам с генетическим вариантом R334W может быть рекомендована терапия потенциатором VX-770 или комбинированным препаратом, сочетающим потенциатор и корректор (VX-770 + VX-809).

Генетический вариант гена CFTR N1303K (с.3909C>G, р.(Asn1303Lys)) представляет собой замену цитозина на гуанин в положении 3 909 в 24-м экзоне. Традиционно вариант относится ко II классу. В Европейском регистре тяжелых МВ (2018) данный вариант занимает 3-е место, аллельная частота составляет 2,12 % [11]. Вариант описан в международных базах данных.

Клиническое наблюдение № 2

Пациентка К. 1992 года рождения с 2017 г. наблюдается в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства с диагнозом МВ тяжелого течения, хронический гнойный бронхит, множественные бронхоэктазы. Хроническое инфицирование дыхательных путей *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*. Хроническая панкреатическая недостаточность.

Из анамнеза известно, что с рождения отмечались симптомы поражения поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта в виде полифекалии, видимой стеатореи, выпадения прямой кишки, отставания в наборе массы тела. С 6 мес. – частые бронхиты, пневмонии.

Диагноз МВ установлен в январе 1996 г. в возрасте 4 лет подтвержден повторными высокими показателями потового теста и ДНК-диагностикой, по данным которой выявлены 2 мутации в гене CFTR – N1303K/3821delT. С 11-летнего возраста отмечается инфицирование дыхательных путей *P. aeruginosa*, с 25 лет периодически – *Achromobacter spp.* В настоящее время жалобы на кашель с гнойной мокротой (около 100 мл в сутки).

При осмотре объективно обращали на себя внимание снижение нутритивного статуса (масса тела – 49 кг, рост – 169 см, ИМТ – 17,1 кг / м²), рассеянные сухие и влажные хрипы в легких, преимущественно в верхних отделах с обеих сторон при аускультации грудной клетки; частота дыхательных движений – 18 в минуту, сатурация гемоглобина кислородом – 95 %, частота сердечных сокращений – 84 в минуту, артериальное давление – 120 / 75 мм рт. ст. По данным спирометрии выявлено нарушение функции внешнего дыхания по obstructivному типу, выраженная бронхиальная обструкция – показатели ОФВ₁ – 1,74 л (51,3 %_{долж.}) при ФЖЕЛ – 3,26 л (83,7 %); ОФВ₁ / ФЖЕЛ – 53,5 %. По данным микробиологического анализа мокроты выявлены *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

При компьютерной томографии органов грудной клетки отмечается неравномерная пневматизация легочной паренхимы, цилиндрические и мешотчатые бронхоэктазы во всех отделах легких с обеих сторон от 4 до 22 мм в диаметре, некоторые – с наличием содержимого. Выявлена перибронхиальная инфильтрация на фоне утолщения и уплотнения стенок бронхов (рис. 5). Тяжелое нарушение внешнесекреторной функции поджелудочной железы подтверждалось выраженным снижением уровня панкреатической эластазы-1 в стуле (< 20 мкг / г; норма – > 200 мкг / г). В схему терапии были включены кинезитерапия, муколитические и заместительные ферментные препараты, а также комплексное лечение внутривенными и ингаляционными антибактериальными препаратами в соответствии с данными антибиотикограммы.

В связи с наличием генотипа N1303K/3821delT решено провести ОРКП и форсколиновый тест для оценки

