

Описание редких аллелей гена *CFTR* при муковисцидозе с помощью функциональных тестов и форсколинового теста на ректальных органоидах

А.С.Ефремова¹, Ю.Л.Мельяновская¹ ✉, Н.В.Булатенко¹, Н.Д.Одинаева³, А.В.Орлов², А.А.Пашкевич², Т.А.Адян^{1,4}, Е.И.Кондратьева^{1,3}

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

² Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Детская городская больница святой Ольги»: 194156, Россия, Санкт-Петербург, ул. Земледельческая, 2

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Детский клинический многопрофильный центр Московской области»: 141009, Россия, Московская область, Мытищи, ул. Коминтерна, 24А, стр. 1

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1

Резюме

Муковисцидоз (МВ) — системное наследственное заболевание, обусловленное мутацией гена *CFTR* и характеризующееся поражением желез внешней секреции, тяжелыми нарушениями функций органов дыхания. Считается, что при «тяжелом» генотипе клинические проявления более выражены и рано манифестируют. При «мягких» генотипах старт клинических проявлений может быть отсрочен. **Материалы и методы.** Проведен анализ историй болезни пациентов ($n = 2$) с МВ без клинических проявлений, наблюдаемых в российских центрах МВ. Для определения разности кишечных потенциалов (ОРКП) и форсколинового теста на кишечных органоидах использовался биопсийный материал прямой кишки. ДНК для секвенирования выделялась из лейкоцитов венозной крови. **Результаты.** При обследовании у 1-й пациентки (девочка 12 лет) установлен генотип F508del/c.1584+18672A>G, у 2-го (мальчик 3 лет) — F508del/G509D-E217G. Диагноз установлен на основании неонатального скрининга. Методом ОРКП выявлена сниженная функция *CFTR*-канала (плотность тока короткого замыкания (ΔISC) на форсколин у 1-й пациентки — $12,33 \pm 2,35$, у 2-го пациента — $25,00 \pm 3,37$ $\mu A / cm^2$, ответ на карбахол и гистамин в отрицательную сторону отражает вход ионов калия в клетки, что характерно для МВ. По данным форсколинового теста на кишечных органоидах показано, что количество функционального белка на апикальной мембране кишечного эпителия увеличивается при действии как потенциатора, так и корректора у обоих пациентов. Наибольший эффект наблюдается при совместном применении потенциатора VX-770 и корректора VX-809. **Заключение.** Функциональный тест ОРКП и форсколиновый тест на кишечных органоидах являются чувствительными методами определения остаточной функциональной активности канала *CFTR* и позволяют уточнить диагноз в сложных случаях. Изученные генетические варианты c.1584+18672A>G и G509D-E217G относятся к мутациям IV–VI класса, клиническая картина соответствует проявлениям «мягких» мутаций. Пациенты продолжают наблюдаться в российских центрах МВ.

Ключевые слова: муковисцидоз, генетические варианты, ген *CFTR*, определение разности кишечных потенциалов, белок *CFTR*, кишечные органоиды, форсколиновый тест, корректор VX-809, потенциатор VX-770.

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 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 профессорам Гольдштейну Д.В., Каширской Н.Ю., Бухаровой Т.Б. за консультирование по применению форсколинового теста на кишечных органоидах.

Для цитирования: Ефремова А.С., Мельяновская Ю.Л., Булатенко Н.В., Одинаева Н.Д., Орлов А.В., Пашкевич А.А., Адян Т.А., Кондратьева Е.И. Описание редких аллелей гена *CFTR* при муковисцидозе с помощью функциональных тестов и форсколинового теста на ректальных органоидах. *Пульмонология*. 2021; 31 (2): 178–188. DOI: 10.18093/0869-0189-2021-31-2-178-188

Description of rare alleles of the *CFTR* gene in cystic fibrosis using functional tests and forskolin-induced swelling assay in rectal organoids

Anna S. Efremova¹, Yuliya L. Melyanovskaya¹ ✉, Natal'ya V. Bulatenko¹, Niso D. Odinaeva³, Aleksandr V. Orlov², Aleksandr A. Pashkevich², Tagui A. Adyan^{1,4}, Elena I. Kondratyeva^{1,3}

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics": ul. Moskvorech'e 1, Moscow, 115478, Russia

² St. Olga's Children's City Hospital, Saint-Petersburg Healthcare Institution: ul. Zemledel'cheskaya 2, Saint-Petersburg, 194156, Russia

³ Moscow Region Children's Clinical Multidisciplinary Center: ul. Komintern 24A, build. 1, Mytishchi, Moscow Region, 1141007, Russia

⁴ N.I.Pirogov Federal Russian National Research Medical University, Healthcare Ministry of Russia: ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997, Russia

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a systemic hereditary disease caused by a mutation of the *CFTR* gene and characterized by damage to the glands of external secretion and severe dysfunctions of the respiratory system. The “severe” genotypes are associated with more pronounced and early clinical manifestations. The “mild” genotypes are associated with a delayed onset of clinical manifestations. **Methods.** An analysis of the medical history of patients with asymptomatic CF from the Russian CF centers was carried out. Rectal biopsy specimens were used for intestinal current measurement (ICM) and forskolin-induced swelling assay in intestinal organoids. DNA for sequencing was isolated from the venous blood leukocytes. **Results.** 2 CF patients with genotypes F508del/c.1584+18672A>G (patient 1, 12 years old) and F508del/G509D-E217G (patient 2, 3 years old) were examined. The diagnosis was based on neonatal screening. The ICM assay showed a reduced function of the CFTR channel: ΔISC for forskolin was $12.33 \pm 2.35 \mu A/cm^2$ in patient 1 and $25 \pm 3.37 \mu A/cm^2$ in patient 2. The negative response to carbachol and histamine reflects the entry of potassium ions into the cells, which is typical for CF. The assay in intestinal organoids showed that the amount of functional protein on the apical membrane of the intestinal epithelium increases both under the action of the potentiator and the corrector in both patients. The greatest effect is observed when the VX-770 and VX-809 are used together. **Conclusion.** The ICM functional assay and the forskolin-induced swelling assay in intestinal organoids are sensitive enough to determine the residual functional activity of the CFTR channel and clarify the diagnosis in difficult cases. The studied genetic variants c.1584+18672A>G and G509D-E217G belong to class IV – VI mutations. The clinical picture corresponds to the manifestations of “mild” mutations. The studied patients still attend the Russian cystic fibrosis centers.

Key words: cystic fibrosis, genetic variants, *CFTR* gene, intestinal current measurement, CFTR protein, intestinal organoids, forskolin-induced swelling assay, VX-809 corrector, VX-770 potentiator.

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

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Center for Medical Genetics” and with the financial support of the Charitable Foundation “Ostrova”.

Acknowledgments. The authors are grateful to Professors Goldstein D.V., Kashirskaya N.Yu. and Bukharova T.B. for advising on the use of the forskolin-induced swelling assay on intestinal organoids.

