

Описание клинической картины и оценка функциональной активности канала CFTR у пациента с комплексным аллелем [S466X; R1070Q]

М.Г.Краснова¹ ✉, Ю.Л.Мельяновская¹, С.А.Красовский^{1,2,3}, Н.В.Булатенко¹, А.С.Ефремова¹, Т.Б.Бухарова¹, Д.В.Гольдштейн¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: 115522, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1

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

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

Резюме

Наличие патогенных вариантов в гене *CFTR* вызывает муковисцидоз (МВ) посредством различных молекулярных механизмов, оказывающих влияние на образование и функциональную активность хлорного канала CFTR. Важным фактором, влияющим на фенотипические проявления МВ и эффективность таргетной терапии, является наличие комплексных аллелей — ≥ 2 последовательных мутаций на 1-м аллеле, или в цис-положении. Влияние комплексных аллелей на проявления МВ в мире изучено недостаточно из-за небольшого количества проведенных исследований. **Целью** исследования явилось изучение влияния комплексного аллеля [S466X; R1070Q] на фенотипические проявления МВ и эффективность таргетной терапии на модели кишечных органоидов у пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTR^{dele2,3}. **Материалы и методы.** Использовались данные истории болезни пациента, метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП), метод кишечных органоидов, форсколиновый тест. **Результаты.** Установлен прогрессирующий характер заболевания с явной деградацией легочной функции. При использовании метода ОРКП показано отсутствие функции хлорного канала. Проведенные на полученной из ткани кишечника культуре органоидов тесты свидетельствуют о полной утрате функции хлорного канала. Кроме того, комплексный аллель [S466X; R1070Q] оказался нечувствительным ко всем протестированным таргетным препаратам. **Заключение.** Установлено, что комплексный аллель [S466X; R1070Q] вызывает полную утрату функционального белка CFTR и нечувствителен к действию ни одного из зарегистрированных таргетных препаратов.

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

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-15-00473 «Исследование влияния комплексных аллелей гена *CFTR* на функциональную активность хлорного канала для персонализированного подбора таргетной терапии при муковисцидозе».

Этическая экспертиза. Для проведения исследования получено разрешение, пациентами подписано добровольное информированное согласие. Исследование и форма информированного согласия одобрены Комитетом по этике Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.10.18 (председатель Этического комитета — профессор Л.Ф.Курило).

Благодарность. Авторы благодарны профессору Е.И.Кондратьевой за консультативную помощь в подготовке статьи.

© Краснова М.Г. и соавт., 2023

Для цитирования: Краснова М.Г., Мельяновская Ю.Л., Красовский С.А., Булатенко Н.В., Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В. Описание клинической картины и оценка функциональной активности канала CFTR у пациента с комплексным аллелем [S466X; R1070Q]. *Пульмонология*. 2023; 33 (2): 233–242. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-233-242

Description of the clinical picture and assessment of functional activity of the CFTR channel in a patient with a complex allele [S466X; R1070Q]

Maria G. Krasnova¹ ✉, Yulia L. Melianovskaya¹, Stanislav A. Krasovskiy^{1,2,3}, Nataliya V. Bulatenko¹, Anna S. Efremova¹, Tatiana B. Bukharova¹, Dmitry V. Goldshtein¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation: ul. Moskvorechye 1, Moscow, 115522, Russia

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

³ State Budgetary Healthcare Institution “City Clinical Hospital named after D.D.Pletnev, Moscow City Health Department”: ul. Odinnadtsataya Parkovaya 32, Moscow, 105077, Russia

Abstract

The presence of pathogenic variants in the *CFTR* gene causes cystic fibrosis (CF) through various molecular mechanisms that affect the formation and functional activity of the CFTR chloride channel. An important factor affecting the phenotypic manifestations of CF and the effectiveness of targeted therapy is the presence of complex alleles with ≥ 2 consecutive mutations per 1 allele, or in the cis position. The influence of complex alleles on the manifestations of CF has not been sufficiently studied globally due to the small number of studies. **The aim** of the study was to investigate the influence of the complex allele [S466X; R1070Q] on the phenotypic manifestations of CF and the effectiveness of targeted therapy in a model of intestinal organoids from a patient with [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 genotype. **Methods.** We used medical history data, intestinal current measurement, intestinal organoid method, and forskolin test. **Results.** The progressive nature of the disease with a clear degradation of lung function was established. The ICM method showed absent chloride channel function. The tests on the culture of organoids obtained from the intestinal tissue indicated a complete loss of the chloride channel function. In addition, the complex allele [S466X; R1070Q] was insensitive to all targeted drugs tested. **Conclusion.** The complex allele [S466X; R1070Q] causes a complete loss of the functional CFTR protein and is not sensitive to any of the approved targeted drugs.

Key words: CFTR, cystic fibrosis, complex allele, intestinal current measurement, intestinal organoids, forskolin-induced swelling assay, targeted therapy.

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

Funding. This research was funded by the grant of the Russian Science Foundation No.22-15-00473 “Study of the effect of complex alleles of the CFTR gene on the functional activity of the chloride channel for personalized selection of targeted therapy in cystic fibrosis”.

Ethical review. Permission was obtained for the study. The patients signed voluntary informed consent. The study and the informed consent form were approved by the Ethics Committee, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation 10.15.18 (Professor *L.F.Kurilo* is the Chairman of the Ethics Committee).

Acknowledgements. The authors are grateful to Professor *E.I.Kondratyeva* for advice in preparing the article.

© Krasnova M.G. et al., 2023

For citation: Krasnova M.G., Melianovskaya Yu.L., Krasovskiy S.A., Bulatenko N.V., Efremova A.S., Bukharova T.B., Goldshtein D.V. Description of the clinical picture and assessment of the functional activity of the CFTR channel in a patient with a complex allele [S466X; R1070Q]. *Pul'monologiya*. 2023; 33 (2): 233–242 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-233-242

Муковисцидоз (МВ) — аутосомно-рецессивное мультисистемное заболевание, вызываемое патогенными вариантами в гене *CFTR* (муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости), кодирующем одноименный хлорно-бикарбонатный канал [1].

МВ имеет обширную фенотипическую гетерогенность, отражающую большое количество идентифицированных вариантов в гене *CFTR* — 401 из 485 описанных вариантов на данный момент является патогенным [2]. МВ характеризуется следующими клиническими проявлениями:

- панкреатическая недостаточность;
- изменение уровня хлоридов пота;
- нарушение функции печени;
- чрезмерное образование вязкой слизи и наличие плохого мукоцилиарного клиренса, которые связаны с нарушением функционирования канала CFTR, вызывают обструктивную болезнь легких и хронические бактериальные инфекции (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*) [3, 4].

