

Оценка действия CFTR-модуляторов при наличии в генотипе пациентов с муковисцидозом варианта сплайсинга 2789+5G>A

М.Г.Краснова¹ ✉, А.С.Ефремова¹, Ю. Л.Мельяновская¹, С.А.Красовский¹⁻³, Д.О.Мокроусова¹, Т.Б.Бухарова¹, Н.В.Булатенко¹, Е.И.Кондратьева¹, 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 С.С.Юдина Департамента здравоохранения города Москвы»: 115446, Россия, Москва, Коломенский проезд, 4

Резюме

Около 13 % всех вариантов, вызывающих проявление муковисцидоза (МВ), являются вариантами сплайсинга в гене *CFTR*, однако на данный момент такие варианты изучены недостаточно. **Целью** исследования явилось изучение варианта сплайсинга 2789+5G>A на фенотипические проявления МВ и эффективность таргетной терапии на модели кишечных органоидов (КО) у пациентов с генотипами 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTR^{rdele2,3}. **Материалы и методы.** Представлены клинические особенности течения МВ у 2 пациентов-носителей варианта 2789+5G>A в гетерозиготном состоянии с генетическими вариантами гена *CFTR* I и VII классов. Использованы данные истории болезни, метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП), метод КО, форсколиновый тест. **Результаты.** Определена клиническая картина: течение заболевания средней тяжести, сохранность поджелудочной железы. Также методом ОРКП показана сохранность функции хлорного канала. По данным исследования культуры КО, полученной из ткани кишечника, показана умеренная остаточная функциональная активность хлорного канала. Кроме того, установлена чувствительность варианта 2789+5G>A к действию всех протестированных CFTR-модуляторов. **Заключение.** Установлено, что вариант сплайсинга 2789+5G>A характеризуется умеренной остаточной функциональной активностью CFTR-канала, чувствителен ко всем таргетным препаратам, однако самым эффективным CFTR-модулятором при данном варианте является тезакафтор.

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

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Этическая экспертиза. Исследование и форма информированного добровольного согласия были 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. Участниками исследования или их законными представителями (если возраст участников моложе 15 лет) подписано информированное добровольное согласие.

© Краснова М.Г. и соавт., 2024

Для цитирования: Краснова М.Г., Ефремова А.С., Мельяновская Ю.Л., Красовский С.А., Мокроусова Д.О., Бухарова Т.Б., Булатенко Н.В., Кондратьева Е.И., Гольдштейн Д.В. Оценка действия CFTR-модуляторов при наличии в генотипе пациентов с муковисцидозом варианта сплайсинга 2789+5G>A. *Пульмонология*. 2024; 34 (6): 857–868. DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-6-857-868

Therapeutic effect of CFTR modulators in cystic fibrosis patients with the 2789+5G>A splice variant in the genotype

Maria G. Krasnova¹ ✉, Anna S. Efremova¹, Yulia L. Melyanovskaya¹, Stanislav A. Krasovskiy¹⁻³, Diana O. Mokrousova¹, Tatiana B. Bukharova¹, Natalya V. Bulatenko¹, Elena I. Kondratyeva¹, 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 State Budgetary Institution “Pulmonology Scientific Research Institute” under Federal Medical and Biological Agency of Russian Federation: Orekhovyy bul’var 28, Moscow, 115682, Russia

³ Moscow State Budgetary Healthcare Institution “Moscow City Hospital named after S.S.Yudin”, Moscow Healthcare Department: Kolomenskiy pr. 4, Moscow, 115446, Russia

Abstract

About 13% of all variants causing cystic fibrosis are splice variants of the *CFTR* gene; at the moment, such variants are not well studied. **The aim** was to investigate the effect of the splicing variant 2789+5G>A on the phenotypic manifestations of cystic fibrosis and the effectiveness of targeted therapy in an intestinal organoids model in the patients with genotypes 2789+5G>A/L732X and 2789+5G>A/CFTRdele2,3. **Methods.** The medical history data, intestinal current measurement (ICM), and forskolin-induced swelling assay in the intestinal organoids were used. **Results.** The clinical features of the course of CF in 2 patients, carriers of the 2789+5G>A variant in a heterozygous state with genetic variants of the *CFTR* gene of classes I and VII, are presented. Clinical picture: the disease is of moderate severity; the pancreas is sufficient. The ICM method demonstrated the preservation of the chloride channel function. Assays on the cultured organoids obtained from the intestinal tissue showed moderate residual functional activity of the chloride channels. In addition, the 2789+5G>A variant is sensitive to all tested CFTR modulators. **Conclusions.** The splicing variant 2789+5G>A is characterized by moderate residual functional activity of the CFTR channel and is sensitive to all targeted treatments. However, the most effective CFTR modulator for this genetic variant is tezacaftor.

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

Conflict of interest. The authors declared no potential conflicts of interest.

Funding. This research was funded by the state assignment of Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics" of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Ethical review. The study and the informed voluntary consent form were approved by the Ethics Committee of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics" of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation on October 15, 2018. The study participants or their legal representatives (if the participants are under 15 years of age) signed the informed voluntary consent.

© Krasnova M.G. et al., 2024

For citation: Krasnova M.G., Efremova A.S., Melyanovskaya Yu.L., Krasovskiy S.A., Mokrousova D.O., Bukharova T.B., Bulatenko N.V., Kondratyeva E.I., Goldshtein D.V. Therapeutic effect of CFTR modulators in cystic fibrosis patients with the 2789+5G>A splice variant in the genotype. *Pul'monologiya*. 2024; 34 (6): 857–868 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-6-857-868

Муковисцидоз (МВ) – наиболее распространенное аутосомно-рецессивное жизнеугрожающее генетическое заболевание у представителей европеоидной расы. На данный момент известно > 2 100 различных вариантов гена *CFTR* (регулятор трансмембранной проводимости при МВ (MIM #602421; Gen-Bank NM 000492.3)), однако патогенность доказана только для 1 085 из них [1].

МВ характеризуется вариабельной клинической картиной, что является прямым следствием комбинации генетических факторов и условий среды, поэтому установление взаимосвязи между фенотипическими проявлениями заболевания и вызывающими их молекулярными нарушениями является важной междисциплинарной задачей на стыке медицины и биологии [2].

Причиной возникновения МВ являются нарушения функционирования канала CFTR. На данный момент выделяются 7 классов вариантов гена *CFTR*, приводящих к заболеванию [3]. Варианты, относящиеся к I–III и VII классам, характеризуются серьезными нарушениями в функционировании канала CFTR (например, нонсенс-опосредованная деградация мРНК, связанная преимущественно с преждевременным стоп-кодоном, отсутствие синтеза белка, нарушение транспорта белка на мембрану, а также крупномасштабные делеции в гене *CFTR*) [3].