For citation: Efremova A.S., Melyanovskaya Yu.L., Bulatenko N.V., Odinaeva N.D., Orlov A.V., Pashkevich A.A., Adyan T.A., Kondratyeva E.I. Description of rare alleles of the *CFTR* gene in cystic fibrosis using functional tests and forskolin-induced swelling assay in rectal organoids. *Pul'monologiya*. 2021; 31 (2): 178–188 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2021-31-2-178-188

Муковисцидоз (МВ) — частое моногенное заболевание, обусловленное патогенными вариантами нуклеотидной последовательности (ранее они назывались мутациями) гена *CFTR* (*ABCC7*). Ген *CFTR* содержит 27 экзонов и расположен в регионе 31.1 длинного плеча 7-й хромосомы (7q31.1). Значительные достижения в развитии методов и технологий молекулярно-генетического тестирования позволяют в большинстве случаев успешно осуществлять молекулярно-генетическую диагностику МВ. Наибольшую трудность представляет оценка вклада в развитие заболевания редких и ранее не идентифицированных мутаций, а также определение связи генотип-фенотип и влияния генов-модификаторов на тяжесть заболевания [1].

В настоящее время описано > 2 000 вариантов гена *CFTR*. При этом на веб-сайте (<https://cfr2.org/> обновление от 31.07.20) международного проекта CFTR2 представлено 360 клинически значимых генетических вариантов *CFTR*. В зависимости от влияния на функцию белка CFTR они подразделяются на 7 основных классов — мутации I и VII классов препятствуют синтезу белка CFTR, мутации II класса вызывают нарушение фолдинга белка и снижение его количества, при остальных классах мутаций происходит формирование нефункционального CFTR, нарушается его транспорт к апикальной мембране клетки или снижается проводимость для анионов хлора [2, 3].

Генетические варианты I–III и VII классов приводят к полному или почти полному прекращению функции хлорного канала и относятся к «тяжелым». Генетические варианты IV–VI классов относятся к группе «мягких» в связи с сохранением остаточной активности хлорного канала и экзокринной панкреатической функции. «Мягкие» варианты доминируют над «тяжелыми» в отношении панкреатического фенотипа [2, 3]. При использовании метода секвениро-

вания выявлены новые генетические варианты гена *CFTR* при МВ.

Диагностика наследственных заболеваний, к которым относится и МВ, необходима на самых ранних этапах развития болезни. Заболевание прогрессирует, для многих пациентов прогноз негативный, поэтому диагноз должен быть установлен как можно раньше. Для Российской Федерации с ее этническим и национальным разнообразием ставится задача определения редких вариантов и их клинической значимости.

Метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП), как и форсколиновый тест на стабильных культурах кишечных органоидов, получаемых из ректальных биоптатов пациентов, позволяют оценить остаточную функциональную активность канала CFTR и понять его патогенное значение. Кроме того, форсколиновый тест на культурах органоидов дает возможность определить действие CFTR-модуляторов при любых вариантах гена *CFTR*. Для генетических вариантов c.1584+18672A>G и c.1526G>A ранее такие исследования не проводились.

Целью исследования явилось определение клинической значимости при МВ 2 редких вариантов гена *CFTR* (c.1584+18672A>G и G509D).

Материалы и методы

Обследованы дети ($n = 2$) — девочка 12 лет (2008 года рождения) с диагнозом МВ, преимущественно легочная форма, генотип c.1521_1523del, p.Phe508del (F508del) и c.1585-94124A>G (или c.1584+18672A>G) и мальчик 3 лет (2017 года рождения) с диагнозом МВ, преимущественно легочная форма (E84.0.), генотип p.[F508del];[G509D; E217G] (согласно номенклатуре HGVS) — F508del/G509D; E217G). Диагноз устанавливался согласно клиническим рекомендациям [4]. Дети наблюдались в Санкт-Петербургском государственном

бюджетном учреждении здравоохранения «Детская городская больница святой Ольги» и Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Детский клинический многопрофильный центр Московской области».

Метод определения разницы кишечных потенциалов.

Забор биопсии проводился на оборудовании *Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps* (модель FB-23OU). Исследование по методу ОРКП проводилось согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 [5] по следующему алгоритму. На 1-м этапе проводилась калибровка каждой рециркуляционной камеры в отдельности на приборе VCC MC 8B421 (*Physiologic Instrument*, США). Учитывались физические факторы, такие как наличие воздуха в контактных наконечниках с агаром и сопротивление жидкости, а также факторы окружающей среды — отсутствие вибраций вблизи оборудования, случайные контакты с электродами, отсутствие посторонних работающих приборов в кабинете. На 2-м этапе после калибровки прибора в камеру помещался ректальный биопсийный материал. Забор биоптатов проводился с использованием оборудования *Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps* (модель FB-23OU) согласно инструкции. Размер биоптата составлял 3–5 мм. Биопсийный материал помещался в специальный слайдер, который далее вставлялся в камеру. Камеры заполнялись раствором буфера *Meyler*. Буфер готовился перед исследованием, в него входили 105 мМ NaCl; 4,7 мМ KCl; 1,3 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 20,2 мМ NaHCO_3 ; 0,4 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,3 мМ Na_2HPO_4 ; 1,0 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 мМ HEPES и 10 мМ D-glucose, а также 0,01 мМ индометацина. Регистрация исследования начиналась с записи базального тока короткого замыкания ($\mu\text{A} / \text{cm}^2$) (стадия преамилорид). На 3-м этапе последовательно добавлялись стимуляторы — амилорид (натриевый канал), форсколин / IBMX (хлорный канал), гинестеин (хлорный канал), карбахол (кальциевый канал), ΔIDS (анионный транспорт) и в конце — гистамин (кальциевый канал). Исследование заканчивалось после записи базального тока короткого замыкания. Группу контроля составили здоровые добровольцы. Пациенты с МВ, гомозиготные по F508del, составили группу сравнения (F508del/F508del) [6]. Исследование проводилось на базе научно-клинического отдела муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» (ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П.Бочкова»).

Форсколиновый тест на кишечных органоидах. При получении культур органоидов и выполнении форсколинового теста за основу были взяты протоколы, разработанные под руководством Д.Бекмана [7–10]. Метод получения кишечных органоидов из ректальных биоптатов на базе ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П.Бочкова» подробно описан ранее в работе [11]. Забор биологического материала пациента проводился после подписания добровольного информированного согласия. Из ректальных биоптатов изолировались отдельные крип-

ты, для этого осуществлялась инкубация с раствором 10 мМ ЭДТА (*Thermo Fisher Scientific*, США). Крипты погружались в Матригель (*Corning*, США) и высевались в 24-луночные планшеты. После полимеризации Матригеля добавлялась ростовая среда. Состав среды указан в работах [9, 11]. Пересев органоидов осуществлялся 1 раз в 7 дней путем механического разрушения крупных почкующихся структур на мелкие фрагменты. Для проведения форсколинового теста органоиды высевались в 96-луночные планшеты. Через 24 ч органоиды окрашивались *Calcein AM* (*Biotium*) и осуществлялась стимуляция форсколином в концентрациях 0,8 и 5 мкМ. Обработка продолжалась в течение 60 мин. На определенных временных точках (0, 20, 40 и 60 мин) осуществлялась съемка «фиксированных» полей с использованием флуоресцентного микроскопа *Observer D1* (*Zeiss*, Германия). VX-809 (3 мкМ; *Selleckchem*, США) добавлялась на этапе посева органоидов, а VX-770 (3 мкМ; *Selleckchem*, США) — одновременно с форсколином. Количественный анализ набухания органоидов проводился при помощи программы *Image J*. При построении графика (*Sigma Plot 12.5*) рассчитывалась площадь под кривой зависимости объема органоидов от времени с помощью программы *Microsoft Excel* (2007). Исследование проводилось в лаборатории стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П.Бочкова».