Патогенные мутации в гене *CFTR* условно подразделяются на классы I–VII в соответствии с дефектами, влияющими на процесс синтеза белка, его стабильность и функционирование в качестве ионного канала. Некоторые мутации могут иметь комбинированный эффект, их можно отнести к нескольким классам [5].

Тяжесть клинического проявления МВ может быть обусловлена не только классом мутаций и наличием генов-модификаторов, но также комплексными аллелями [6]. Комплексные аллели представляют собой комбинацию ≥ 2 вариантов нуклеотидной последовательности в цис-положении, т. е. на одном и том же аллеле. Несколько генетических вариантов в составе комплексного аллеля могут влиять на отдельные этапы биогенеза CFTR, при этом установление диагноза

и подбор таргетной терапии усложняются [7]. При все возрастающем числе программ скрининга новорожденных (NBS) и использовании секвенирования гена *CFTR* обнаруживаются редкие варианты и комплексные аллели гена *CFTR* [8].

В данной работе изучена функциональная активность канала CFTR и ее взаимосвязь с клинической картиной у пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3.

Вариант CFTRdele2,3 (аллельная частота — 6,15 %) занимает 2-е место по распространенности в Российской Федерации (РФ), является патогенным, относится к I классу мутаций и имеет «тяжелый» фенотип [9]. Варианты S466X (аллельная частота — 0,16 %) и R1070Q (аллельная частота — 0,1 %) занимают 16-е и 41-е места соответственно [9]. В случае варианта S466X в 1 397-м положении гена происходит однонуклеотидная замена, приводящая к возникновению преждевременного стоп-кодона вместо кодона TCA, кодирующего серин. В литературе описаны 2 замены, приводящие к возникновению стоп-кодона на месте TCA, — цитозин заменяется либо на аденин (триплет TAA), либо на гуанин (триплет TGA), в связи с чем мутации обозначаются как S466X(TAA) и S466X(TGA) соответственно. В РФ выявлен только вариант S466X(TGA) (с.1397C>G; р.Ser466X) [10]. Вариант R1070Q приводит к замене аргинина на глутаминовую кислоту в 1 070-м положении белка CFTR. В базе CFTR2 (<https://cfr2.org/>) описаны 2 мутации, находящиеся в этом кодоне, — R1070W и R1070Q. В литературе также описан вариант R1070P [11]. У российских пациентов с МВ варианты S466X и R1070Q чаще всего сцеплены, в этом случае частота комплексного аллеля [S466X; R1070Q] (с.[1397C>G; 3209G>A], р.(Ser466*; Arg1070Gln)) составляет 0,59 %, он занимает 14-е место по распространенности в РФ. Комплексный ал-

лель [S466X; R1070Q] изучен недостаточно, в частности, он до сих пор не отнесен ни к одному из классов мутаций и тяжесть фенотипического проявления для него не установлена [9]. По данным некоторых исследований показано, что наличие такого комплексного аллеля утяжеляет фенотипические проявления, в отличие от носительства только варианта R1070Q [12].

Благодаря недавним достижениям в разработке лекарственных препаратов пациентам с МВ предлагается персонализированная терапия в зависимости от генотипа с помощью малых молекул (CFTR-модуляторов), влияющих на отдельные этапы синтеза и созревания белка CFTR [13]. Цис-варианты могут изменять ответ на действие CFTR-модуляторов, поэтому для подбора оптимального лечения необходимо учитывать наличие комплексных аллелей у пациентов с МВ [14]. Ранее *Е.И. Кондратьевой и соавт.* описан клинический случай МВ у пациента с установленным генетическим диагнозом F508del/F508del. После дообследования в связи с отсутствием ответа на таргетную терапию (ивакафтор + тезакафтор) у пациента обнаружен комплексный аллель [L467F; F508del] [15].

Для оценки функции хлорного канала CFTR *in vitro* в лаборатории *J. Beekman* разработан метод кишечных органоидов, позволяющий персонализировано изучить остаточную функциональную активность канала CFTR и определить влияние таргетных препаратов на восстановление функции белка CFTR. Полученные результаты могут стать основанием для назначения таргетной терапии пациентам с МВ [16].

Целью данной работы являлась оценка влияния комплексного аллеля [S466X; R1070Q] на фенотипические проявления МВ и эффективность таргетной терапии на модели кишечных органоидов у пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3.

Материалы и методы

Обследован мужчина 2001 года рождения с диагнозом МВ, генотип [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3.

Забор биологического материала пациента проводился после подписания информированного добровольного согласия. Забор биопсии выполнялся при использовании оборудования *Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-23OU)*. Исследование методом определения разности кишечных потенциалов (ОРКП) проводилось согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 [17] по следующему алгоритму:

- на 1-м этапе проводилась калибровка каждой рециркуляционной камеры в отдельности на приборе VCC MC 8B421 *Physiologic Instrument (San Diego, США)*. Учитывались физические факторы, такие как наличие воздуха в контактных наконечниках с агаром, сопротивление жидкости, а также факторы окружающей среды — отсутствие вибраций вблизи оборудования и посторонних работающих приборов в кабинете, случайные контакты с электродами;
- на 2-м этапе после калибровки прибора в камеру помещался ректальный биопсийный материал. Размер биоптата составлял 3–5 мм. Биопсийный

материал помещался в специальный слайдер, который далее вставлялся в камеру. Камеры заполнялись раствором буфера *Meyley*. Буфер готовился перед исследованием, в него входили 105 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl₂·6H₂O, 20,2 мМ NaHCO₃, 0,4 мМ NaH₂PO₄·H₂O, 0,3 мМ Na₂HPO₄, 1,0 мМ MgCl₂·6H₂O, 10 мМ HEPES и 10 мМ D-glucose, а также 0,01 мМ индометацин. Регистрация исследования начиналась с записи базального тока короткого замыкания (мА / см²) (стадия преамилорид);

- на 3-м этапе последовательно добавлялись стимуляторы — амилорид (натриевый канал), форсколин / IBMX (хлорный канал), гинестеин (хлорный канал), карбахол (кальциевый канал), DIDS (анионный транспорт), в конце — гистамин (кальциевый канал).