Исследован вариант 2789+5G>A (с.2657+5G>A) у пациентов ($n = 2$) с генотипами 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3. Вариант L732X (с.2195T>G) встречается с частотой 0,08 %, приводит к преждевременной термации синтеза белка в регуляторном домене, что позволяет отнести его к варианту I класса [4]. Вариант CFTRdele2,3 (с.54-5940_273+10250del21kb) встречается с частотой 6,11 %, относится к варианту VII класса [4]. Частота встречаемости варианта 2789+5G>A в Российской Федерации составляет 0,39 % и относится он к варианту V класса [4], в европейском регистре данный вариант встречается с частотой 0,72 % [5]. Наличие

данного патогенного варианта сплайсинга приводит к пропуску 16-го экзона и характеризуется мягким течением заболевания с сохранением функции поджелудочной железы [6]. Однако в литературе обнаружено клиническое наблюдение за пациентом с вариантом 2789+5G>A и поджелудочной недостаточностью [7].

В инструкции к препаратам ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор и лумакафтор + ивакафтор данный вариант не включен, но подходит ивакафтор и ивакафтор + тезакафтор [8, 9].

При изучении варианта 2789+5G>A для оценки функциональной активности канала CFTR применен комплексный подход, включающий в себя оценку клинических проявлений, а также анализ функциональной активности эпителиальных каналов методом определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП) и проведение форсколинового теста на кишечных органоидах (КО), замкнутых 3D-структурах, получаемых из нативной ткани кишечника, выращенных *in vitro* и повторяющих строение и свойства ткани *in vivo* [10].

Оценка функциональной активности CFTR-канала на КО проводилась при помощи форсколинового теста. Форсколин – это соединение, активирующее аденилатциклазу и вызывающее увеличение уровня циклического аденозинмонофосфата и стимуляцию функциональной активности CFTR-канала на мембране клеток. Форсколиновый тест на КО можно использовать для изучения функциональной активности канала CFTR и оценки эффективности действия таргетных препаратов.

На сегодняшний день известно 5 классов CFTR-модуляторов:

- молекулы-супрессоры, предотвращающие преждевременную термацию синтеза CFTR;
- корректоры, исправляющие дефекты фолдинга и посттрансляционных модификаций;
- потенциаторы, улучшающие проводимость канала CFTR;

- стабилизаторы, «закрепляющие» нестабильный белок CFTR на плазматической мембране, предотвращая тем самым его преждевременную деградацию и расщепление в лизосомах;
- амплификаторы, увеличивающие экспрессию мРНК CFTR [11].

Молекулы-супрессоры терминации не используются для терапии пациентов с МВ, к ним относятся аталурен (РТС124) и ELX-02. Корректоры лумакатор (VX-809), тезакафтор (VX-661) и элексакафтор (VX-445) одобрены Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (*Food and Drug Administration* – FDA), как и потенциатор ивакафтор (VX-770), на данный момент используются в таргетной терапии пациентов с МВ [11]. Эффективность стабилизатора кавазонстата N91115 при клинических испытаниях не установлена. Амплификатор незоликафтор (РТИ-428) проходит клинические испытания, однако существуют исследования, проведенные на клетках CFBEo-, по данным которых доказано, что совместное применение РТИ-428 с комбинацией ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор приводит к значительному усилению терапевтического эффекта [12]. Подобрать эффективную таргетную персонализированную терапию зарегистрированными таргетными препаратами для пациентов с редкими нуклеотидными вариантами гена CFTR возможно при оценке набухания КО при воздействии форсколина.

Целью работы явилось исследование влияния варианта сплайсинга 2789+5G>A на фенотипические проявления МВ и эффективность таргетной терапии на модели КО у пациентов с генотипами 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3.

Материалы и методы

Исследование и форма информированного добровольного согласия были 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. Участниками исследования или их законными представителями (если возраст участников моложе 15 лет) подписано информированное добровольное согласие.

Метод определения разницы кишечных потенциалов. Для оценки функции ионных каналов использовался метод ОРКП [13–15]. Эксперимент методом ОРКП проводился согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 [14–18] в 3 этапа, описанных в работе [16].

Группу контроля (отрицательный контроль) составили здоровые добровольцы ($n = 18$), группу сравнения (положительный контроль) – пациенты с МВ ($n = 5$) – носители варианта F508del в гомозиготном состоянии (отсутствие комплексных аллелей подтверждено секвенированием) и лица ($n = 25$) с сохраненной функцией поджелудочной железы («мягкий» генотип) [13].

Получение биопсийного материала. При ОРКП и проведении метода КО у пациентов с МВ были получены биоптаты прямой кишки. Забор биоптатов проводился на оборудовании *Olympus* с использованием щипцов *EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-230U)* согласно инструкции. Размер полученных биоптатов составлял 3–5 мм. Исследовались биоптаты пациентов ($n = 2$) с вариантом 2789+5G>A с генотипами 2789+5G>A/L732X (ОРКП и КО) и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 (только КО).

Получение культур кишечных органоидов. При получении культур КО и выполнении форсколинового теста были использованы протоколы и статьи, разработанные и написанные под руководством Д.Бекмана [19, 20]. Для получения кондиционированных сред были использованы следующие линии клеток: L-фибробласты мыши, трансфицированные Wnt-3A-экспрессирующим вектором, НЕК293 клетки, трансфицированные Noggin-экспрессирующим вектором (обе линии были предоставлены Д.Бекманом), и НЕК293T–R-spondin-1 mFc клетки, трансфицированные R-spondin-1-экспрессирующим вектором (SCC111, *Merck Millipore S.A.S., Molsheim, Франция*). Культивирование проводилось при 37 °C при использовании 5%-го CO₂. Для селективного роста трансфицированных клеток, образующих Noggin или Wnt-3A, в среду дополнительно вносились селективные антибактериальные препараты G418 или зеоцин соответственно. Полученные кондиционированные среды хранились при +4 °C. Для выделения достаточного количества КО использовались 2–4 ректальных биоптата. Изоляции крипт из биоптатов предшествовали серия промывок средой Advanced DMEM/F12 и раствором PBS, а затем инкубация с раствором 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). После этого осажденные крипты смешивались с матригелем и высевались в культуральные планшеты.

КО необходимо пересевать примерно 1 раз в неделю. В случае быстрого роста пассирование можно проводить через 4–6 дней после посева. Если культуры растут медленно (что может быть обусловлено не только качеством среды, но и генетическими отличиями между культурами), их пересевают на 8–10-й день.

В состав культуральной среды входят следующие компоненты:

- среда Advanced DMEM/F12 (*Thermo Fisher Scientific, США*);
- Wnt-3A-кондиционированная среда (получена самостоятельно);
- Noggin-кондиционированная среда (получена самостоятельно);
- R-spondin-1-кондиционированная среда (получена самостоятельно);
- mEGF (*Prospec*);
- добавка B27 (*Life Technologies: Gibco, США*);
- N-ацетилцистеин (*Sigma-Aldrich, США*);
- никотинамид (*Sigma-Aldrich, США*);
- A83-01 (*Tocris, Великобритания*);
- SB 202190 (*Sigma-Aldrich, США*);
- примонин (*InvivoGen, США*).

Форсколиновый тест на кишечных органоидах. Для проведения форсколинового теста КО высевались на 96-луночные планшеты. Через 24 ч КО окрашивались *Calcein AM (Biotium)*, затем осуществлялась стимуляция форсколином в стандартных 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 (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. Количественный анализ набухания органоидов проводился при помощи программы *Image J*. При построении графика (*RStudio*) рассчитывалась площадь под кривой (*Area Under the Curve* — AUC) зависимости изменения площади органоидов от времени с помощью программы *Microsoft Excel* (2019).