Результаты

Патогенный вариант с.1584+18672A>G представляет собой глубокоинтронную замену аденина на гуанин, является вариантом с неясным клиническим значением, класс неизвестен. В базах CFTR1 и CFTR2 не описаны. В базе *ClinVar* описание данного варианта поверхностное, обнаружена лишь 1 статья [12]. В опубликованном Регистре больных муковисцидозом Российской Федерации (2018) этот генетический вариант отсутствует [13].

Клиническое наблюдение № 1

Обследована девочка 12 лет (2008 года рождения) с диагнозом МВ, преимущественно легочная форма. Генотип F508del/c.1584+18672A>G.

Диагноз установлен в возрасте 8 мес. на основании следующих данных:

- результаты неонатального скрининга (иммунореактивный трипсиноген (ИРТ)-1 — 350 нг / мл; ИРТ-2 — 300 нг / мл).
- результаты потовых проб (проводимость пота на аппарате «Нанодакт» эквивалентна 94, 77, 72, 46, 102 ммоль / л (норма ≤ 50 ммоль / л), пограничные значения — 50–80 ммоль / л, положительная проба ≥ 80 ммоль / л). Заключение: результаты пограничные и положительные.
- генетическое обследование (обнаружена мутация гена *CFTR* F508del в гетерозиготном состоянии при поиске частых мутаций). При секвенировании по Сенгеру, проведенному в РФ, установлен генотип F508del/не обнаружено.

С 10 мес. отмечались обструктивные бронхиты. С 1 года до 8 лет получала базисную терапию МВ (панкреатин, жирорастворимые витамины, муколитическая терапия) и плановые курсы внутривенной антибактериальной терапии 1 раз в год. С 2016 г. перестала получать базисную терапию МВ, отрицательной динамики в течении заболевания не отмечено. При отмене панкреатина купировались тошнота, запоры, ректальный пролапс, улучшился аппетит, повысилась масса тела.

По результатам обследования получены следующие данные:

- панкреатическая эластаза-1 кала — 77–500 мкг в 1 г фекалий (2009–2016), в настоящее время — > 500 мкг в 1 г кала;
- микрофлора дыхательного тракта — за весь период наблюдения отмечался рост метициллинчувствительного *Staphylococcus aureus* (*Methicillin-sensitive S. aureus* — MSSA) и / или нормальная флора;
- рентгенография (РГ) органов грудной клетки (ОГК) (март 2016 г.) — единичные инфильтративные очаги в левом легком;
- компьютерная томография ОГК (ноябрь 2019 г.) — данных за изменения ОГК не получено;
- спирометрия — ФЖЕЛ — 99 %, объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁) — 111 % (2018); форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) — 108 %; ОФВ₁ — 101 % (2019);
- ультразвуковое исследование (УЗИ) брюшной полости (ноябрь 2019 г.) — изменения паренхимы поджелудочной железы;
- магнитно-резонансная томография органов брюшной полости — множественные кальцинаты поджелудочной железы;
- мультиспиральная компьютерная томография органов брюшной полости — картина множественных участков обызвествления поджелудочной железы;
- общие анализы мочи, крови, биохимический анализ крови, копрологический анализ — без патологии.

03.09.18 в Институте биологии и медицинской генетики Карлова университета (Прага, Чехия) в лаборатории профессора *М.Мацека* повторно проведено полное секвенирование гена *CFTR*: p.[Phe508del];[?]. NM_000492.3: c.1210-2963T>A NM_000492.3: c.1585-9412A>G NM_000492.3:

c.1679+329A>G. Сделано заключение о том, что значение вновь выявленных вариантов гена *CFTR* и полиморфных вариантов для диагноза МВ может быть определено только при дальнейшем функциональном или эпидемиологическом исследовании. После обследования родителей сделан вывод, что ребенок является носителем 2 вариантов F508del/c.1584+18672A>G.

При осмотре в возрасте 11 лет 8 мес. масса тела составляла 44 кг, индекс массы тела — 71,4 перцентиль, частота сердечных сокращений — 88 в минуту, частота дыхательных движений — 18 в минуту, изменений со стороны органов и систем не выявлено. Сатурация артериальной крови кислородом — 99 %.

Потовая проба на аппарате «Нанодакт» — 119 ммоль / л, на аппарате «Макродакт» — 96 ммоль / л (положительные результаты). Таким образом, с учетом пограничных и положительных результатов потовых проб (проводимость), нормальный уровень панкреатической эластазы-1, отсутствие клинических проявлений МВ и эпидемиологических данных о мутации c.1584+18672A>G решено провести дополнительные функциональные тесты.

При исследовании методом ОРКП получены следующие результаты:

- плотность тока короткого замыкания (Δ ISC) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $20,33 \pm 4,95 \mu\text{A} / \text{cm}^2$;
- изменение Δ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило $12,33 \pm 2,35 \mu\text{A} / \text{cm}^2$, что соответствовало сниженной функции хлорного канала. В ответ на введение гистамина Δ ISC изменяется в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки, при этом плотность тока составила $7,17 \pm 0,74 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ (табл. 1; рис. 1).

При анализе данных (табл. 1) показано, что у пациентки с вариантом c.1584+18672A>G ответ на амилорид не отличается от такового у лиц с F508del/F508del, но выше, чем в группе контроля. По результатам анализа ответа на форсколин показано, что у пациентки ответ был выше такового при F508del/F508del, но ниже, чем в контрольной группе. Ответ на гистамин у пациента с вариантом c.1584+18672A>G был ниже, чем в других группах (F508del/F508del и группа контроля).

Таблица 1
Показатели плотности тока короткого замыкания при введении стимуляторов у пациента с вариантом геномина c.1584+18672A>G

Table 1
Indicators of short-circuit current density after addition of stimulants in a patient with c.1584+18672A>G genetic variant

Δ ISC, $\mu\text{A} / \text{cm}^2$	Амилорид	Форсколин	Генистеин	Карбахол	DIDS	Гистамин
Биопат:						
• 1	-13,5	14,0	0,5	27,5	0,5	8,0
• 2	-27,5	8,5	0,5	19,0	0,5	6,0
• 3	-20,0	14,5	0,5	13,5	0,5	7,5
$M \pm m$	$-20,33 \pm 4,95$	$12,33 \pm 2,35$	0,5	$20,00 \pm 4,99$	0,5	$7,17 \pm 0,74$
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	$-8,98 \pm 3,42$	$25,78 \pm 4,41$	$2,00 \pm 0,29$	$117,44 \pm 4,32$	$1,80 \pm 0,26$	$101,68 \pm 10,99$

Примечание: Δ ISC (decrease in short circuit current) — снижение плотности тока короткого замыкания; DIDS (4,4'-diisothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid) — 4,4'-дизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота.