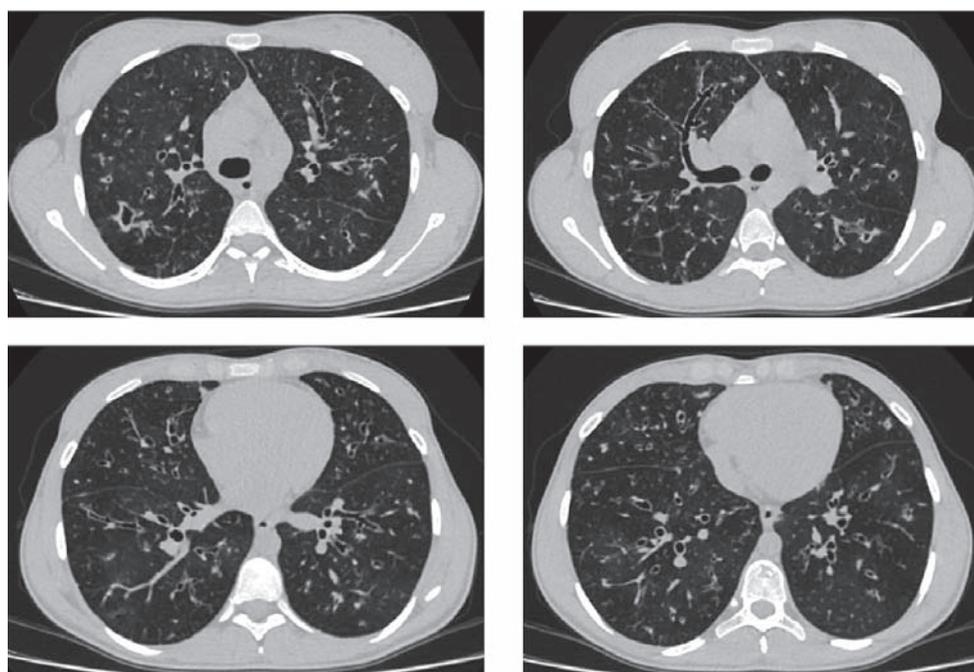


Рис. 5. Компьютерная томограмма пациентки К. 1992 года рождения
Figure 5. Computed tomography scan of patient K., born in 1992

Таблица 2
Показатели снижения плотности тока короткого замыкания при введении стимуляторов у пациента с генотипом N1303K

Table 2
Parameters of short-circuit current density after addition of stimulants in a patient with the N1303K gene variant

ΔISC, $\mu\text{A} / \text{cm}^2$	Амилорид	Форсколин	Генистеин	Карбахол	DIDS	Гистамин
Биоптат:						
• 1	-7,5	0,5	0	5	0	6,5
• 2	-8	2	0	5	0	6,5
• 3	-7,5	1	0	3,5	0	3
$M \pm m$	$-7,67 \pm 0,20$	$1,17 \pm 0,54$	0	$4,50 \pm 0,61$	0	$5,33 \pm 1,43$
F508del/F508del	$-18,39 \pm 5,62$	$3,06 \pm 0,89$	$1,83 \pm 0,35$	-	$1,83 \pm 0,35$	$21,50 \pm 5,46$
Здоровые пациенты	$-7,67 \pm 1,76$	$26,72 \pm 2,66$	$2,08 \pm 0,38$	$117,44 \pm 4,32$	$1,92 \pm 0,37$	$109,76 \pm 8,18$

Примечание: ΔISC (decrease in the short-circuit current) – снижение тока короткого замыкания; DIDS (4,4-diisothiocyano stilbene-2,2-disulfonic acid) – 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота.

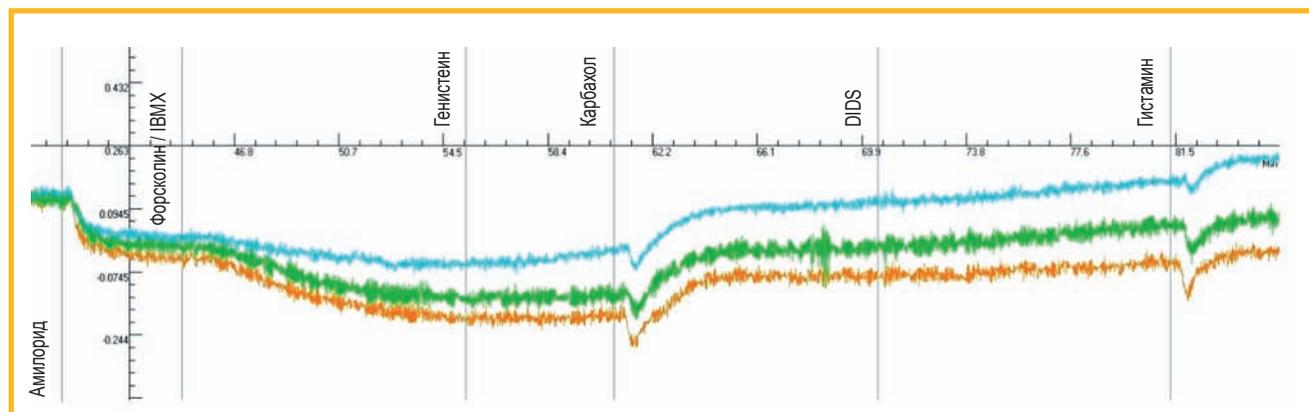


Рис. 6. Метод определения разности кишечных потенциалов. Пациент с генотипом N1303K/3821delT