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы *RStudio*, данные представлены в виде медианы (25-й и 75-й перцентили). В качестве контроля сравнения использовалась культура, полученная от пациента с генотипом F508del/F508del.

Результаты

2789+5G>A является патогенным вариантом гена *CFTR*, относится к V классу генетических вариантов, имеет различные клинические проявления и занимает 21-е место (0,39 %) в Российском регистре больных МВ (2021) [4]. Вариант приводит к изменению сайта сплайсинга из-за замены 5-го нуклеотида в приэкзонной области (16-й интрон).

Результаты включают в себя описание клинических особенностей течения МВ у 2 пациентов-носителей варианта 2789+5G>A в гетерозиготном состоянии с генетическими вариантами гена *CFTR* I и VII классов и исследования с помощью метода ОРКП и форсколинового теста на КО.

По данным клинического наблюдения № 1 представлена клиническая картина течения МВ у пациента с генотипом 2789+5G>A/L732X.

Клиническое наблюдение № 1

Пациентка 2015 года рождения наблюдается в центре МВ с клиническим диагнозом МВ, смешанная форма (E84.8), среднетяжелое течение. Хронический гнойно-обструктивный бронхит. Дыхательная недостаточность 0-й степени. Хроническая панкреатическая недостаточность. Хронический риносинусит.

Сопутствующий диагноз: функциональный мегаколон, стадия субкомпенсации. Долихосигма.

Микробиологический диагноз: хроническая инфекция *Staphylococcus aureus*.

Генетический диагноз: 2789+5G>A/L732X.

Анамнез: диагноз МВ установлен по результатам неонатального скрининга, подтвержден положительными результатами потовой пробы (проводимость пота — 96 и 104 ммоль / л NaCl). Показатели панкреатической эла-

стазы-1 составили 72,5 и 89,43 мкг / г кала при норме > 200 мкг / г, при этом высоких доз панкреатина с заместительной целью не получала. В возрасте 1,5 мес. госпитализирована с клинической картиной синдрома псевдо-Бартера.

При осмотре в возрасте 6 лет 8 мес. состояние удовлетворительное, жалоб нет. Масса тела — 21,5 кг, рост 117 см, индекс массы тела (ИМТ) — 15,7 кг / м² (58-й перцентиль; по Z-score — 0,21); сатурация артериальной крови кислородом — 97 %. Кожа и видимые слизистые чистые. Кашель редкий, непродуктивный. Носовое дыхание свободное, без отделяемого. В легких дыхание проводится во все отделы, хрипы не выслушиваются. Частота дыхательных движений — 28 в минуту. Сердечные тоны звучные, шумов нет. Частота сердечных сокращений — 106 в минуту. Живот несколько увеличен в объеме, доступен глубокой пальпации. Печень на 2 см выступает из-под края реберной дуги. Край эластичный. Стул 1 раз в день, без видимой стеатореи.

Результаты обследования:

- функция внешнего дыхания: форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) — 100 %, объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁) — 109 %;
- ультразвуковое исследование органов брюшной полости: признаки диффузных изменений печени и поджелудочной железы;
- бактериологическое исследование: умеренный рост *Staphylococcus aureus*;
- копрологическое исследование: присутствие нейтрального жира;
- биохимический анализ крови без патологических изменений.

Терапия:

- пероральный прием панкреатина — 50 000 Ед. в сутки жирорастворимых витаминов, препаратов урсодезоксихолевой кислоты;
- ингаляционное введение дорназы-альфа и гипертонического раствора NaCl;
- антибактериальная терапия при обострении хронического бронхита или в случае острой респираторной вирусной инфекции.

У младшего брата пациентки также диагностирован МВ, генотип тот же — 2789+5G>A/L732X. При этом отмечены высокие показатели панкреатической эластазы-1 > 500 мкг / г кала.

Оценка функциональной активности эпителиальных ионных каналов методом определения разницы кишечных потенциалов у пациента с генотипом 2789+5G>A/L732X. Учитывая расхождение клинической картины и результатов лабораторных исследований (в генотипе присутствует «мягкий» патогенный вариант (V класс), при котором показатель распространенности недостаточности поджелудочной железы составляет 0,41, т. е. 41 % пациентов с данным вариантом в генотипе имеют панкреатическую недостаточность при наличии 2-го патогенного варианта I, II или III класса, у ребенка отмечено снижение функции поджелудочной железы — панкреатическая эластаза-1 < 100 мкг / г кала, что соответствует тяжелой степени панкреатической недостаточности при минимальной дозе панкреатических ферментов в качестве заместительной терапии, отсутствие типичного кишечного синдрома и нутритивного дефицита, наличие в семье младшего ребенка с МВ и сохранной функцией поджелудочной железы и аналогичным генотипом, рожденного в том

же браке), рекомендовано проведение исследования ОРКП.

По результатам обследования методом ОРКП показано (см. таблицу, рис. 1), что плотность тока короткого замыкания (ΔI_{sc}) в ответ на введение амилорида (натриевые ENaC-каналы) составила $-32,17 \pm 10,38 \mu A / cm^2$. Изменение ΔI_{sc} в ответ на введение форсколина (хлорные CFTR-каналы) составило $10,17 \pm 1,34 \mu A / cm^2$. В ответ на введение гистамина (кальциевые CaCCs-каналы) ΔI_{sc} изменяется в отрицательную сторону, что отражает отток ионов калия из клетки. При этом плотность тока составила $20,17 \pm 5,72$

$5,72 \mu A / cm^2$. Метод ОРКП свидетельствует о сниженной функции канала CFTR, результаты соответствуют «мягкому» генотипу.

Клиническая картина пациента с генотипом 2789+5G>A/CFTRdele2,3 представлена по данным клинического наблюдения № 2.

Клиническое наблюдение № 2

Пациентка 1986 года рождения наблюдается в центре МВ взрослых с марта 2004 г. с диагнозом МВ тяжелого течения. Хронический гнойно-обструктивный бронхит. Диффузные

Таблица
Показатели плотности тока короткого замыкания ($\mu A / cm^2$) при введении стимуляторов у пациента с генотипом 2789+5G>A/L732X в сравнении с референсными значениями [21]

Table
Short circuit current density ($\mu A/cm^2$) upon administration of the stimulants in a patient with 2789+5G>A/L732X genotype in comparison with the reference values [21]

$\Delta I_{sc}, \mu A / cm^2$	Амилорид (натриевые ENaC-каналы)	Форсколин (хлорные CFTR-каналы)	Гистамин (кальциевые CaCCs-каналы)
Биоптат:			
• № 1	-49	11	27,5
• № 2	-22	8	21,5
• № 3	-25,5	11,5	11,5
M ± m больного	$-32,17 \pm 10,38$	$10,17 \pm 1,34$	$20,17 \pm 5,72$
F508del / F508del	$-15,70 \pm 3,51$	$3,33 \pm 0,63$	$17,83 \pm 3,57$
«Мягкий» генотип	$-17,73 \pm 4,35$	$14,25 \pm 1,78$	$47,52 \pm 32,52$
Контрольная группа	$-7,67 \pm 1,76$	$26,72 \pm 2,66$	$109,76 \pm 8,18$

Примечание: ΔI_{sc} – плотность тока короткого замыкания.