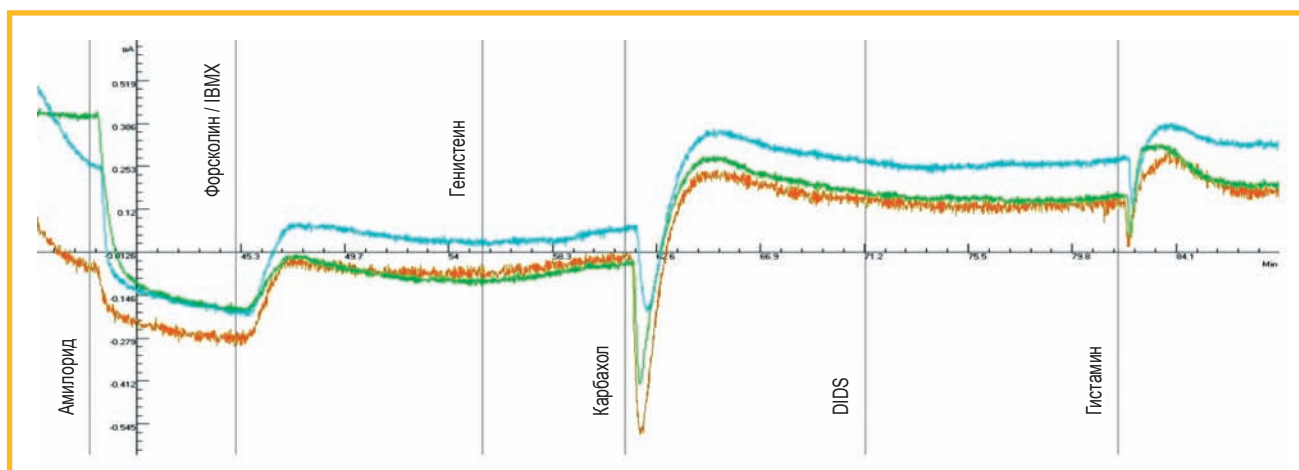


Рис. 1. Метод определения разности кишечных потенциалов у пациента с генотипом F508del/c.1584+18672A>G

Примечание: DIDS (4,4-diisothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid) — 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота; при введении амилорида получен ответ, при добавлении форсколина / IBMX ответ сниженный, а на добавление гистамина и карбахола наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Figure 1. Intestinal current measurement in patient with F508del/c.1584+18672A>G genotype

Note: The test showed a response to amiloride, a reduced response to forskolin/IBMX, and a negative change in the short circuit current with the addition of histamine and carbachol.

Тест свидетельствует о сниженной функции канала CFTR, что подтверждает патогенное значение данной мутации и диагноз МВ.

Заключение: в данном случае можно предположить, что генетический вариант относится к мутациям IV–VI класса. Особенностью этого варианта является поздняя манифестация симптомов заболевания.

Впервые выявленный редкий генетический вариант G509D (c.1526G>A, p.Gly509Asp) приводит к замене глицина на аспарагиновую кислоту в нуклеотидсвязывающем домене NBD1 белка CFTR, однако патогенность данного варианта не установлена. Вариант не описан ни в одной из международных баз данных, в т. ч. Российском регистре пациентов с МВ (2018). Представлено клиническое наблюдение пациента с генетическим вариантом G509D.

Клиническое наблюдение № 2

Мальчик 2017 года рождения с диагнозом МВ, преимущественно легочная форма (E84.0). Генетический диагноз: F508del/G509D-E217G. Микробиологический диагноз: интермиттирующий высев *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Диагноз МВ установлен на основании следующих данных:

- положительный неонатальный скрининг на МВ — ИРТ-1 (взят на 8-й день жизни с нарушением сроков забора) — 55,6 нг / мл (норма — до 70 нг / мл на 5-й день), ИРТ-2 (взят в декретированные сроки) — 43,8 нг / мл (норма — до 40 нг / мл);
- потовая проба (проводимость пота) на аппарате «Нано-дакт» — 83–81–63–65 ммоль / л. Заключение: результаты — пограничные и положительные;
- характерная клиническая картина (кашель с рождения, соленый пот);
- генетическое обследование: F508del/полиморфизм E217G;

- копрология: отсутствие нейтрального жира;
- панкреатическая эластаза-1 — > 500 мкг в 1 г кала

Из анамнеза: раннее развитие — по возрасту, кишечного и респираторного синдромов не отмечено, прибавка массы тела удовлетворительная. Грудное вскармливание — до 4 мес., с 5-го мес. — на искусственном вскармливании. В течение первого года жизни отмечены 3 эпизода острой респираторной инфекции, антибактериальная терапия проводилась однократно. Прибавка массы тела за 1 год — 8 кг, роста — 25 см. Стул регулярный, без патологических признаков. Растет и развивается по возрасту.

При обследовании на 1-м году жизни получены следующие результаты:

- УЗИ брюшной полости — гепатоспленомегалия, диффузные изменения печени;
- РГ ОГК — без патологии;
- панкреатическая эластаза-1 — > 500 мкг / г кала;
- копрология — нейтральный жир отсутствует;
- биохимический анализ крови — аспартатаминотрансфераза — 23 ед. / л, аланинаминотрансфераза — 53 ед. / л, щелочная фосфатаза — 236 ед. / л.

С рождения получал базисную муколитическую терапию — ингаляции дорназа-альфа, кинезитерапию, терапию витаминами Е, D, А, урсодезоксихолевую кислоту.

В возрасте 1 года 3 мес. первый высев *S. maltophilia* составил 10^5 , чувствительность только к фторхинолонам, к остальным препаратам — резистентность. РГ ОГК — без патологии. Проведена эрадикация ципрофлоксацином, в контрольных посевах роста не выявлено.

В возрасте 1,5 года первичный высев *P. aeruginosa* составил 10^4 . Терапия первичного высева *P. aeruginosa* проводилась ингаляционным тобрамицином, 3 курса. В возрасте 2,5 года вновь высев *P. aeruginosa* 10^5 (рост титра в динамике). Проводилась терапия ингаляционным тобрамицином в течение 1 года.

При обследовании в 2,5 года: панкреатическая эластаза-1 кала исследовалась дважды, показатели 500, 375 мкг на 1 г кала (норма > 200 мкг / г). Общий анализ мочи и кро-

ви, биохимический анализ крови — без патологии; при микробиологическом посеве — роста патогенной флоры нет.