Исследование завершалось после записи базального тока короткого замыкания. Группу контроля составили здоровые добровольцы ($n = 18$). Пациенты с МВ, гомозиготные по F508del ($n = 5$), составили группу сравнения (F508del/F508del) [18].

Исследование проводилось сотрудниками научно-клинического отдела МВ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П.Бочкова» Минобрнауки России) (заведующая — профессор *Е.И. Кондратьева*)

При получении культур кишечных органоидов и выполнении форсколинового теста за основу были взяты протоколы, разработанные под руководством *Д.Бекмана* [19–21]. Метод получения кишечных органоидов из ректальных биоптатов в ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П.Бочкова» Минобрнауки России подробно описан в работе *Е.И. Кондратьевой и соавт.* [22]. Из ректальных биоптатов изолировались отдельные крипты, для этого осуществлялась инкубация с раствором 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (*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 [20, 22].

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)*, затем осуществлялась стимуляция форсколином в концентрациях 0,128 и 5 мкМ. Обработка продолжалась в течение 60 мин. На определенных временных точках (0, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин) осуществлялась съемка «фиксированных» полей с использованием флуоресцентного микроскопа *Axio Observer. D1 (Carl Zeiss, Германия)*. Корректоры VX-809, VX-661 и VX-445 (*Selleckchem*, США) добавлялись (3,5 мкМ) на этапе посева органоидов, а потенциатор VX-770 (*Selleckchem*, США) 3,5 мкМ — одновременно с форсколином. Количес-

венный анализ набухания органоидов проводился при помощи программы *Image J*. При построении графика (*Sigma Plot 12.5*) рассчитывалась площадь под кривой (*Area Under the Curve – AUC*) зависимости объема органоидов от времени с помощью программы *Microsoft Excel* (2019).

Для оценки функциональной активности CFTR-канала методом кишечных органоидов выделены 2 контрольные группы: органоиды, полученные от пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/F508del (контроль 1), и пациента с генотипом F508del/F508del (контроль 2) [18].

Для проведения исследования получено разрешение пациента. Исследование и форма информированного согласия одобрены Этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П.Бочкова» Минобрнауки России 15.10.18 (председатель – профессор Л.Ф.Курило).

Результаты

Пациент К. 03.09.01 года рождения с 2020 г. наблюдается специалистами Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России) и Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени Д.Д.Плетнева Департамента здравоохранения города Москвы».

Из анамнеза известно, что пациент рожден от 8-й беременности, 4-х срочных самопроизвольных родов. Закричал сразу, масса при рождении – 3 260 г, длина тела – 53 см, оценка по шкале Апгар – 7–8 баллов. К груди приложен в 1-е сутки, выписан на 5-е сутки; в роддоме привит противотуберкулезной бациллой Кальмета–Герена (*Bacillus Calmette–Guérin* – БЦЖ).

Болен с рождения. После выписки из роддома беспокоил желтый зловонный пенистый стул. Масса тела в возрасте 1 года составляла 11 кг. С 1,5 мес. почти ежемесячно отмечались острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), частые бронхиты. В период между ОРВИ сохранялся постоянный малопродуктивный кашель (больше по утрам). С 1-го года жизни отмечается примесь жира в стуле. С 2007 г. беспокоит рецидивирующая крапивница. Обследовался в отделении гастроэнтерологии в июле 2007 г. по поводу изменений в печени по данным ультразвукового исследования (УЗИ), там же впервые был заподозрен МВ. Диагноз МВ установлен в августе 2007 г. в профильном центре по месту жительства на основании клинической картины и данных положительной пробы (хлориды пота (Нанодакт) – 156–176 мм / л).

С момента установления диагноза МВ наблюдался по месту жительства в Самарской области, проводилась базисная терапия бронхолитическими препаратами, ингаляционное отхаркивающее лечение, включая дорназу альфа и 7%-ный раствор натрия хлорида, прием панкреатических ферментов внутрь, назначались ингаляционные антибактериальные препараты.

При сопутствующих УЗИ-изменениях со стороны печени назначались препараты урсодезоксихолевой кислоты. Особенностью течения болезни явилось развитие аллергического риноконъюнктивита и хронического полипозного ринисинусита, в связи с этим пациент курсами получал лечение топическими глюкокортикостероидами.

С 2010 г. у пациента отмечен высев из респираторного тракта микроорганизмов *Burkholderia cepacia complex* с последующей хронизацией инфекции. Ежегодные госпитализации в стационар с проведением курсов внутривенной антибактериальной терапии, частое применение антибактериальных препаратов внутрь, тщательное проведение базисной и кинезитерапии позволили установить контроль над бронхолегочным процессом, деградации легочной функции не отмечено.

По достижении 18-летнего возраста отмечено ухудшение состояния: нарастание картины бронхита, учащение обострений бронхолегочного процесса, появление более длительных температурных реакций, при которых потребовались усиление и ротация ингаляционных антибактериальных препаратов, оптимизация продолжительности и «агрессивности» курсов внутривенной антибактериальной терапии.

При осмотре 16.09.20 в ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России: пациент нормостенического телосложения, индекс массы тела – 20 кг / м². Кожные покровы чистые. Частота дыхательных движений – 17 в минуту, над легкими дыхание жесткое, проводится во все отделы, единичные сухие хрипы при форсированном выдохе, периферическая сатурация кислородом – 98 %. Тоны сердца ясные, ритмичные. Частота сердечных сокращений – 80 в минуту, артериальное давление – 115 / 65 мм рт. ст. Живот мягкий, безболезненный, печень выступает из-под края реберной дуги на 2 см. Отеков нет.

Спирометрия (16.09.20): форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) – 5,29 л (96 %_{долж.}), объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁) – 3,89 л (84 %_{долж.}), ОФВ₁ / ФЖЕЛ – 74 %, пиковая скорость выдоха (ПСВ) – 9,87 л / с (96 %_{долж.}).

При осмотре 11.08.22 в ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России: физикальный статус без существенных изменений.

Спирометрия (11.08.22): ФЖЕЛ – 5,33 л (90 %_{долж.}), ОФВ₁ – 3,58 л (73 %_{долж.}), ОФВ₁ / ФЖЕЛ – 67,2 %, ПСВ – 8,22 л / с (79 %_{долж.}).

В ходе обследования выявлены варианты генотипа CFTR *dels3 и S466X; R1070Q* в гетерозиготных состояниях.