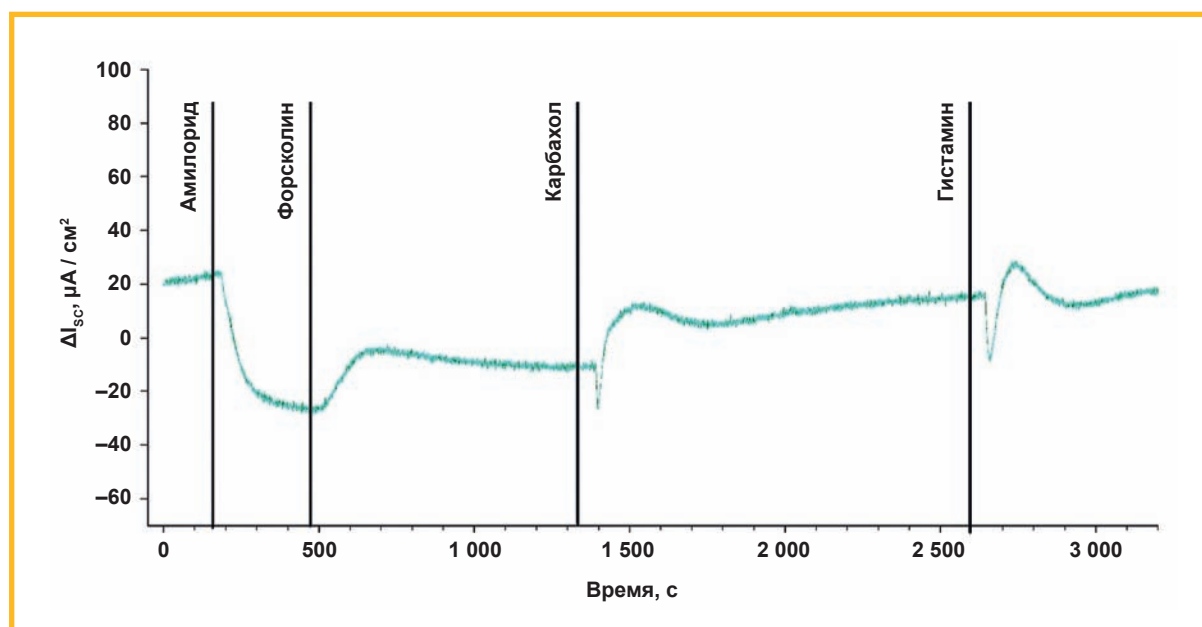


Рис. 1. Результаты определения разницы кишечных потенциалов у пациента с генотипом 2789+5G>A/L732X

Примечание: ΔI_{sc} – плотность тока короткого замыкания; при добавлении амилорида (натриевые ENaC-каналы) происходило снижение тока короткого замыкания, ответная реакция ткани на форсколин (хлорные CFTR-каналы) ослаблена, на введение карбахола и гистамина (кальциевые CaCCs каналы) наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Figure 1. ICM values in a patient with 2789+5G>A/L732X genotype

Note: The addition of amiloride (sodium ENaC channels) was associated with a decrease in the short circuit current and weakening of the tissue response to forskolin (chloride CFTR channels). The addition of carbachol and histamine (calcium CaCCs channels) was associated with a change in the short circuit current in the negative direction.

двухсторонние бронхоэктазы. Диффузный пневмосклероз. Фиброателектаз верхней доли левого легкого. Дыхательная недостаточность 1–2-й степени. Хроническая панкреатическая недостаточность. Хронический полипозный риносинусит, состояние после оперативного лечения осенью 2020 г.

Хроническое инфицирование дыхательных путей *Pseudomonas aeruginosa*.

Генотип 2789+5G>A/CFTRdele2,3.

Осложнения: хронический калькулезный холецистит, ремиссия.

При осмотре (2024) предъявляет жалобы на ежедневный кашель с умеренным количеством слизисто-гноющей мокроты, одышку при быстрой ходьбе, эпизоды слабости, кровохарканья и субфебрилитета.

Из анамнеза известно, что клинически заболевание проявляется с раннего возраста и выражается рецидивирующей бронхолегочной инфекцией и «стертыми» проявлениями панкреатической недостаточности. Диагноз МВ установлен в апреле 1997 г. в возрасте 11 лет на основании клинической картины и положительной потовой пробы (хлориды пота по Гибсону—Куку — 64 ммоль / л), с того же времени отмечено хроническое инфицирование дыхательных путей *P. aeruginosa*.

Регулярное наблюдение специалистами Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства началось с весны 2004 г. Показатели респираторной функции при этом составляли:

- ФЖЕЛ — 87 %_{долж.};
- ОФВ₁ — 82 %_{долж.}

Нутритивный дефицит (рост — 174 см, масса тела — 55 кг, ИМТ — 18,2 кг / м²). Объем проводимой терапии заключался в ежедневном проведении базисной терапии и регулярных курсах антибактериального лечения, в т. ч. внутривенно. Осенью 2020 г. проведено оперативное вмешательство по поводу полипозного риносинусита с положительным эффектом.

Несмотря на проводимую терапию, в последние годы состояние ухудшилось: нарастали проявления хронического бронхита, отмечено сокращение периода ремиссии после антибактериальной терапии, потребовалось усиление антибактериального и базисного лечения, манифестировала одышка. Клиническое ухудшение сопровождалось структурными изменениями легочной ткани. К 2021 г. постепенно сформировался фиброателектаз верхней доли правого легкого, а максимальный показатель ОФВ₁ в этот период составил 46 %_{долж.}

С января 2022 г. пациентка начала прием препарата таргетной терапии ивакафтор, терапия продолжается до настоящего времени. На фоне терапии отмечена умеренная стабилизация состояния: уменьшение проявлений бронхита, большая продолжительность ремиссии после антибактериальной терапии и уменьшение необходимости в ней. Также в 2022–2024 гг. отмечен прирост ОФВ₁ до 58–61 %_{долж.} Базисная терапия сохраняется в следующем объеме: ингаляционно — дорназа альфа и гипертонический раствор, беродуал; внутрь — панкреатин, поливитамины; нерегулярно — омега-3 и урсодезоксихолевая кислота.

Для оценки действия 2-компонентных (ивакафтор + лумакафтор и ивакафтор + тезакафтор) и 3-компонентного (ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор) таргетных препаратов рекомендовано проведение форсколинового теста на КО с целью подбора оптимального препарата для патогенетического лечения.