При секвенировании гена выявлен генотип F508del/G509D (E217G). Проведена ДНК-диагностика гена *CFTR* у матери и отца. У отца обнаружен комплексный аллель p.[G509D; E217G] в гетерозиготном состоянии, у матери — генетический вариант F508del в гетерозиготном состоянии. Выяснено, что у отца развился острый панкреатит в мае 2020 г., при котором потребовалась госпитализация.

Таким образом, у ребенка выявлен комплексный аллель p.[G509D; E217G], который включает в себя генетический вариант G509D (с.1526G>A, p.Gly509Asp) и полиморфный вариант E217G (с.650A>G, p.Glu217Gly), который по данным литературы рассматривается как генетический вариант неопределенного значения [CFTR-France].

Учитывая наличие у ребенка генетического варианта гена *CFTR* с неустановленным значением, слабоположительного результата ИРТ-2 — 43,8 нг / мл (норма — до 40 нг / мл), положительных или пограничных результатов потовой пробы на аппарате «Нанодакт»

(83–81–63–65–63 ммоль / л), сохранной функции поджелудочной железы по данным уровня панкреатической эластазы (> 200 мкг в 1 г кала), отсутствие кишечного и респираторного синдромов до 3 лет 6 мес. жизни, на фоне раннего инфицирования *S. maltophilia* и *P. aeruginosa* решено провести ОРКП и форсколиновый тест на кишечных органоидах для уточнения нарушений функции CFTR-канала.

При обследовании методом ОРКП показаны следующие результаты:

- плотность тока короткого замыкания (Δ ISC) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $-13,67 \pm 4,56 \mu\text{A} / \text{cm}^2$;
- изменение Δ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило $25,0 \pm 3,37 \mu\text{A} / \text{cm}^2$, что соответствовало сниженной функции хлорного канала. В ответ на введение карбахола Δ ISC изменилась в отрицательную сторону и составила $22,00 \pm 1,97 \mu\text{A} / \text{cm}^2$, в ответ на введение гистамина Δ ISC также изменилась в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки, при этом плотность тока составила $15,67 \pm 2,41 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2
Показатели плотности тока короткого замыкания при введении стимуляторов у пациента с вариантом генотипа G509D

Table 2
Indicators of short-circuit current density after addition of stimulants in a patient with G509D genotype

Δ ISC, $\mu\text{A} / \text{cm}^2$	Амилорид	Форсколин	Генистеин	Карбахол	DIDS	Гистамин
Биоптат:						
• 1	-19	24,5	0	21,5	0	14,5
• 2	-6,5	30	0	25	0	13
• 3	-15,5	20,5	0	19,5	0	19,5
M $\pm$ m	$-13,67 \pm 4,56$	$25,00 \pm 3,37$	0	$22,00 \pm 1,97$	0	$15,67 \pm 2,41$
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	$-8,98 \pm 3,42$	$25,78 \pm 4,41$	$2,00 \pm 0,29$	$117,44 \pm 4,32$	$1,80 \pm 0,26$	$101,68 \pm 10,99$

Примечание: Δ ISC (decrease in short circuit current) — снижение плотности тока короткого замыкания; DIDS (4,4'-diisothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid) — 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота

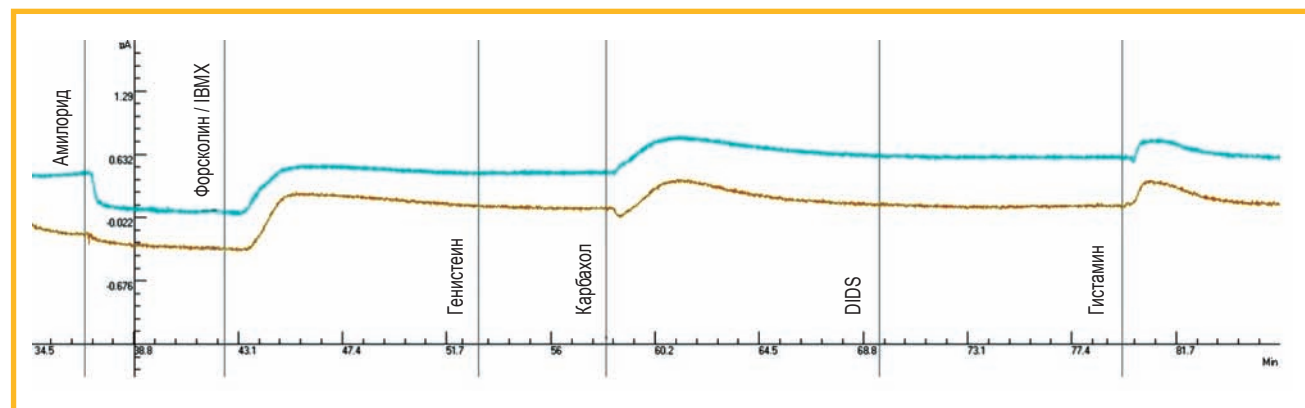


Рис. 2. Метод определения разности кишечных потенциалов. Пациент с генотипом F508del/G509D

Примечание: DIDS (4,4'-diisothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid) — 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота; при введении амилорида получен ответ, при добавлении форсколина / IBMX ответ сниженный, а на добавление гистамина и карбахола наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Figure 2. Intestinal current measurement. Patient with F508del/G509D genotype

Note: The test showed a response to amiloride, a reduced response to forskolin/IBMX, and a negative change in the short circuit current with the addition of histamine and carbachol.

Результаты теста свидетельствуют о сниженной функции канала CFTR и подтверждают патогенное значение данной мутации и диагноз МВ.

При анализе данных (табл. 2) показано, что у пациента с вариантом G509D ответ на амилорид ниже, чем в группе F508del/F508del, но выше, чем в группе контроля. Ответ на форсколин у пациента аналогичен таковому у лиц контрольной группы и выше, чем в группе F508del/F508del, однако при добавлении гистамина ответ у пациента с вариантом G509D ниже, чем в других группах (F508del/F508del и группа контроля) и ответ был в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки как при МВ.

Таким образом, в данном случае можно предположить, что генетический вариант G509D относится к мутациям IV–VI класса, клиническая картина соответствует проявлениям «мягких» мутаций в данном возрасте.

Дополнительно из ректальных биоптатов пациентов с генотипами F508del/c.1584+18672A>G и F508del/G509D получены стабильные культуры кишечных органоидов. Проведено сравнение морфологии этих культур с контрольными культурами от пациента с ге-

нотипом F508del/F508del и здорового добровольца. Органоиды с рабочим каналом CFTR имеют сферическую форму, тонкие стенки и люмен (внутреннюю полость) большого размера по отношению к общему размеру органоида (рис. 3; wt/wt-органойды). Исследуемые культуры органоидов, как и контрольная культура от пациента с МВ с 2 мутациями F508del, характеризовались неправильной формой и меньшим размером внутренней полости по сравнению с образцами от здоровых доноров, данные морфологические признаки указывают на нарушение функциональной активности белка CFTR (см. рис. 3).