Учитывая прогрессирующий характер заболевания, наметившуюся деградацию легочной функции (снижение ОФВ₁ с 84 до 73 %_{долж.} в 2020 и 2022 гг. соответственно), нарастание частоты обострений бронхолегочного процесса на фоне инфицирования одним из самых неблагоприятных патогенов при МВ – *B. cepacia complex* принято решение рассмотреть возможность таргетной терапии.

Чтобы подобрать пациенту эффективную таргетную терапию, назначено проведение форсколинового теста на кишечных органоидах.

Для оценки функциональной активности CFTR-канала у пациента выполнено исследование методом ОРКП. Получены следующие результаты (см. таблицу, рис. 1):

- плотность тока короткого замыкания (Δ ISC) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $-7,50 \pm 0,94$ мА / см²;
- изменение Δ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило $4,00 \pm 0,35$ мА / см², т. е. функция хлорного канала полностью отсутствует;
- в ответ на введение гистамина Δ ISC изменяется в отрицательную сторону, что отражает приток ионов калия в клетки, при этом плотность тока составила $8,50 \pm 1,06$ мА / см².

При помощи метода кишечных органоидов, полученных их кишечных биоптатов, у пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 оценена эффективность целевых препаратов. В качестве контроля 1 использовалась культура кишечных органоидов, полученная от пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/

F508del, в качестве контроля 2 – культура органоидов с генотипом F508del/F508del. Обе контрольные культуры содержат генетический вариант F508del, чувствительный к действию комбинации потенциатора ивакафтора (VX-770) и корректоров тезакафтора (VX-661) и элексакафтора (VX-445).

Для определения функциональной активности CFTR-канала анализируется ответ органоидов на стимуляцию форсколином (форсколин-индуцированное набухание). При наличии в генотипе «тяжелых» мутаций, к которым относятся, например, CFTRdele2,3 и F508del, органоиды обрабатываются форсколином в высокой концентрации 5 мкМ в течение 1 ч. В таком режиме обработки форсколином (концентрация 5 мкМ, 1 ч) обе культуры с комплексным аллелем [S466X; R1070Q] не ответили на стимуляцию форсколином (рис. 2, 3). Таким образом, показано, что генотипы, сочетающие комплексный аллель [S466X; R1070Q] с вариантом I или II класса, характеризуются отсутствием остаточной функциональной активности канала CFTR, при этом значительной разницы в по-

Таблица
Показатели плотности тока короткого замыкания (Δ ISC) при введении стимуляторов у пациента с вариантом генотипа S466X-R1070Q

Table
Short circuit current density (Δ ISC) associated with various stimulants in a patient carrying the S466X-R1070Q variant

Δ ISC, мА / см ²	Амилорид (натриевый канал)	Форсколин (CFTR-канал)	Генистеин (NBD)	DIDS (не-CFTR-хлорные каналы)	Гистамин (кальциевый канал)
Биоптат № 1	8,5	4,5	0	0	7
Биоптат № 2	6	3,5	0	0	8,5
Биоптат № 3	8	4	0	0	10
$M \pm m$	$7,50 \pm 0,94$	$4,00 \pm 0,35$	0	0	$8,50 \pm 1,06$
F508del/F508del	$18,39 \pm 5,62$	$3,06 \pm 0,89$	$1,83 \pm 0,35$	$1,83 \pm 0,35$	$21,50 \pm 5,46$
1 класс/1 класс	$8,67 \pm 2,09$	$0,25 \pm 0,12$	0,5	0,5	$3,25 \pm 0,31$
Здоровые пациенты	$8,98 \pm 3,42$	$25,78 \pm 4,41$	$2,00 \pm 0,29$	$1,80 \pm 0,26$	$101,68 \pm 10,99$

Примечание: NBD – нуклеотид-связывающий домен.

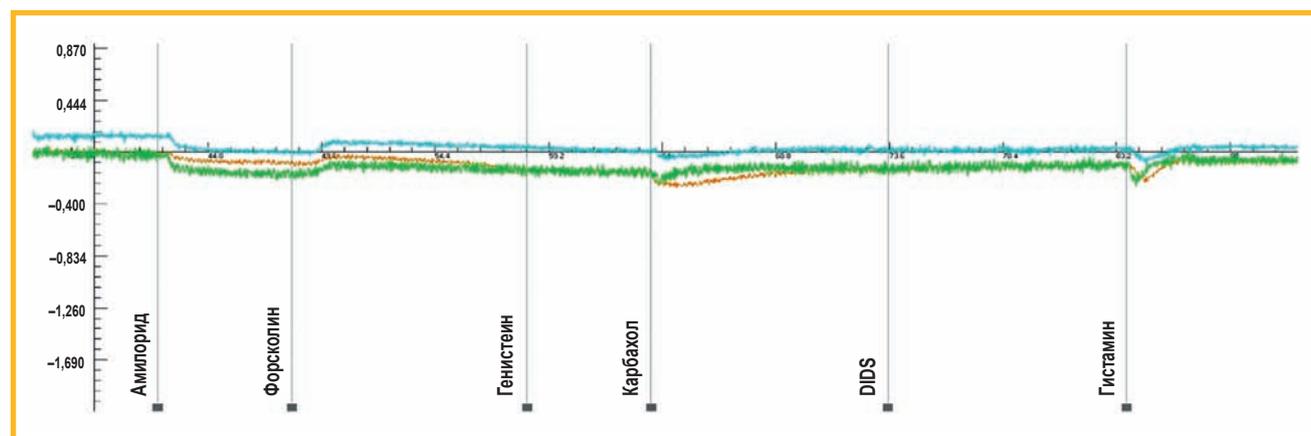


Рис. 1. Пациент с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3. Графическое изображение результатов определения разницы кишечных потенциалов. Результаты 3 камер

Примечание: при введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания (Δ ISC), ответа на форсколин / IBMX нет, а на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Figure 1. Patient with [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 genotype. Graphical representation of the intestinal current measurements from 3 cameras
Note: Addition of amiloride led to a decrease in the short circuit current (Δ ISC). There was no response to forskolin/IBMX. A change in the short circuit current in the negative direction was observed with the addition of carbachol and histamine.

казателей AUC между культурой, полученной от пациента, и контролем 1, не наблюдалось.