Примечание: DIDS (4,4-diisothiocyano stilbene-2,2-disulfonic acid) – 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота; при введении амилорида происходило снижение плотности тока короткого замыкания, ответ на форсколин / IBMX отсутствует, на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Figure 6. Intestinal current measurements. Patient with N1303K/3821delT genotype

Note: With the addition of amiloride, a decrease in the short-circuit current (ΔISC) occurred. There was no response to forskolin/IBMX, and the addition of carbachol and histamine showed a negative change in the short-circuit current.

функции хлорного канала и возможности терапии CF-TR-модуляторами.

Пациентке проведено исследование методом ОРКП (табл. 2; рис. 6), получены следующие результаты: плотность тока короткого замыкания (ΔISC) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $-7,67 \pm 0,2 \mu\text{A} / \text{cm}^2$. Изменение ΔISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило $1,17 \pm 0,54 \mu\text{A} / \text{cm}^2$, что свидетельствовало об отсутствии функции хлорного канала. В ответ на введение карбахола ΔISC изменилась в отрицательную сторону и составил $4,5 \pm 0,61 \mu\text{A} / \text{cm}^2$. При введении гистамина ΔISC изменилась в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила $5,33 \pm 1,43 \mu\text{A} / \text{cm}^2$.

При анализе полученных данных с группой контроля и сравнения выявлено, что ответ на амилорид у пациентки с вариантом N1303K в генотипе был ниже, чем в группах с генотипом F508del/F508del и контрольной. Ответ на добавление форсколина в исследуемой группе был ниже, чем в группе F508del/F508del и контроле. Ответ на гистамин также был ниже, чем в остальных группах.

Таким образом, при помощи метода ОРКП показано, что CFTR-канал не функционирует, функция кальциевого канала снижена, функция натриевого канала оставалась в пределах аналогичных показателей у здоровых лиц.

Из ректальных биоптатов пациента с генотипом N1303K/3821delT получена культура кишечных органоидов для исследования остаточной функции канала CFTR и влияния CFTR-модуляторов (корректора VX-809 и потенциатора VX-770) на активность канала при генетическом варианте N1303K.

Генотип N1303K/3821delT включает генетический вариант I класса 3821delT, при котором нарушается синтез мРНК CFTR. N1303K/3821delT органоиды не отвечают на стимуляцию форсколином ($0,02-5,00 \mu\text{M}$), это значит, что генетический вариант N1303K приводит к полному нарушению синтеза функционального белка CFTR (рис. 7, 8). CFTR-модуляторы оказывают незначительное влияние. И потенциатор, и корректор, добавленные по отдельности, приводят к увеличению размера органоидов на $\sim 20\%$, а при их сочетании наблюдается аддитивный эффект и размер органоидов увеличива-