При помощи форсколинового теста исследованы остаточная функция канала CFTR и влияние CFTR-модуляторов (корректора VX-809 и потенциатора VX-770) на восстановление функции белка CFTR при генетических вариантах c.1584+18672A>G и G509D. При воздействии форсколина (0,8 и 5 мкМ) обе исследуемые культуры органоидов отвечают набуханием (рис. 4, 5), ответ является концентрационно-зависимым (см. рис. 5). Следует заметить, что мутация F508del, которая находится в компаунде с исследуемыми вариантами, является «тяжелой» и приводит

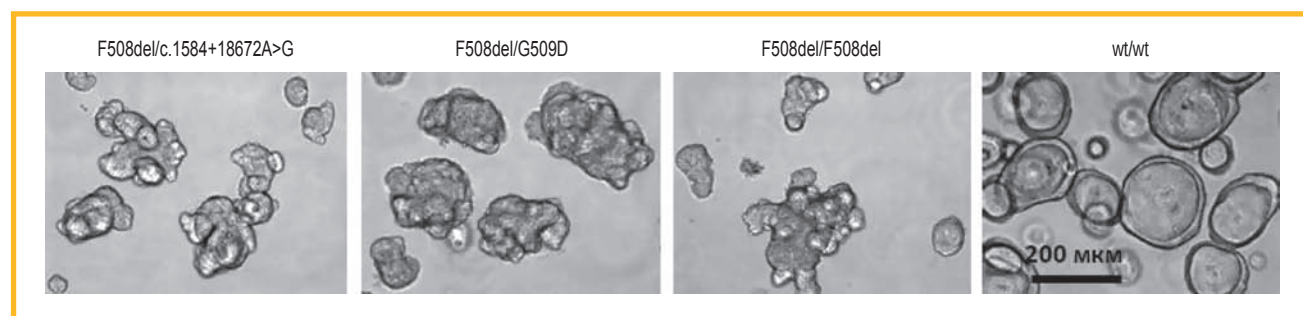


Рис. 3. Морфология культур кишечных органоидов от пациентов с редкими генетическими вариантами c.1584+18672A>G и G509D. Органоиды, полученные от здорового добровольца (wt/wt) и пациента с генотипом F508del/F508del, являются контрольными
Figure 3. Morphology of intestinal organoid cultures from the patients with the rare genetic variants c.1584+18672A>G and G509D. The organoids from a healthy volunteer (wt/wt) and a patient with the F508del/F508del genotype were used as controls

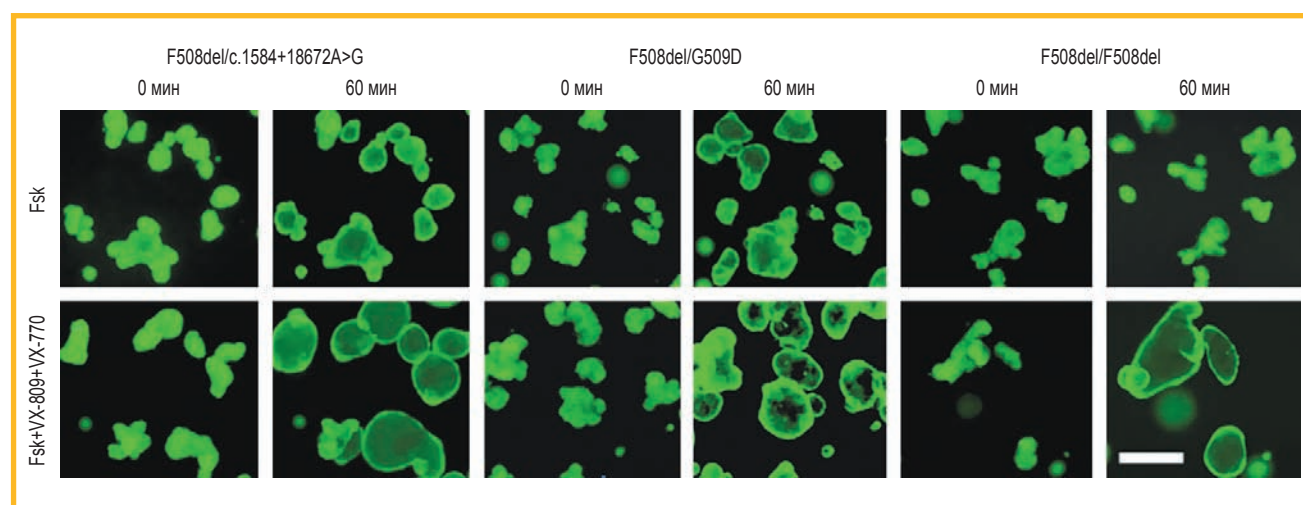


Рис. 4. Характерные изображения кишечных органоидов у пациентов с генотипами F508del/c.1584+18672A>G и F508del/G509D до воздействия форсколина (5 мкМ) и таргетных препаратов (оба – 3 мкМ) и после завершения обработки. Окраска – кальцеином (0,84 мкМ, 1 ч), объектив $\times 5$, масштабная шкала – 200 мкм
Figure 4. Typical images of intestinal organoids from patients with F508del/c.1584+18672A>G and F508del/G509D genetic variants before and after treatment with forskolin (5 μ M) and targeted drugs (both 3 μ M). Staining – Calcein (0.84 μ M, 1 h), objective $\times 5$, scale – 200 μ m

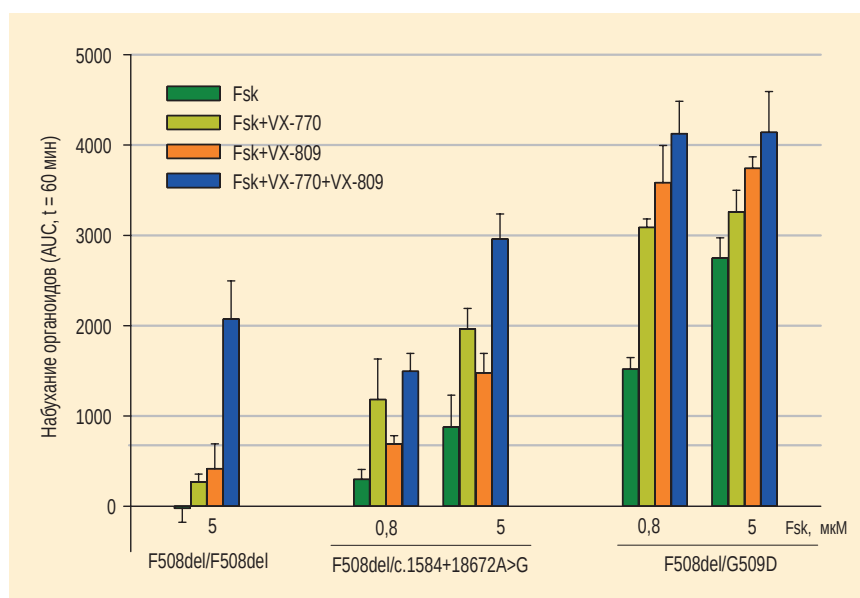


Рис. 5. Результаты количественной оценки набухания органоидов при действии форсколина и CFTR-модуляторов у пациентов с генетическими вариантами с.1584+18672A>G и G509D. Рабочие концентрации — 3 мкМ VX-770 и 3 мкМ VX-809

Примечание: AUC (area under the curve) — площадь под кривой зависимости объема органоидов от времени.