При воздействии форсколина и ивакафтора (VX-770) не наблюдается увеличения объема кишечных органоидов, имеющих комплексный аллель [S466X; R1070Q] (пациент и контроль 1) в генотипе, в отличие от F508del/F508del контрольной культуры 2, размер которой увеличился в 1,4 раза. При воздействии форсколина и лумакафтора (VX-809) у органоидов с комплексным аллелем не наблюдается ответа, в то время как в контроле 2 органоиды увеличиваются в 2,5 раза ($41,1 \pm 17,5$ и $105,7 \pm 26,9$ % без VX-809 и с VX-809 соответственно).

Похожие ответы наблюдаются при воздействии всех CFTR-модуляторов – среднее значение AUC кишечных органоидов с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 после воздействия CFTR-модуляторов и форсколина составляет $43,8 \pm 2,4$, независимо от наличия или отсутствия потенциатора и корректоров (см. рис. 2, 3), в то время как контрольная культура [S466X; R1070Q]/F508del демонстрирует ответы. Так, при воздействии на кишечные органоиды [S466X; R1070Q]/F508del комбинированным препаратом лумакафтор + ивакафтор (VX-770 + VX-809, Оркамби™) их размер по сравнению с начальным увеличивается в 17,2 раза ($794,8 \pm 142,3$); при воздействии комбина-

ции тезакафтор + ивакафтор (VX-661 + VX770, Симдеко™) – в 11,3 раза ($523,8 \pm 125,5$); при воздействии комбинации элексакафтор + тезакафтор + ивакафтор (VX-445 + VX-661 + VX-770, Трикафта™) – в 72,8 раза ($3371,4 \pm 398,3$) (см. рис. 2).

Обсуждение

Способность нуклеотидных вариантов, располагающихся на одном аллеле гена CFTR (в цис-положении), влиять на фенотипические проявления заболевания, впервые обнаружена в 1991 г. [23]. На сегодняшний день изучение влияния комплексных аллелей на функциональную активность канала CFTR и фенотипические проявления МВ является активно развивающимся направлением.

Получены данные, свидетельствующие о том, что комплексный аллель [S466X(TGA); R1070Q] проявляет свойства мутаций I класса и определяет высокие показатели хлоридов пота, склонность к тяжелым граммотрицательным инфекциям (*B. cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia*) и снижению продолжительности жизни больных, а при отсутствии «мягкой» мутации в транс-положении – панкреатическую недостаточность [10]. Еще один пример: при цис-варианте L467F в сочетании с F508del значительно снижается

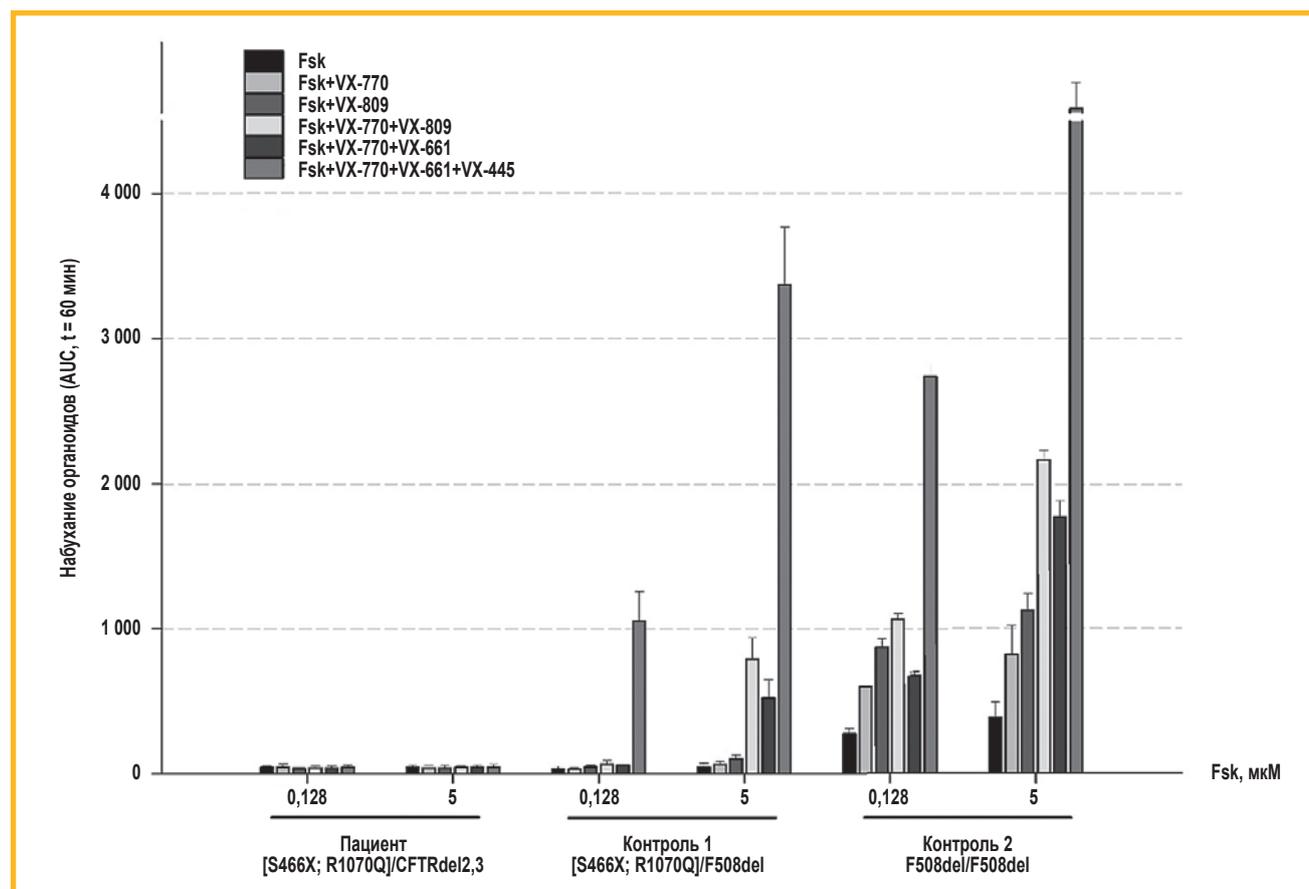


Рис. 2. Оценка остаточной функции CFTR-канала и действия CFTR-модуляторов на культурах кишечных органоидов с комплексным аллелем [S466X; R1070Q]. По оси Y указано абсолютное значение AUC после обработки органоидов форсколином
Примечание: AUC (Area Under the Curve) – площадь под кривой.