Оценка влияния таргетных препаратов на восстановление функционального 2789+5G>A- CFTR-канала с помощью теста на кишечных органоидах. Из кишечных биоптатов пациентов с вариантом гена *CFTR* 2789+5G>A ($n = 2$) получены стабильные культуры КО для оценки эффективности действия таргетных препаратов, а также функциональной активности канала *CFTR*. В отличие от контрольной культуры с генотипом F508del/F508del, при стимуляции культур КО форсколином в максимальной и минимальной концентрациях (5 и 0,128 мкМ соответственно в течение 1 ч) у пациентов с генотипами 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 продемонстрирована высокая остаточная функциональная активность канала *CFTR*. При обработке форсколином обе исследуемые культуры КО отвечают большим набуханием по сравнению с F508del/F508del-культурой, что свидетельствует о высокой сохранности функциональной активности канала *CFTR* (рис. 2, 3). При воздействии форсколином в высокой концентрации 5 мкМ ответ (AUC) контрольной культуры составляет $68,01 \pm 36,18$ отн. ед., в отличие от культур с вариантом с.2657+5G>A: в случае культур с компаунд-гетерозиготным вариантом L732X ответ составляет $380,9 \pm 131,9$ отн. ед., в случае с компаунд-гетерозиготным вариантом CFTRdele2,3 — $448,4 \pm 208,5$ отн. ед. (см. рис. 3).

Ответы при воздействии форсколином совместно с потенциатором ивакафтором на культуры 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 составляют $816,6 \pm 236,6$ и $856,5 \pm 219,0$ отн. ед. соответственно, в то время как ответ F508del/F508del-органойдов — $163,9 \pm 40,9$ отн. ед. Ответы на обработку 5 мкМ форсколином в сочетании с корректором лумакафтором составляют $1\,288,8 \pm 224,9$ и $1\,042,5 \pm 162,3$ отн. ед. у культур 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 соответственно, в то время как у контрольной культуры F508del/F508del AUC составляет всего $287,1 \pm 63,0$ отн. ед.

Наблюдается эффективность действия «двойных» комбинированных таргетных препаратов для 2789+5G>A/L732X культуры: рассчитанные значения AUC составляют $1\,111,1 \pm 210,0$ отн. ед. для комбинации ивакафтор + лумакафтор и $1\,481,3 \pm 355,7$ отн. ед. — для комбинации ивакафтор + тезакафтор. Аналогичная тенденция наблюдается для культуры 2789+5G>A/CFTRdele2,3, ответы которой в случае комбинированного таргетного препарата ивакафтор + лумакафтор составляют $1\,105,1 \pm 243,1$ и $1\,511,2 \pm 188,2$ отн. ед. при воздействии препарата ивакафтор + тезакафтор. Ответы на данные препараты практически совпадают между исследуемыми культурами. При этом ответ на ивакафтор + тезакафтор выше по сравнению с контролем. Ответы при воздействии препарата ивакафтор + тезакафтор на культуру с генотипом F508del/F508del составляют $1\,292,1 \pm 122,0$ отн. ед. Ответ на комбинацию ивакафтор + лумакафтор для F508del/F508del-органойдов, наоборот, выше и составляет $1\,800,6 \pm 116,5$ отн. ед. Сопоставимые результаты для культур 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 были получены при одновременном действии 3-компонентного

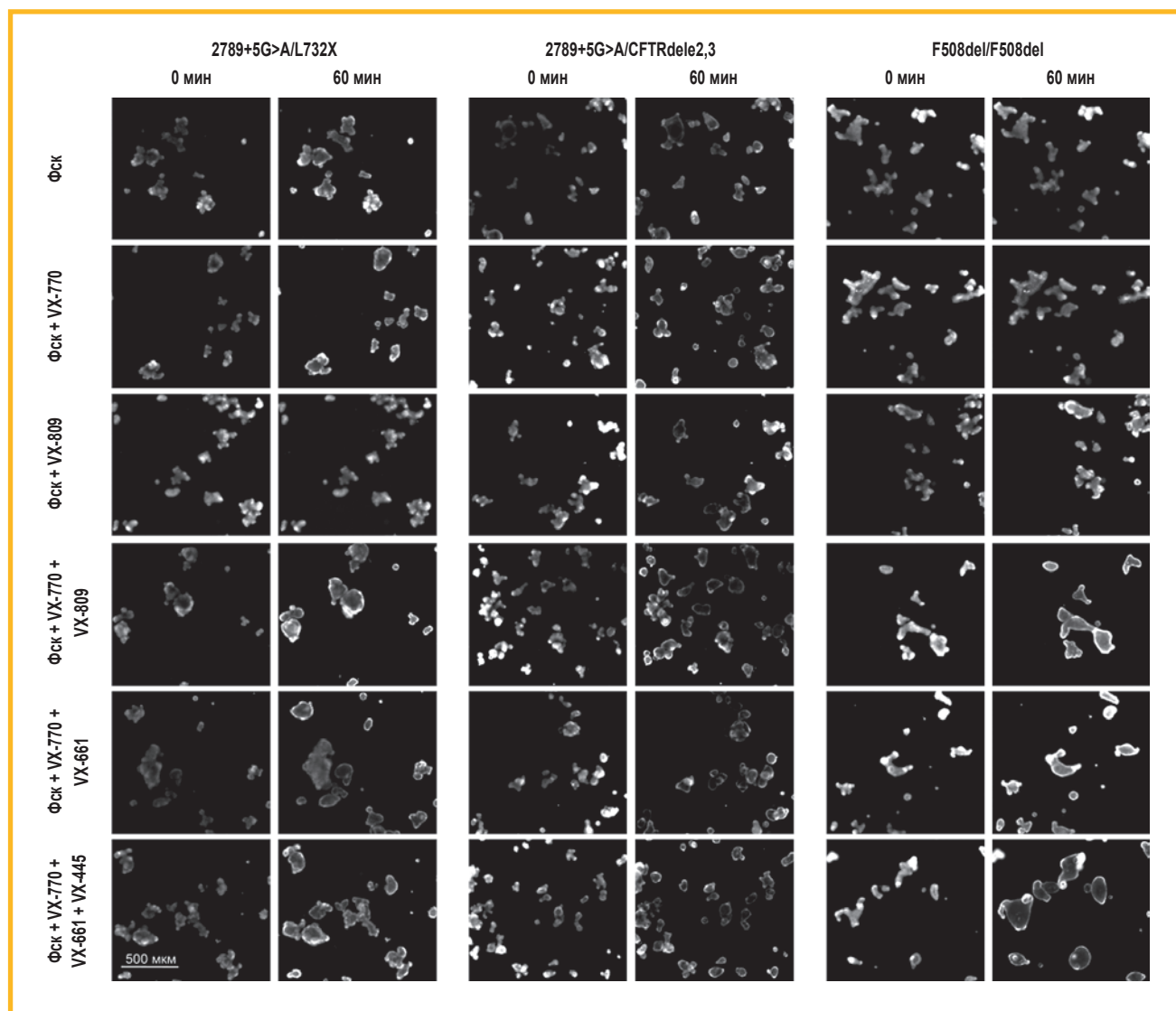


Рис. 2. На панели изображений представлены кишечные органоиды, полученные от пациентов, несущих вариант 2789+5G>A, до и после обработки форсколином (5 мкМ) в сравнении с контрольной культурой, гомозиготной по F508del. Все CFTR-модуляторы использовались в концентрации 3,5 мкМ; окрашивание проводилось с помощью прижизненного красителя кальцеина (0,84 мкМ, 40 мин), объектив $\times 5$; масштабная шкала — 500 мкм

Примечание: Фск — форсколин, VX-770 — ивакафтор, VX-809 — лумакафтор, VX-661 — тезакафтор, VX-445 — элексакафтор.