Figure 5. Results of quantitative assessment of organoid swelling upon treatment with forskolin and CFTR modulators for patients with c.1584+18672A>G and G509D genetic variants. The working concentrations were 3 μM for VX-770 and for 3 μM VX-809

Note: AUC — the area under the curve of the dependence of the volume of intestinal organoids on time.

к практически полной утрате рабочего белка CFTR в гомозиготном состоянии [8, 11], F508del/F508del-органойды не отвечают на стимуляцию форсколином (см. рис. 4, 5), поэтому наблюдаемое набухание органоидов обусловлено остаточной активностью CFTR, сохраняемой при вариантах с.1584+18672A>G и G509D. При количественном анализе ответов на стимуляцию форсколином показана более высокая сохраняемая функция CFTR при генетическом варианте G509D (см. рис. 5).

CFTR-модуляторы усиливают форсколин-индуцированное набухание F508del/c.1584+18672A>G и F508del/G509D органоидов. Для генотипа F508del/c.1584+18672A>G больший эффект обнаружен у потенциатора VX-770, а для генотипа F508del/G509D — у корректора VX-809. Максимальное набухание органоидов наблюдается при комбинированном применении таргетных препаратов — в 5 раз по сравнению с действием только Fsk (0,8 мкМ) для генотипа F508del/c.1584+18672A>G и в 2,7 раза — по сравнению с действием только Fsk (0,8 мкМ) для генотипа F508del/G509D.

Обсуждение

МВ является редким жизнеугрожающим наследственным заболеванием, при котором существенно сокращается продолжительность жизни пациентов, в первую очередь — за счет поражения дыхательного тракта [4]. В настоящее время, по данным регистра пациентов с МВ, в России > 75 % пациентов составляют дети, не достигшие возраста 18 лет [13]. Возраст дебюта респираторных симптомов может определяться тяжестью генотипа и значительно различается при адекватной терапии МВ. Проведено обследование детей ($n = 2$) с минимальными клиническими проявлениями заболевания и редкими генетическими вариантами.

По данным клинического наблюдения № 2 продемонстрировано отсутствие респираторных проявлений

у ребенка 12 лет с «мягким» генетическим вариантом гена *CFTR*. Применение метода секвенирования гена *CFTR* привело к выявлению генетического варианта с.1584+18672A>G в интроне, клиническая значимость которого неизвестна. Установленный диагноз МВ дает возможность организовать плановое динамическое наблюдение за пациентом без клинических проявлений для своевременной организации профилактики и терапии проявлений заболевания, в первую очередь, со стороны дыхательного тракта. При применении методов ОРКП и кишечных органоидов диагноз подтвердился, что позволило правильно организовать превентивные мероприятия.

По результатам клинического наблюдения мальчика 3 лет продемонстрировано, что, несмотря на возраст и отсутствие клинических проявлений, отмечена респираторная обсемененность дыхательного тракта патогенной флорой, при которой потребовалась антибактериальная терапия. Представляет интерес выявленный комплексный аллель у ребенка, который оказывает влияние на функцию канала CFTR.

Оба варианта гена *CFTR* (с.1584+18672A>G и G509D) являются патогенными, но при этом сопряжены с сохранением высокой остаточной функциональной активности канала CFTR, особенно вариант G509D, что подтвердилось по результатам ОРКП и форсколинового теста на кишечных органоидах. Также по данным исследования продемонстрирована перспективность обоих методов при определении клинической значимости генетических вариантов гена *CFTR* и оценке функционирования хлорного канала (CFTR-канала) у больных МВ. Метод ОРКП вошел в Национальный консенсус и клинические рекомендации при МВ (2020) [1, 4] для использования в сложных диагностических случаях [6, 14].

По данным исследования с помощью метода кишечных органоидов показано, что количество функционального белка на апикальной мембране кишечного эпителия увеличивается при действии как потенциатора, так и корректора. Наибольший эффект

наблюдается при совместном применении VX-770 и VX-809. Пациентам с генетическими вариантами с.1584+18672A>G и G509D в случае необходимости может быть рекомендована терапия как препаратами, содержащими только потенциатор, особенно у 2-го пациента, так и препаратами, в составе которых сочетаются и потенциатор (VX-770, ивакафтор), и корректор (VX-809, лумакафтор). Существует мнение, что применение CFTR-модуляторов может предотвращать формирование структурных нарушений легких и снижение их функции при МВ. В настоящее время доказано, что при использовании таргетных препаратов улучшается функция легких [15, 16].

Таким образом, для подбора таргетной терапии у больных МВ при редких мутациях продемонстрирована перспективность форсколинового теста на кишечных органоидах.

Заключение

Функциональный тест ОРКП и форсколиновый тест на кишечных органоидах являются чувствительными методами определения остаточной функциональной активности канала CFTR и позволяют уточнять диагноз в сложных случаях. Изученные генетические варианты с.1584+18672A>G и G509D-E217G относятся к мутациям IV–VI класса, клиническая картина соответствует проявлениям «мягких» мутаций. Пациенты продолжают наблюдаться в российских центрах МВ.

Литература

1. Кондратьева Е.И., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., ред. Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия». М.: Боргес; 2018.
2. Marson F.A.L., Bertuzzo C.S., Ribeiro J.D. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir. Med.* 2016; 4 (8): e37–38. DOI: 10.1016/S2213-2600(16)30188-6.
3. 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.
4. Кистозный фиброз (муковисцидоз): клинические рекомендации. 2020. Доступно на: <http://cr.rosminzdrav.ru/schema/372>
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. Dekkers J.F., Berkens 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.
9. 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.
10. 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.
11. Кондратьева Е.И., Мельяновская Ю.Л., Ефремова А.С. и др. Опыт применения методов оценки функциональности анионного канала CFTR у пациентов с установленным и предполагаемым диагнозом муковисцидоза. *Сибирское медицинское обозрение.* 2019; (2): 60–69. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-60-69.
12. Costantino L., Rusconi D., Soldà G. et al. Fine characterization of the recurrent c.1584+18672A>G deep-intronic mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2013; 48 (5): 619–625. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0371OC.
13. 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
14. Кондратьева Е.И., Мельяновская Ю.Л., Петрова Н.В. и др. Клинико-генетическая характеристика больных муковисцидозом и функциональная оценка работы хлорного канала с впервые описанным патогенным вариантом D579Y (с.1735G>T). *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2020; 15 (2): 166–169. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15040.
15. Southern K.W., Patel S., Sinha I.P., Nevitt S.J. Correctors (specific therapies for class II CFTR mutations) for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018; 8 (8): CD010966. DOI: 10.1002/14651858.CD010966.pub2.
16. Stanojevic S., Davis S.D., Retsch-Bogart G. et al. Progression of lung disease in preschool patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017; 195 (9): 1216–1225. DOI: 10.1164/rccm.201610-2158OC.