Figure 2. Evaluation of the residual function of the CFTR channel and the impact of CFTR modulators on cultures of intestinal organoids with a complex allele [S466X; R1070Q]. The Y-axis indicates the absolute value of AUC after treatment of organoids with forskolin

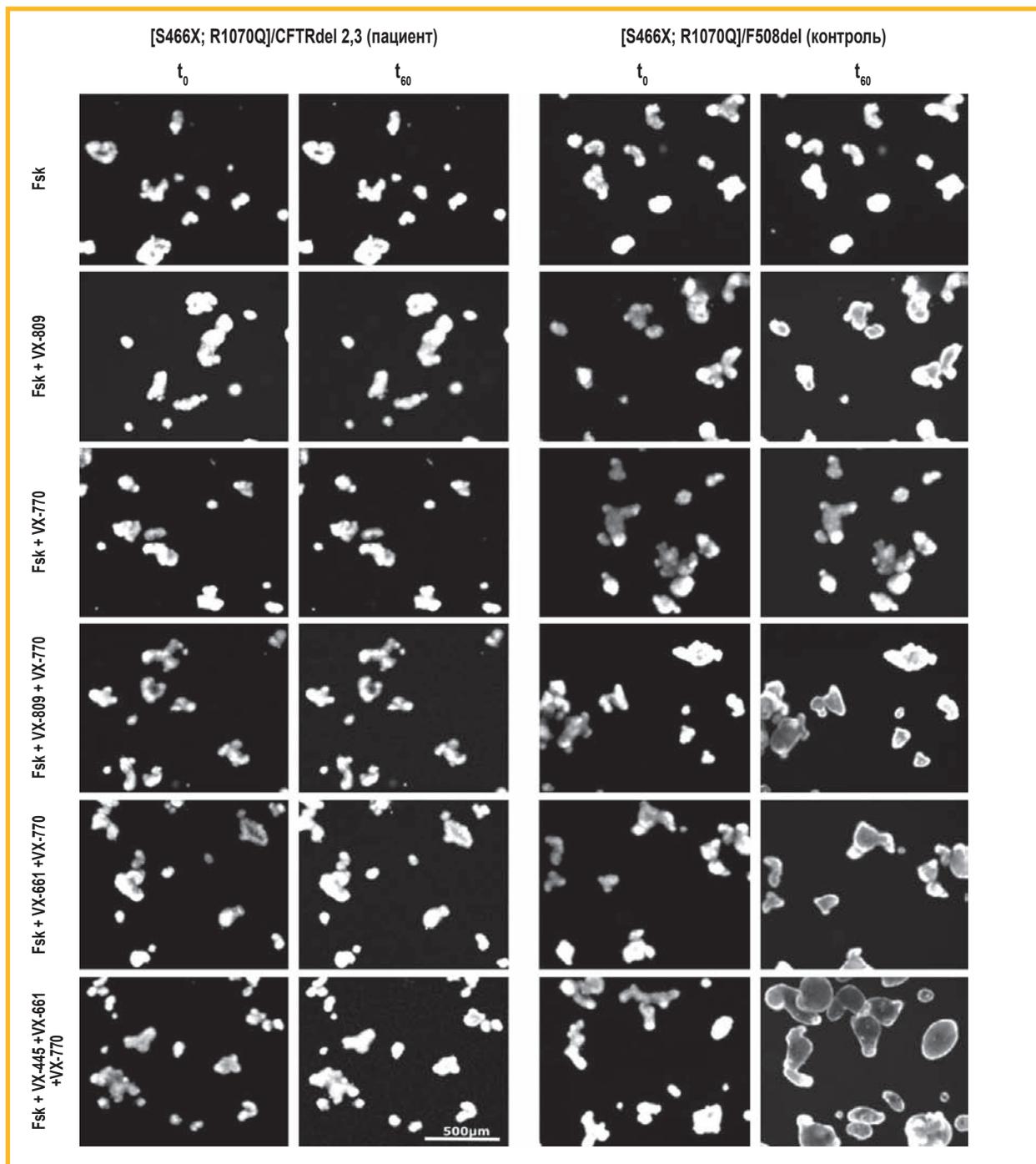


Рис. 3. Характерные изображения кишечных органоидов с комплексным аллелем [S466X; R1070Q] до воздействия форсколина (5 мкМ, t_0) и таргетных препаратов (все – 3,5 мкМ) и после завершения обработки (t_{60}). Окраска – Calcein (0,84 мкМ, 1 ч), объектив $\times 5$, масштабная шкала – 500 мкм

Figure 3. Characteristic images of intestinal organelles with the complex allele [S466X; R1070Q] before exposure to forskolin (5 μ M, t_0) and targeted drugs (all 3.5 μ M) and after completion of treatment (t_{60}). Staining – Calcein (0.84 μ M, 1 h), $\times 5$ magnification lens, scale bar – 500 μ m

активность канала CFTR из-за дефекта созревания белка, что приводит к отсутствию эффекта на таргетную терапию комбинацией ивакафтор + тезакафтор [15].

Наоборот, по данным *Á. Duarte et al.*, «смягчающий» фенотипические проявления МВ аддитивный эффект зафиксирован в случае комплексного аллеля [R334W; R1158X]. Предположительно, присутствие в цис-положении мутации R334W может минимизировать влияние нонсенс-мутации R1158X [24].

Заключение

Показатели плотности тока короткого замыкания (Δ ISC) при введении стимуляторов при использовании метода ОРКП у пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 свидетельствуют об отсутствии функционирования хлорного канала, что соответствует показателям группы с генотипом F508del/F508del (II класс), а функция натриевого канала – показателям при генотипе I класс/I класс.

На культурах кишечных органоидов, полученных от пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3, изучено влияние CFTR-модуляторов на функциональную активность белка CFTR. При стимулировании форсколином органоиды пациента с комплексным аллелем [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 не отвечают набуханием, что свидетельствует о полной утрате функции CFTR-канала. При обработке кишечных органоидов таргетными препаратами их объем не изменяется, в отличие от контрольной культуры.

Хлорный канал пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 не чувствителен ни к одному таргетному препарату, в отличие от такового у пациента с генотипом [S466X; R1070Q]/F508del, которому благодаря варианту F508del может быть назначена терапия препаратом элексакафтор + тезакафтор + ивакафтор. Пациенту с генотипом [S466X; R1070Q]/CFTRdele2,3 терапия CFTR-модуляторами не может быть рекомендована, поскольку на модели кишечных органоидов при ответах AUC \leq 1 000 отн. ед. назначение CFTR-модуляторов не приведет к видимому терапевтическому эффекту [25].