Figure 2. The panel of images shows intestinal organoids obtained from patients carrying the 2789+5G>A variant before and after the treatment with forskolin (5 μ M) compared with the control F508del-homozygous culture. All CFTR modulators were used at a concentration of 3.5 μ M; the staining was carried out using the intravital calcein dye (0.84 μ M, 40 minutes), objective $\times 5$; scale bar — 500 μ m

CFTR-модулятора ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор — $1\,756,4 \pm 591,6$ и $1\,477,3 \pm 155,8$ отн. ед. для 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 соответственно. Несмотря на высокую сохранность остаточной функциональной активности 2789+5G>A-CFTR-канала, ответ на тройной комбинированный таргетный препарат у КО с этим вариантом значительно ниже, чем у культуры F508del/F508del, ответ которой составлял $3\,547,4 \pm 420,7$ отн. ед. (см. рис. 3).

Обсуждение

Известно, что мутация сплайсинга 2789+5G>A в гене CFTR связана с «мягким» течением МВ [22, 23].

Недостаточность поджелудочной железы выявлена у 19 (59,4 %) из 32 пациентов с генотипом 2789+5G>A/F508del vs 32 (97,0 %) из 33 пациентов с F508del/

F508del ($p = 0,002$). У носителей 2789+5G>A наблюдалось более мягкое течение заболевания и отсутствие цирроза печени и сахарного диабета [24, 25].

У пациентки с генотипом 2789+5G>A/L732X отмечалось легкое течение МВ и панкреатическая недостаточность с низкой потребностью в ферментах, хотя у ее брата с таким же генотипом установлена сохранная функция поджелудочной железы. Метод ОРКП показал снижение функции хлорного канала, характерное для «мягких» генетических вариантов.

У взрослой пациентки (клиническое наблюдение № 2) в связи с поздней диагностикой заболевания отмечается более тяжелое течение заболевания на фоне хронического инфицирования и снижения функции легких, повышенная потребность в ферментах.

При изучении ассоциации генотипа и фенотипа 2789+5G>A у компаунд-гетерозиготных пациентов

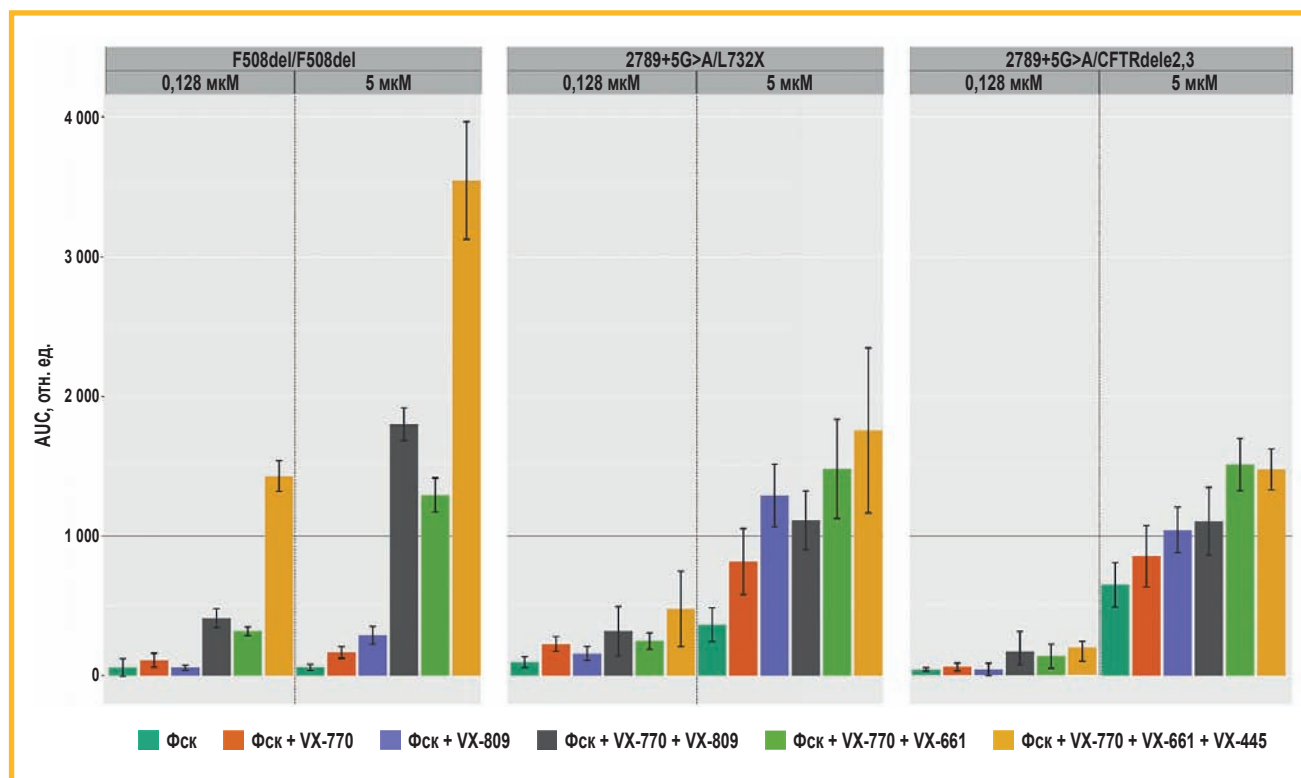


Рис. 3. Оценка набухания кишечных органоидов с генотипами 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 по сравнению с органоидами, полученными от пациента с генотипом F508del/F508del

Примечание: Фск – форсколин, VX-770 – ивакафтор, VX-809 – лумакафтор, VX-661 – тезакафтор, VX-445 – элексакафтор.

Figure 3. Estimated swelling of the intestinal organoids for genotypes 2789+5G>A/L732X and 2789+5G>A/CFTRdele2,3 compared with the organoids obtained from a patient with the F508del/F508del

указывается, что укороченный CFTR и / или небольшие количества нормального CFTR могут обеспечить некоторую тканеспецифическую защиту от проявления клинических симптомов. Мутантный белок содержит полную N-концевую половину и регуляторный домен. Рекombинантная N-концевая часть CFTR (D836X) образует функциональные хлорные каналы *in vitro* [25]. Если эти данные *in vitro* отражают ситуацию *in vivo*, то небольшая часть полноразмерного белка и большая часть укороченного TM1-NBD1-R CFTR, синтезируемого с аллеля 2789+5G>A, могут быть достаточными для надлежащего функционирования некоторых эпителиальных тканей, таких как слизистая кишечника, но не потовые железы, где CFTR участвует как в секреции, так и в реабсорбции ионов хлора.

По ранее проведенным оценкам, значительная часть ($\approx 13\%$) патогенных вариантов в гене *CFTR* влияет на сплайсинг пре-мРНК [26]. В частности, вариант 2789+5G>A относится к варианту сплайсинга, поскольку замена расположена рядом с донорским сайтом в 16-м интроне, что приводит к пропуску экзона 16. Однако по данным дополнительного анализа, проведенного при помощи системы мини-генов, показано, что абберрантный транскрипт образуется в равной пропорции с транскриптом «дикого» типа, что приводит к мягкому фенотипическому проявлению данного варианта [27].