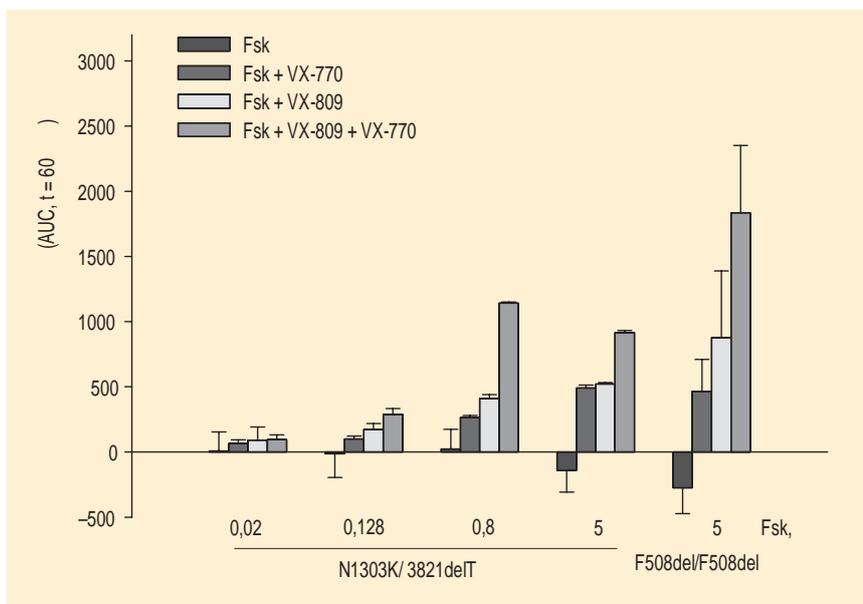


Рис. 7. Результаты количественной оценки набухания органоидов при действии форсколина и CFTR-модуляторов для пациента с генотипом N1303K/3821delT в сравнении с F508del/F508del контролем. Примечание: AUC (area under the curve) – площадь под частью фармакокинетической кривой.
Figure 7. Quantitative evaluation of organoid swelling upon treatment with forskolin and CFTR modulators in a patient with N1303K/3821delT gene variant as compared to control (F508del/F508del gene variant)

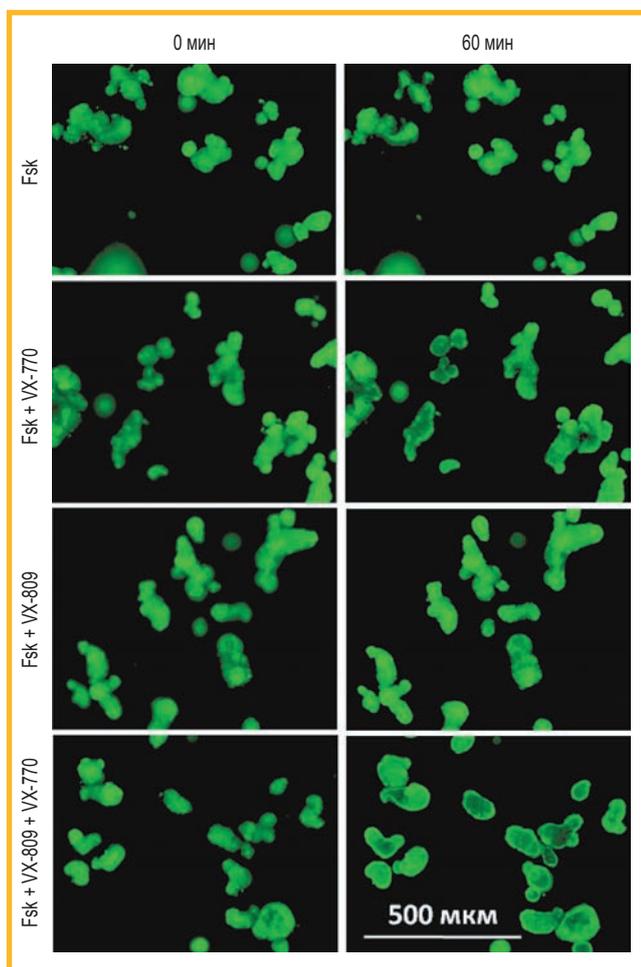


Рис. 8. Характерные изображения кишечных органоидов с генотипом N1303K/3821delT до воздействия форсколина (5 мкМ) и таргетных препаратов (оба – 3 мкМ) и после завершения обработки

Примечание: окраска – calcein (0,84 мкМ, 1 ч), объектив × 5, масштабная шкала – 500 мкм.

Figure 8. Representative images of intestinal organoids with N1303K/3821delT gene variant before and after the treatment with forskolin (5 μM) and targeted drugs (both at 3 μM)

Note: Calcein stain (0.84 μM, 1 h), × 5 magnification, scale bar 500 μm.

ется на 50 % по сравнению с исходным (при обработке 5 мкМ форсколина). Как и F508del, генетический вариант N1303K относится ко II классу.

Наблюдаемые ответы на действие VX-770 и VX-809, добавленных по отдельности, сопоставимы между N1303K/3821delT и F508del/F508del культурами (рис. 7). Однако при комбинированном воздействии CFTR-модуляторов набухание контрольных F508del/F508del органоидов выше, чем у N1303K/3821delT, и составляет 70 % по сравнению с исходным размером. При ответах ниже, чем в контрольной группе, терапия таргетными препаратами не может быть рекомендована пациентам, поскольку их применение не приведет к видимому терапевтическому эффекту.