Поступила: 01.02.21

Принята к печати: 25.02.21

References

1. Kondratyeva E.I., Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I., eds. [National consensus “Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, therapy”]. Moscow: Borges; 2018 (in Russian).
2. Marson F.A.L., Bertuzzo C.S., Ribeiro J.D. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir. Med.* 2016; 4 (8): e37–38. DOI: 10.1016/S2213-2600(16)30188-6.

3. 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.
4. [Cystic fibrosis: clinical guidelines. 2020]. Available at: <http://cr.rosminzdrav.ru/schema/372> (in Russian).
5. 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.
6. Melyanovskaya Yu.L., Kondratyeva E.I., Kutsev S.I. [Determination of reference values for the method of intestinal current measurement in the Russian Federation]. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza.* 2020; 15 (2): 162–165. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039 (in Russian).
7. 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.
8. Dekkers J.F., Berkens 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.
9. 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.
10. 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.
11. Kondratyeva E.I., Melyanovskaya Yu.L., Efremova A.S. et al. [Experience of evaluating functionality of anionic CFTR channel methods application in patients with cystic fibrosis diagnosed and supposed]. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie.* 2019; (2): 60–69. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-60-69 (in Russian).
12. Costantino L., Rusconi D., Soldà G. et al. Fine characterization of the recurrent c.1584+18672A>G deep-intronic mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2013; 48 (5): 619–625. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0371OC.
13. 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).
14. Kondratyeva E.I., Melyanovskaya Yu.L., Petrova N.V. et al. [Clinical and genetic characteristics of cystic fibrosis patients and a functional assessment of the work of the chloride channel with the first described pathogenic variant D579Y (c.1735G>T)]. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza.* 2020; 15 (2): 166–169. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15040 (in Russian).
15. Southern K.W., Patel S., Sinha I.P., Nevitt S.J. Correctors (specific therapies for class II CFTR mutations) for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018; 8 (8): CD010966. DOI: 10.1002/14651858.CD010966.pub2.
16. Stanojevic S., Davis S.D., Retsch-Bogart G. et al. Progression of lung disease in preschool patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017; 195 (9): 1216–1225. DOI: 10.1164/rccm.201610-2158OC.

Received: February 01, 2021

Accepted for publication: February 25, 2021

Информация об авторах / Author Information

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: anna.efremova.83@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>)

Анна С. Ефремова, 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 Вадимовна — 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

Одинаева Нисо Джумаевна — д. м. н., профессор, главный врач Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Детский клинический многопрофильный центр Московской области»; тел.: (499) 237-02-23; e-mail: info@mokdcd.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5214-8072>)

Niso D. Odinaeva, Doctor of Medicine, Professor, Chief Physician, Moscow Region Children's Clinical Multidisciplinary Center; tel.: (499) 237-02-23; e-mail: info@mokdcd.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5214-8072>)

Орлов Александр Владимирович — к. м. н., заведующий 3-м инфекционным отделением Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Детская городская больница святой Ольги»; тел.: (812) 295-69-98; e-mail: orlovcf@yandex.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2069-7111>)

Aleksandr V. Orlov, Candidate of Medicine, Head of the 3rd Infectious Disease Department, St. Olga's Children's City Hospital, Saint-Petersburg Healthcare Institution; tel.: (812) 295-69-98; e-mail: orlovcf@yandex.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2069-7111>)

Пашкевич Александр Анатольевич — врач-пульмонолог, педиатр 3-го инфекционного отделения Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Детская городская больница святой Ольги»; тел.: (812) 295-69-98; e-mail: pulmonology3@hotmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5151-586X>)

Aleksandr A. Pashkevich, pulmonologist, pediatrician, 3rd Infectious Disease Department, St. Olga's Children's City Hospital, Saint-Petersburg Healthcare Institution; tel.: (812) 295-69-98; e-mail: HYPERLINK "mailto:pulmonology3@hotmail.com" pulmonology3@hotmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5151-586X>)

Адян Тагуи Аветиковна — к. м. н., научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова», доцент кафедры общей и медицинской генетики медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

тел.: (499) 324-87-72; e-mail: tagui.adyan@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7714-9538>)

Tagui A. Adyan, Candidate of Medicine, DNA Diagnostics Laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics"; Assistant Professor, Department of General and Medical Genetics, Faculty of Medicine and Biology, N.I.Pirogov Federal Russian National Research Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (499) 324-87-72; e-mail: tagui.adyan@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7714-9538>)

Кондратьева Елена Ивановна — д. м. н., профессор, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр

имени академика Н.П.Бочкова», руководитель центра муковисцидоза Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Детский клинический многопрофильный центр Московской области»; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: elenafpk@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>)

Elena I. Kondratyeva, Doctor of Medicine, Professor, Head of Research and Clinical Division of Cystic Fibrosis, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Center for Medical Genetics", Head of Cystic Fibrosis Center, Moscow Region Children's Clinical Multidisciplinary Center; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: elenafpk@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>)

Участие авторов

Ефремова А.С. — дизайн исследований на кишечных органоидах, интерпретация результатов, подготовка рисунков, написание раздела «Обсуждение» (15 %)

Мельяновская Ю.Л. — проведение теста определения кишечных потенциалов, предоставление материала для теста на органоидах, интерпретация результатов, подготовка рисунков и написание раздела «Обсуждение» (15 %)

Булатенко Н.В. — проведение форсколинового теста на кишечных органоидах, интерпретация результатов, подготовка рисунков, написание раздела «Обсуждение» (15 %)

Одинаева Н.Д. — редактирование текста рукописи, написание раздела «Обсуждение» (8 %)

Орлов А.В. — представление историй болезни, написание раздела «Обсуждение» (7 %)

Пашкевич А.А. — представление историй болезни, обсуждение (10 %)

Адян Т.А. — генетические исследования, обсуждение (15 %)

Кондратьева Е.И. — идея, научное руководство, дизайн, консультирование детей, представление историй болезни, написание текста рукописи, обсуждение, редактирование текста рукописи (15 %)

Authors Contribution

Efremova A.S. — design of studies on intestinal organelles, interpretation of results, preparation of drawings, writing of the "Discussion" section (15%)

Melyanovskaya Yu.L. — conducting a test for determining intestinal potentials, providing material for the test on organelles, interpreting the results, preparing drawings and writing the "Discussion" section (15%)

Bulatenko N.V. — carrying out the forskolin-induced swelling assay on intestinal organelles, interpreting the results, preparing drawings, writing the "Discussion" section (15%)

Odinaeva N.D. — editing the text of the manuscript, writing the "Discussion" section (8%)

Orlov A.V. — presentation of case histories, writing the "Discussion" section (7%)

Pashkevich A.A. — presentation of case histories, discussion (10%)

Adyan T.A. — genetic research, discussion (15%)

Kondratyeva E.I. — idea, scientific leadership, design, counseling children, presentation of case histories, writing the text of the manuscript, discussion, editing the text of the manuscript (15%)