При анализе белка CFTR *ex vivo* выявлено неожиданное влияние варианта сайта сплайсинга

2789+5G>A на относительное количество полноразмерных изоформ CFTR, что свидетельствует о том, что, в отличие от общепринятой практики, патогенные варианты сайта сплайсинга *CFTR* следует изучать на уровне и мРНК, и белка, чтобы правильно интерпретировать связь между генотипом, патофизиологией и клиническими проявлениями МВ.

FDA одобрен CFTR-модулятор ивакафтор для применения на основе анализов *in vitro* для ряда вариантов с остаточной функцией, в т. ч. для варианта сплайсинга: 2789+5G>A [28]. При терапии препаратом ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор у пациентов с МВ с одной или двумя вариантами 2789+5G>A не установлено клинического улучшения и снижения показателей потовой пробы [29, 30].

Из описанных в Российской Федерации клинических наблюдений таргетную терапию препаратом ивакафтор получала только одна пациентка с генотипом 2789+5G>A/CFTRdele2,3. На фоне терапии отмечается уменьшение проявлений бронхита, частоты курсов антибактериальной терапии и увеличение продолжительности периодов между обострениями. Отмечен прирост ОФВ₁ с 46 % до 58–61 %. Для данного варианта *CFTR* в настоящее время рекомендованы 2 таргетных препарата, а данные об эффективности тройной комбинации разрознены, поэтому проведено исследование эффективности препарата ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор *in vitro* у 2 пациентов.

По результатам форсколинового теста на КО показано, что вариант 2789+5G>A характеризуется высо-

кой остаточной функциональной активностью канала CFTR. При оценке эффективности таргетных препаратов показана большая эффективность комбинации препаратов ивакафтор + тезакафтор по сравнению с таковой препаратов ивакафтор + лумакафтор. Несмотря на то, что у обеих культур органоидов, несущих вариант 2789+5G>A, наблюдаются пониженные ответы на действие тройным таргетным препаратом в сравнении с контрольной культурой F508del/F508del (> 1 000 отн. ед.), полученные результаты являются основанием для назначения препарата ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор пациентам с генотипом 2789+5G>A / «тяжелый» класс.

При оценке средних значений ответов обеих культур органоидов с вариантом 2789+5G>A на тройной CFTR-модулятор значения выше (1 617 отн. ед.), чем средние значения ответов на ивакафтор + тезакафтор (1 496 отн. ед.), поэтому ожидается более существенный терапевтический ответ у пациентов на фоне применения 3-компонентного препарата. Если сравнить ответы КО только на ивакафтор и ивакафтор в сочетании с препаратами, содержащими тезакафтор (ивакафтор + тезакафтор и ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор), то эффект от действия комбинированных препаратов с тезакафтором приблизительно в 2 раза выше. Следует заметить, что в инструкциях к лекарственному препарату ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор генетический вариант 2789+5G>A отсутствует. Таким образом, впервые показана высокая чувствительность варианта 2789+5G>A к действию препарата ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор *in vitro*.

Поскольку варианты, изменяющие паттерн сайтов сплайсинга, могут вызывать серьезные генетические aberrации, возникает потребность в разработке новых препаратов, способных компенсировать оказываемый эффект данными патогенными вариантами.

Исследованный в данной работе вариант 2789+5G>A CFTR — довольно частый дефект, вызывающий aberrантный сплайсинг и синтез нефункционального белка CFTR. *S. Amistadi et al.* использован подход редактирования адениновых оснований (РАО) CRISPR для исправления патогенного варианта при отсутствии двухцепочечных разрывов ДНК. Разработана клеточная модель с использованием мини-гена, воспроизводящая дефект сплайсинга 2789+5G>A. Получена достаточная эффективность коррекции варианта в клеточной модели, при этом коррекция сопровождалась случайными заменами А на G, что оказывало влияние на сплайсинг CFTR «дикого» типа. Для исправления данного нежелательного эффекта *S. Amistadi et al.* использован подход специфического редактирования адениновых оснований при использовании мРНК. Полученный подход проверен на модели КО и эпителиальных клетках бронхов, при этом показана достаточная генная коррекция для восстановления функции CFTR. При помощи высокопроизводительного секвенирования доказана высокая точность редактирования генома и аллель-специфическая коррекция, что позволило определить стратегию функциональной коррекции варианта сплайсинга

2789+5G>A-CFTR с помощью технологии CRISPR в отсутствие двухцепочечных разрывов ДНК [31].

Наличие нуклеотидных замен в каноническом сайте сплайсинга приводит к пропуску одного или нескольких экзонов. Однако при процессинге мРНК в клетке может происходить альтернативный сплайсинг в случае, если канонический сайт является слабым или наличие замены приводит к активации криптоического сайта сплайсинга. Хотя вариант 2789+5G>A характеризуется высокой фенотипической гетерогенностью, у 60 % пациентов с МВ с этим вариантом отмечается нормальная функция поджелудочной железы [5]. Более того, 2789+5G>A обнаружен у нескольких пациентов с CFTR-ассоциированными заболеваниями (такими как врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков, бронхоэктазы или панкреатит) в случае, если в транс-положении находится патогенный вариант, вызывающий МВ [6].

На сегодняшний день в процессе активной разработки находятся экспериментальные подходы лечения МВ при помощи сплайс-модулирующих антисмысловых нуклеотидов (АСН). *S. Igraja et al.* исследован АСН для коррекции aberrантного сплайсинга, вызванного вариантом 2789+5G>A. Разработаны АСН, комплементарные пре-мРНК интрона 16 мутантной области, их влияние на сплайсинг было оценено на уровне РНК и белка, оценено также влияние варианта на внутриклеточную локализацию белка и его функцию с использованием мини-гена CFTR, несущего aberrантный транскрипт, в клетках Flp-In-HEK293. По результатам, полученным на РНК мутантных клеток, обработанных АСН, показано почти полное (95 %) восстановление экзона 16 и связанное с этим увеличение уровней правильно локализованного белка CFTR с сохранением его функциональной активности [32].

Заключение

На культурах КО, полученных от пациентов с генотипами 2789+5G>A/L732X и 2789+5G>A/CFTRdele2,3 изучалась функциональная активность канала CFTR и эффективность применения CFTR-модуляторов. При воздействии форсколина КО, несущие вариант 2789+5G>A, отвечают набуханием, что свидетельствует о высокой остаточной функциональной активности канала CFTR и приводит к «мягкому» проявлению МВ, что подтверждается методом ОРКП. У пациентов с вариантом 2789+5G>A наблюдается высокая сохранность поджелудочной железы и низкая потребность в панкреатических ферментах. При наличии варианта 2789+5G>A терапия комбинацией препаратов ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор и ивакафтор + тезакафтор будет более эффективной, чем применение ивакафтора. Наиболее эффективной терапией для данного варианта является тройной таргетный препарат ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор.

Таким образом, впервые на КО показано, что комбинация CFTR-модуляторов, содержащих корректор тезакафтор, наиболее эффективны для данного варианта сплайсинга.