Обсуждение

Современное лечение МВ во многом определяется электрофизиологическими методами и методами, основанными на клеточных культурах, и занимают все большее место в диагностике. Долгие годы оценка поражения поджелудочной железы являлась единственным методом верификации «тяжести» вариантов гена *CFTR*. Методы ОРКП и кишечных органоидов в определенной мере стали дополнять клиническую оценку и позволяют количественно определить работу *CFTR*.

Результаты ОРКП соответствуют клинической картине МВ в представленных клинических наблюдениях – тяжесть поражения респираторного тракта у пациентки с «мягким» генотипом, обусловленным вариантом R334W (клиническое наблюдение № 1), выражена не меньше, чем у пациентки с «тяжелым» генотипом N1303K/3821delT (клиническое наблюдение № 2), при этом «мягкий» генотип обладает протективным влиянием, препятствующим развитию панкреатической недостаточности, о чем свидетельствует высокий уровень панкреатической эластазы в анализе стула у пациентки с генотипом F508del/R334W по сравнению с аналогичным показателем у пациентки с генотипом N1303K/3821delT. Такое

взаимодействие генотипа и фенотипа соответствует данным европейского консенсуса о том, что «тяжелый» генотип *CFTR* ассоциирован с ранней панкреатической недостаточностью, тогда как для «мягкого» генотипа характерна сохранная функция поджелудочной железы или позднее развитие панкреатической недостаточности [12].

Кишечные органоиды представляют собой клеточную 3D-модель *in vitro*, по строению и свойствам близкую слизистой кишечника *in vivo* [13]. Количество белка *CFTR* и его функциональная активность на апикальной мембране кишечных органоидов, полученных от конкретного пациента, соотносятся с этими характеристиками *in vivo* в слизистой эпителия кишечника. При стимуляции форсколином происходит активация белка *CFTR* и набухание органоидов. Степень форсколин-индуцированного набухания соотносится с остаточной активностью *CFTR* канала в клетках — чем сильнее ответ на форсколин, тем выше функциональная активность *CFTR*.

На модели кишечных органоидов генетические варианты *CFTR* удобнее исследовать при наличии гомозиготного генотипа или при сочетании исследуемой мутации *CFTR* с мутацией I или II класса, которые сопряжены с полной утратой функционального белка. В этом случае остаточная активность канала *CFTR* на стимуляцию форсколином будет обусловлена только вкладом изучаемого генетического варианта *CFTR*. При исследовании генотипов R334W/F508del и N1303K/3821delT, в которых изучаемые мутации как раз сочетаются с мутациями I и II классов, показано, что генетический вариант R334W является «мягким», с сохранением высокой остаточной функциональной активности канала *CFTR*, тогда как генетический вариант N1303K является «тяжелым» и приводит к утрате рабочего белка *CFTR*. Результаты форсколинового теста свидетельствуют о том, что вариант R334W хорошо поддается коррекции *CFTR*-модуляторами. Наибольший эффект наблюдается при совместном применении VX-770 и VX-809. Для N1303K-варианта не обнаружено эффективного восстановления функциональной активности *CFTR* при применении таргетных препаратов.

Полученные результаты согласуются с литературными данными [7, 14–16]. В ранее проведенных исследованиях у пациентов выявлены генотипы R334W/R746X [7, 15] R334W/F508del [7, 15, 16], N1303K/F508del, [7, 14] R334W/N1303K [15]. На кишечных органоидах с генетическим вариантом R334W при помощи форсколинового теста обнаружена остаточная активность белка *CFTR* [15, 16]. Добавление потенциатора ивакафтора (VX-770) и в меньшей степени — лумакафтора (VX-809) привело к восстановлению функциональной активности *CFTR* [16], хотя в работах J. Dekkers et al. [7] и M. van Willigen et al. [15] положительного эффекта от воздействия VX-809 не обнаружено, при этом в случае использования лумакафтора усиливалось действие ивакафтора [9, 14, 15]. Высокий эффект ивакафтора согласуется с нарушениями, характерными для мутаций IV класса гена *{RD}* *CFTR*. При данном типе мутаций нарушается в основном функция хлорного канала [17].

Заключение

Использование метода ОРКП и форсколинового теста на кишечных органоидах, получаемых из ректальных биоптатов, позволяет количественно оценить работу белка *CFTR* и *in vitro* определить целесообразность назначения таргетной терапии всем пациентам с МВ, включая носителей редких генетических вариантов. В диагностике и лечении больных МВ необходимо широкое применение электрофизиологических методов и методов, основанных на клеточных культурах.