Литература

- Shteinberg M., Haq I.J., Polineni D., Davies J.C. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2021; 397 (10290): 2195–2211. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32542-3.
- CFTR2. Clinical and functional translation of CFTR. Updated: April 29, 2022. Available at: <https://cfr2.org/>
- McDermott G., Reece E., Renwick J. Microbiology of the cystic fibrosis airway. In: Schmidt T.M., ed. *Encyclopedia of Microbiology*. 4th Edn. Academic Press; 2019: 186–198. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.90263-2.
- Mickle J.E., Cutting G.R. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med. Clin. North Am.* 2000; 84 (3): 597–607. DOI: 10.1016/S0025-7125(05)70243-1.
- Terlizzi V., Centrone C., Botti M., Taccetti G. G378X-I148T CFTR variant: a new complex allele in a cystic fibrosis newborn with pancreatic insufficiency. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2022; 10 (9): e2033. DOI: 10.1002/mgg3.2033.
- Wei L., Vankeerberghen A., Jaspers M. et al. Suppressive interactions between mutations located in the two nucleotide binding domains of CFTR. *FEBS Lett.* 2000; 473 (2): 149–153. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01519-2.
- El-Seedy A., Girodon E., Norez C. et al. CFTR mutation combinations producing frequent complex alleles with different clinical and functional outcomes. *Hum. Mutat.* 2012; 33 (11): 1557–1565. DOI: 10.1002/humu.22129.
- Bienvenu T., Lopez M., Girodon E. Molecular diagnosis and genetic counseling of cystic fibrosis and related disorders: new challenges. *Genes (Basel)*. 2020; 11 (6): 619. DOI: 10.3390/genes11060619.
- Кондратьева Е.И., Красовский С.А., Старинова М.А. и др., ред. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2020 год. М.: Медпрактика-М; 2022. Доступно на: http://ostrov.ru.com/site_Registre_2020.pdf
- Кондратьева Е.И., Петрова Н.В., Красовский С.А. и др. Фенотип пациентов с комплексным аллелем s466x-r1070q при муковисцидозе в Российской Федерации. *Пульмонология*. 2017; 27 (6): 695–703. DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-6-695-703.
- Krasnov K.V., Tzetis M., Cheng J. et al. Functional studies of rare missense mutations in CFTR facilitate interpretation of genotype-phenotype relationships. *Hum. Mutat.* 2008; 29 (11): 1364–1372. DOI: 10.1002/humu.20866.
- Petrova N., Kashirskaya N., Zinchenko R. et al. Genotype-phenotype correlation in Russian cystic fibrosis patients with S466X-R1070Q complex allele. *J. Cyst. Fibros.* 2015; 14 (Suppl. 1): S42. DOI: 10.1016/S1569-1993(15)30133-8.

- Cholon D.M., Quinney N.L., Fulcher M.L. et al. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of Δ F508 CFTR in cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6 (246): 246ra96. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008680.
- Chevalier B., Hinzpeter A. The influence of CFTR complex alleles on precision therapy of cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2020; 19 (Suppl. 1): S15–18. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.12.008.
- Kondratyeva E., Bulatenko N., Melyanovskaya Y. et al. Personalized selection of a CFTR modulator for a patient with a complex allele [L467F;F508del]. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022; 44 (10): 5126–538. DOI: 10.3390/cimb44100349.
- Beekman J.M. Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors. *Pediatr. Pulmonol.* 2016; 51 (Suppl. 44): S23–34. DOI: 10.1002/ppul.23553.
- 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.
- 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): 162–166. DOI: 10.14300/mnsc.2020.15039.
- Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013; 1: e27112. DOI: 10.4161/rdis.27112.
- Boj S.F., Vonk A.M., Stata 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): 55159. DOI: 10.3791/55159.
- 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.
- Кондратьева Е.И., Мельяновская Ю.Л., Ефремова Ф.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.
- Dörk T., Wulbrand U., Richter T. et al. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum. Genet.* 1991; 87 (4): 441–446. DOI: 10.1007/BF00197165.
- Duarte Â., Amaral M., Barreto C. et al. Complex cystic fibrosis allele R334W-R1158X results in reduced levels of correctly processed mRNA in a pancreatic sufficient patient. *Hum. Mutat.* 1996; 8 (2): 134–139. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(1996)8:2<134::AID-HUMU5>3.0.CO;2-B.
- Ramalho A.S., Förstová 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.

Поступила: 20.12.22

Принята к печати: 09.02.23

References

- Shteinberg M., Haq I.J., Polineni D., Davies J.C. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2021; 397 (10290): 2195–2211. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32542-3.
- CFTR2. Clinical and functional translation of CFTR. Updated: April 29, 2022. Available at: <https://cfr2.org/>
- McDermott G., Reece E., Renwick J. Microbiology of the cystic fibrosis airway. In: Schmidt T.M., ed. *Encyclopedia of Microbiology*. 4th Edn. Academic Press; 2019: 186–198. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.90263-2.
- Mickle J.E., Cutting G.R. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med. Clin. North Am.* 2000; 84 (3): 597–607. DOI: 10.1016/S0025-7125(05)70243-1.
- Terlizzi V., Centrone C., Botti M., Taccetti G. G378X-I148T CFTR variant: a new complex allele in a cystic fibrosis newborn with pancreatic insufficiency. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2022; 10 (9): e2033. DOI: 10.1002/mgg3.2033.
- Wei L., Vankeerberghen A., Jaspers M. et al. Suppressive interactions between mutations located in the two nucleotide binding domains