Литература

1. Lopes-Pacheco M. *CFTR* modulators: The changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 1662. DOI: 10.3389/FPHAR.2019.01662.
2. Амелина Е.Л., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И. и др., ред. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2018 год. М.: Медпрактика-М; 2020. Доступно на: https://mukoviscidoz.org/doc/register/web_block_Registre_2018.pdf
3. Derichs N., Sanz J., Von Kanel T. et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax.* 2010; 65 (7): 594–599. DOI: 10.1136/THX.2009.125088.
4. Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A. et al. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and Non-CF subjects to monitor *CFTR* function. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e73905. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0073905.
5. Мельяновская Ю.Л., Кондратьева Е.И., Куцев С.И. Определение референтных значений для метода определения разности кишечных потенциалов в Российской Федерации. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2020; 15 (2): 162–165. DOI: 10.14300/MNNC.2020.15039.
6. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for *CFTR*-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013; 1 (1): e27112. DOI: 10.4161/rdis.27112.
7. Dekkers J.F., Berkers G., Kruisselbrink E. et al. Characterizing responses to *CFTR*-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8 (344): 344ra84. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad8278.
8. Boj S.F., Vonk A.M., Statia M. et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: an *in vitro* assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J. Vis. Exp.* 2017; (120): e55159. DOI: 10.3791/55159.
9. Vonk A.M., van Mourik P., Ramalho A.S. et al. Protocol for application, standardization and validation of the forskolin-induced swelling assay in cystic fibrosis human colon organoids. *STAR Protoc.* 2020; 1 (1): 100019. DOI: 10.1016/J.XPRO.2020.100019.
10. *CFTR2*. The Clinical and Functional Translation of *CFTR*. Available at: <http://cfr2.org>
11. ECFS. Zolin A., Orenti A., Naehrlich L. et al. ECFS Patient Registry Annual Report 2018. Version 1.4.

Available at: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report_2018_v1.4.pdf [Accessed: February 01, 2021].

12. Castellani C., Cuppens H., Macek M. Jr et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7 (3): 179–196. DOI: 10.1016/J.JCF.2008.03.009.
13. Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Каширская Н.Ю., Гольдштейн Д.В. Применение кишечных органоидов для персонализированной диагностики и терапии муковисцидоза. *Медицинская генетика.* 2018; 17 (9): 3–12.
14. Dekkers J.F., Gogorza Gondra R.A., Kruisselbrink E. et al. Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids. *Eur. Respir. J.* 2016; 48 (2): 451–458. DOI: 10.1183/13993003.01192-2015.
15. van Willigen M., Vonk A.M., Yeoh H.Y. et al. Folding-function relationship of the most common cystic fibrosis-causing CFTR conductance mutants. *Life Sci. Alliance.* 2019; 2 (1): e201800172. DOI: 10.26508/LSA.201800172.
16. Ramalho A.S., Fürstová E., Vonk A.M. et al. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2021; 57 (1): 1902426. DOI: 10.1183/13993003.02426-2019.
17. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020; 109 (5): 893–899. DOI: 10.1111/APA.15155.
18. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013; 1 (1): e27112. DOI: 10.4161/rdis.27112.
19. Dekkers J.F., Berkers G., Kruisselbrink E. et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8 (344): 344ra84. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad8278.
20. Boj S.F., Vonk A.M., Statia M. et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: an in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J. Vis. Exp.* 2017; (120): e55159. DOI: 10.3791/55159.
21. Vonk A.M., van Mourik P., Ramalho A.S. et al. Protocol for application, standardization and validation of the forskolin-induced swelling assay in cystic fibrosis human colon organoids. *STAR Protoc.* 2020; 1 (1): 100019. DOI: 10.1016/J.XPRO.2020.100019.
22. CFTR2. The Clinical and Functional Translation of CFTR. Available at: <http://cftr2.org>
23. ECFS. Zolin A., Orenti A., Naehrlich L. et al. ECFS Patient Registry Annual Report 2018. Version 1.4. Available at: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report_2018_v1.4.pdf [Accessed: February 01, 2021].
24. Castellani C., Cuppens H., Macek M. Jr et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7 (3): 179–196. DOI: 10.1016/J.JCF.2008.03.009.
25. Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Каширская Н.Ю., Гольдштейн Д.В. [Intestinal organoids and their application for personalized diagnostics and treatment of cystic fibrosis]. *Медицинская генетика.* 2018; 17 (9): 3–12. DOI: 10.25557/2073-7998.2018.09.3-12 (in Russian).
26. Dekkers J.F., Gogorza Gondra R.A., Kruisselbrink E. et al. Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids. *Eur. Respir. J.* 2016; 48 (2): 451–458. DOI: 10.1183/13993003.01192-2015.
27. van Willigen M., Vonk A.M., Yeoh H.Y. et al. Folding-function relationship of the most common cystic fibrosis-causing CFTR conductance mutants. *Life Sci. Alliance.* 2019; 2 (1): e201800172. DOI: 10.26508/LSA.201800172.
28. Ramalho A.S., Fürstová E., Vonk A.M. et al. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2021; 57 (1): 1902426. DOI: 10.1183/13993003.02426-2019.
29. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020; 109 (5): 893–899. DOI: 10.1111/APA.15155.

Поступила: 04.11.20

Принята к печати: 11.02.21

References

1. Lopes-Pacheco M. CFTR modulators: The changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 1662. DOI: 10.3389/FPHAR.2019.01662.
2. Amelina E.L., Kashirskaya N.Yu., Kondratyeva E.I. et al., eds. [Russian Federation cystic fibrosis patients Registry. 2018 year]. Moscow: Medpraktika-M; 2020. Available at: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/web_block_Registre_2018.pdf (in Russian).
3. Derichs N., Sanz J., Von Kanel T. et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax.* 2010; 65 (7): 594–599. DOI: 10.1136/THX.2009.125088.
4. Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A. et al. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and Non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e73905. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0073905.
5. Melyanovskaya Yu.L., Kondratyeva E.I., Kutsev S.I. [Determination of reference values for the method of intestinal current measurement in the russian federation]. *Meditinskiy vestnik Severnogo Kavkaza.* 2020; 15 (2): 162–165. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039 (in Russian).
6. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013; 1 (1): e27112. DOI: 10.4161/rdis.27112.
7. Dekkers J.F., Berkers G., Kruisselbrink E. et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8 (344): 344ra84. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad8278.
8. Boj S.F., Vonk A.M., Statia M. et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: an in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J. Vis. Exp.* 2017; (120): e55159. DOI: 10.3791/55159.
9. Vonk A.M., van Mourik P., Ramalho A.S. et al. Protocol for application, standardization and validation of the forskolin-induced swelling assay in cystic fibrosis human colon organoids. *STAR Protoc.* 2020; 1 (1): 100019. DOI: 10.1016/J.XPRO.2020.100019.
10. CFTR2. The Clinical and Functional Translation of CFTR. Available at: <http://cftr2.org>
11. ECFS. Zolin A., Orenti A., Naehrlich L. et al. ECFS Patient Registry Annual Report 2018. Version 1.4. Available at: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report_2018_v1.4.pdf [Accessed: February 01, 2021].
12. Castellani C., Cuppens H., Macek M. Jr et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7 (3): 179–196. DOI: 10.1016/J.JCF.2008.03.009.
13. Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Каширская Н.Ю., Гольдштейн Д.В. [Intestinal organoids and their application for personalized diagnostics and treatment of cystic fibrosis]. *Медицинская генетика.* 2018; 17 (9): 3–12. DOI: 10.25557/2073-7998.2018.09.3-12 (in Russian).
14. Dekkers J.F., Gogorza Gondra R.A., Kruisselbrink E. et al. Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids. *Eur. Respir. J.* 2016; 48 (2): 451–458. DOI: 10.1183/13993003.01192-2015.
15. van Willigen M., Vonk A.M., Yeoh H.Y. et al. Folding-function relationship of the most common cystic fibrosis-causing CFTR conductance mutants. *Life Sci. Alliance.* 2019; 2 (1): e201800172. DOI: 10.26508/LSA.201800172.
16. Ramalho A.S., Fürstová E., Vonk A.M. et al. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2021; 57 (1): 1902426. DOI: 10.1183/13993003.02426-2019.
17. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020; 109 (5): 893–899. DOI: 10.1111/APA.15155.