- of CFTR. *FEBS Lett.* 2000; 473 (2): 149–153. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01519-2.
7. El-Seedy A., Girodon E., Norez C. et al. CFTR mutation combinations producing frequent complex alleles with different clinical and functional outcomes. *Hum. Mutat.* 2012; 33 (11): 1557–1565. DOI: 10.1002/humu.22129.
 8. Bienvenu T., Lopez M., Girodon E. Molecular diagnosis and genetic counseling of cystic fibrosis and related disorders: new challenges. *Genes (Basel)*. 2020; 11 (6): 619. DOI: 10.3390/genes11060619.
 9. Kondratyeva E.I., Krasovskiy S.A., Starinova M.A. et al., eds. [Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. 2020]. Moscow: Medpraktika-M; 2022. Available at: http://ostrovaru.com/site_Registre_2020.pdf (in Russian).
 10. Kondratyeva E.I., Petrova N.V., Krasovskiy S.A. et al. [Cystic fibrosis phenotype with the complex allele s466x-r1070q in Russian Federation]. *Pul'monologiya*. 2017; 27 (6): 695–703. DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-6-695-703 (in Russian).
 11. Krasnov K.V., Tzetis M., Cheng J. et al. Functional studies of rare missense mutations in CFTR facilitate interpretation of genotype-phenotype relationships. *Hum. Mutat.* 2008; 29 (11): 1364–1372. DOI: 10.1002/humu.20866.
 12. Petrova N., Kashirskaya N., Zinchenko R. et al. Genotype-phenotype correlation in Russian cystic fibrosis patients with S466X-R1070Q complex allele. *J. Cyst. Fibros.* 2015; 14 (Suppl. 1): S42. DOI: 10.1016/S1569-1993(15)30133-8.
 13. Cholon D.M., Quinney N.L., Fulcher M.L. et al. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6 (246): 246ra96. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008680.
 14. Chevalier B., Hinzpeter A. The influence of CFTR complex alleles on precision therapy of cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2020; 19 (Suppl. 1): S15–18. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.12.008.
 15. Kondratyeva E., Bulatenko N., Melyanovskaya Y. et al. Personalized selection of a CFTR modulator for a patient with a complex allele [L467F;F508del]. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022; 44 (10): 5126–538. DOI: 10.3390/cimb44100349.
 16. Beekman J.M. Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors. *Pediatr. Pulmonol.* 2016; 51 (Suppl. 44): S23–34. DOI: 10.1002/ppul.23553.
 17. 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.
 18. 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): 162–166. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039 (in Russian).
 19. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013; 1: e27112. DOI: 10.4161/rdis.27112.
 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): 55159. 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. Kondratyeva E.I., Melyanovskaya Y.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).
 23. Dörk T., Wulbrand U., Richter T. et al. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum. Genet.* 1991; 87 (4): 441–446. DOI: 10.1007/BF00197165.
 24. Duarte Â., Amaral M., Barreto C. et al. Complex cystic fibrosis allele R334W-R1158X results in reduced levels of correctly processed mRNA in a pancreatic sufficient patient. *Hum. Mutat.* 1996; 8 (2): 134–139. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(1996)8:2<134::AID-HUMU5>3.0.CO;2-B.
 25. Ramalho A.S., Förstová 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.

Received: December 20, 2022

Accepted for publication: February 09, 2023

Информация об авторах / Authors Information

Краснова Мария Геннадьевна – аспирант, лаборант-исследователь лаборатории генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: krasnova.m.g.0605@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2195-3025>)

Maria G. Krasnova, Postgraduate Student, Laboratory Assistant-Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: krasnova.m.g.0605@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2195-3025>)

Мельяновская Юлия Леонидовна – научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: mgnc@med-gen.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>)

Yuliya L. Mel'yanovskaya, Researcher, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: mgnc@med-gen.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>)

Красовский Станислав Александрович – к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории муковисцидоза Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства; ведущий научный сотрудник научно-клинического отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; врач-пульмонолог отделения муковисцидоза Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени Д.Д.Плетнева Департамента здравоохранения города Москвы»;

тел.: (495) 965-23-24; e-mail: sa_krasovsky@mail.ru (SPIN-код: 3385-6489; Author ID: 688178; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9642-0947>)

Stanislav A. Krasovsky, Candidate of Medicine, Senior Researcher, Cystic Fibrosis Laboratory, Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia; Leading Researcher, Scientific and Clinical Department, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; Pulmonologist, Department of Cystic Fibrosis, State Budgetary Healthcare Institution “City Clinical Hospital named after D.D.Pletnev, Moscow City Health Department”; tel.: (495) 965-23-24; e-mail: sa_krasovsky@mail.ru (SPIN: 3385-6489; Author ID: 688178; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9642-0947>)

Булатенко Наталья Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: bnv695@gmail.com

Nataliya V. Bulatenko, Junior Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: bnv695@gmail.com

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

Anna S. Efremova, Candidate of Biology, Leading Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: anna.efremova.83@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>)

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» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>)
Tatiana B. Bukharova, Candidate of Biology, Leading Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>)

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» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (495) 324-20-24; e-mail: dvgoldrm7@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>)
Dmitry V. Goldshtein, Doctor of Biology, Professor, Head of the Laboratory of Stem Cell Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (495) 324-20-24; e-mail: dvgoldrm7@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>)

Участие авторов

Краснова М.Г. – проведение экспериментов на кишечных органоидах, количественный анализ результатов, оформление рисунков, написание и редактирование рукописи
Мельяновская Ю.Л. – дизайн экспериментов по ОРКП, анализ полученных результатов, оформление рисунков, написание рукописи
Красовский С.А. – описание клинической картины, сбор данных и их интерпретация, написание и редактирование рукописи
Булатенко Н.В. – проведение экспериментов на кишечных органоидах, количественный анализ результатов, оформление рисунков
Ефремова А.С. – дизайн экспериментов с культурами органоидов, оценка полученных результатов, редактирование рукописи
Бухарова Т.Б. – дизайн экспериментов на кишечных органоидах, интерпретация результатов, редактирование рукописи
Гольдштейн Д.В. – руководство на всех этапах выполнения работы, редактирование рукописи
Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации, несут ответственность за целостность всех частей статьи.

Authors Contribution

Krasnova M.G. – conducting experiments on intestinal organoids, quantitative analysis of the results, design of the figures, writing and editing the manuscript
Melianovskaya Yu.L. – design of experiments based on ICM method, analysis of the results, design of the figures, writing the manuscript
Krasovskiy S.A. – description of the clinical picture, data collection and interpretation, writing and editing the manuscript
Bulatenco N.V. – conducting experiments on intestinal organoids, quantitative analysis of the results, design of the figures
Efremova A.S. – design of experiments on intestinal organoids, evaluation of the results, editing of the manuscript
Bukharova T.B. – design of experiments on intestinal organoids, interpretation of the results, editing the manuscript
Goldshtein D.V. – guidance at all stages of the work, editing the manuscript

All authors made a significant contribution to the search, analysis, and preparation of the article, read and approved the final version before publication, and accepted responsibility for the integrity of all parts of the article.