Received: November 04, 2020

Accepted for publication: February 11, 2021

Информация об авторах / Author Information

Амелина Елена Львовна — к. м. н., заведующая лабораторией муковисцидоза Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства, доцент кафедры генетики болезней дыхательной системы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»; тел.: (926) 205-03-91; e-mail: eamelina@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5356-9415>)

Elena L. Amelina, Candidate of Medicine, Head of the Laboratory of Cystic Fibrosis, Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Associate Professor, Department of Genetics of Respiratory System Diseases, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; tel.: (926) 205-03-91; e-mail: eamelina@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5356-9415>)

Ефремова Анна Сергеевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: HYPERLINK «mailto:anna.efremova.83@gmail.com»anna.efremova.83@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>)

Anna S. Efremova, Candidate of Biology, Senior Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: anna.efremova.83@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>)

Мельяновская Юлия Леонидовна — научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: melcat@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>)

Yuliya L. Melyanovskaya, Researcher, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: melcat@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>)

Булатенко Наталья Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: bnv695@gmail.com
Natalya V. Bulatenko, Junior Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: bnv695@gmail.com

Бухарова Татьяна Борисовна — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>)

Tat'yana B. Bukharova, Candidate of Biology, Leading Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>)

Каширская Наталья Юрьевна — д. м. н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»; тел.: (499) 320-60-90; e-mail: kashirskayanj@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0503-6371>)

Nataliya Yu. Kashirskaya, Doctor of Medicine, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Genetic Epidemiology, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; tel.: (499) 320-60-90; e-mail: kashirskayanj@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0503-6371>)

Красовский Станислав Александрович — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории муковисцидоза Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства, старший научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова», врач-пульмонолог отделения муковисцидоза Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени Д.Д.Плетнева Департамента здравоохранения города Москвы»; тел.: (926) 273-76-34; e-mail: sa_krasovsky@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9642-0947>)

Stanislav A. Krasovskiy, Candidate of Medicine, Senior Researcher, Cystic Fibrosis Laboratory, Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Senior Researcher, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics", pulmonologist, Cystic Fibrosis Department, D.D.Pletnev City Teaching Hospital, Moscow Healthcare Department; tel.: (926) 273-76-34; e-mail: sa_krasovsky@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9642-0947>)

Гольдштейн Дмитрий Вадимович — д. б. н., профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: HYPERLINK «mailto:dvgoldrm7@gmail.com»dvgoldrm7@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>)

Dmitriy V. Goldshtein, Doctor of Biology, Professor, Head of the Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: dvgoldrm7@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>)

Участие авторов

Амелина Е.Л. — проведение, анализ и интерпретация клинических испытаний, оформление рисунков, написание и редактирование рукописи
Ефремова А.С. — дизайн экспериментов с культурами органоидов, оценка полученных результатов, оформление рисунков, написание и редактирование рукописи

Мельяновская Ю.Л. — дизайн экспериментов по определению разности кишечных потенциалов, анализ полученных результатов, оформление рисунков, написание и редактирование рукописи

Булатенко Н.В. — проведение экспериментов на кишечных органоидах, количественный анализ результатов

Бухарова Т.Б. — дизайн экспериментов на кишечных органоидах, интерпретация результатов, редактирование рукописи

Каширская Н.Ю. — интерпретация результатов на органоидах и клинической части, написание и редактирование рукописи

Красовский С.А. — проведение клинических испытаний, клинические данные

Гольдштейн Д.В. — руководство на всех этапах выполнения работы, написание рукописи

Authors Contribution

Amelina E.L. — conduct of the clinical trials, their analysis and interpretation, design of the figures, writing and editing the manuscript

Efremova A.S. — design of the experiments with organelle cultures, evaluation of the results, design of the figures, writing and editing of the manuscript

Melyanovskaya Yu.L. — design of the experiments to determine the difference in intestinal potentials, analysis of the results, design of the figures, writing and editing of the manuscript

Bulatenko N.V. — conduct of the experiments on intestinal organelles, quantitative analysis of the results

Bukharova T.B. — design of the experiments on intestinal organelles, interpretation of the results, editing of the manuscript

Kashirskaya N.Yu. — interpretation of the results of the experiments with organelles and the clinical data, writing and editing of the manuscript

Krasovskiy S.A. — conduct of the clinical trials, clinical data collection and management

Goldshtein D.V. — guidance at all stages of the study, writing the manuscript.