Литература

- Clinical and functional translation of CFTR. Available at: <https://cfr2.org/> [Accessed: September 25, 2024].
- Persico I., Feresin A., Faleschini M. et al. Things come in threes: a new complex allele and a novel deletion within the CFTR gene complicate an accurate diagnosis of cystic fibrosis. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2022; 10 (6): e1926. DOI: 10.1002/mgg3.1926.
- Santos L., Nascimento R., Duarte A. et al. Mutation – class dependent signatures outweigh disease – associated processes in cystic fibrosis cells. *Cell Biosci.* 2023; 13 (1): 26. DOI: 10.1186/s13578-023-00975-y.
- Красовский С.А., Старинова М.А., Воронкова А.Ю. и др., ред. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год. СПб: Благотворительный фонд «Острова»; 2023. Доступно на: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/registr_systicfibrosis_brochure_19_10.pdf?ysclid=m3fmyk2yuy875238135
- Cystic Fibrosis Foundation. CFTR modulator therapies. Available at: <https://www.cff.org/managing-cf/cfr-modulator-therapies>
- Deletang K., Taulan-Cadars M. Splicing mutations in the CFTR gene as therapeutic targets. *Gene Ther.* 2022; 29 (7-8): 399–406. DOI: 10.1038/s41434-022-00347-0.
- Dos Anjos F., Wruck J., do Carmo T. et al. Pancreatic Insufficiency in a Child with p.Gly542* and c.2657+5G>a heterozygote CFTR: a case report. *Clin. Med. Res.* 2022; 20 (1): 46–51. DOI: 10.3121/cmr.2022.1618.
- Kalydeco. Who Kalydeco is for. Доступно на: <https://www.kalydeco.com/who-kalydeco>
- Symdeko. Who Symdeko is for. Доступно на: <https://www.symdeko.com/who-symdeko-is-for>
- Muiliwijk D., de Poel E., van Mourik P. et al. Forskolin-induced organoid swelling is associated with long-term cystic fibrosis disease progression. *Eur. Respir. J.* 2022; 60 (2): 2100508. DOI: 10.1183/13993003.00508-2021.
- Lopes-Pacheco M. CFTR modulators: the changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front. Pharmacol.* 2020; 10: 1662. DOI: 10.3389/fphar.2019.01662.
- Bengtson C., Silswal N., Baumlín N. et al. The CFTR amplifier nesolifactor rescues TGF- β 1 inhibition of modulator-corrected F508del CFTR function. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23 (18): 10956. DOI: 10.3390/ijms231810956.
- Melyanovskaya J., Kondratyeva E., Kutsev S. Determination of reference values for the method of intestinal current measurement in the Russian Federation. *Med. News North Caucasus.* 2020; 15 (2). DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039.
- 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.
- de Winter-de Groot K.M., Berkers G., Marck-van der Wilt R.E.P. et al. Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations. *J. Cyst. Fibros.* 2020; 19 (4): 614–619. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.10.022.
- Мельяновская Л.Ю., 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/mnnc.2020.15039.
- Guimbellot J., Sharma J., Rowe S. Toward inclusive therapy with CFTR modulators: progress and challenges. *Pediatr. Pulmonol.* 2017; 52 (Suppl. 48): S4–14. DOI: 10.1002/ppul.23773.
- Clancy J., Szczesniak R., Ashlock M. et al. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS ONE.* 2013; 8 (9): e73905. DOI: 10.1371/journal.pone.0073905.
- Vonk A., van Mourik P., Ramalho A. 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.
- Boj S., Vonk A., 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.
- Мельяновская Ю.Л. Молекулярная эпидемиология муковисцидоза в Российской Федерации и комплексная оценка патогенетической роли вариантов гена CFTR на основе изучения функции эпителиальных ионных каналов (ENaC, CFTR, CaCCs): Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2023.
- Highsmith W., Burch L., Zhou Z. et al. Identification of a splice site mutation (2789 + 5G>A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis. *Hum. Mutat.* 1997; 9 (4): 332–338. DOI: 10.1002/(sici)1098-1004(1997)9:4%3C332::aid-humu5%3E3.0.co;2-7
- Dörk T., Mekus F., Schmidt K. et al. Detection of more than 50 different CFTR mutations in a large group of German cystic fibrosis patients. *Hum. Genet.* 1994; 94 (5): 533–542. DOI: 10.1007/BF00211022.
- Duguépéroux I., De Braekeleer M. The CFTR 3849+10kbC->T and 2789+5G->A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur. Respir. J.* 2005; 25 (3): 468–473. DOI: 10.1183/09031936.05.10100004.
- Van Barneveld A., Stanke F., Claass A. et al. CFTR protein analysis of splice site mutation 2789+5G->A. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7 (2): 165–167. DOI: 10.1016/j.jcf.2007.07.007.
- Bell S., De Boeck K., Amaral M. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol. Therapeutics.* 2015; 145: 19–34. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.005.
- Masvidal L., Igreja S., Ramos M. et al. Assessing the residual CFTR gene expression in human nasal epithelium cells bearing CFTR splicing mutations causing cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014; 22 (6): 784–791. DOI: 10.1038/ejhg.2013.238.
- Pranke I., Golec A., Hinzpeter A. et al. Emerging therapeutic approaches for cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 121. DOI: 10.3389/fphar.2019.00121.
- Tümmeler B. Post-approval studies with the CFTR modulators Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor. *Front. Pharmacol.* 2023; 14: 1158207. DOI: 10.3389/fphar.2023.1158207.
- Hanger S., Felton I., Ukro E. et al. The effectiveness of CFTR modulators in people with CF and rare mutations: a real-world study. *Pediatr. Pulmonol.* 2024; 59 (1): 221–224. DOI: 10.1002/ppul.26713.
- Amistadi S., Maule G., Ciciani M. et al. Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor. *Mol. Ther.* 2023; 31 (6): 1647–1660. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.03.004.
- Igreja S., Clarke L., Botelho H. Correction of a cystic fibrosis splicing mutation by antisense oligonucleotides. *Hum. Mutat.* 2016; 37 (2): 209–215. DOI: 10.1002/humu.22931.

Поступила: 09.08.24
Принята к печати: 08.11.24

References

- Clinical and functional translation of CFTR. Available at: <https://cfr2.org/> [Accessed: September 25, 2024].
- Persico I., Feresin A., Faleschini M. et al. Things come in threes: a new complex allele and a novel deletion within the CFTR gene complicate an accurate diagnosis of cystic fibrosis. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2022; 10 (6): e1926. DOI: 10.1002/mgg3.1926.
- Santos L., Nascimento R., Duarte A. et al. Mutation – class dependent signatures outweigh disease – associated processes in cystic fibrosis cells. *Cell Biosci.* 2023; 13 (1): 26. DOI: 10.1186/s13578-023-00975-y.
- Krasovsky S.A., Starinova M.A., Voronkova A.Yu. et al., eds. [Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. 2021]. St. Petersburg: Charitable Foundation “Ostrova”; 2023. Available at: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/registr_systicfibrosis_brochure_19_10.pdf?ysclid=m3fmyk2yuy875238135 (in Russian).
- Cystic Fibrosis Foundation. CFTR modulator therapies. Available at: <https://www.cff.org/managing-cf/cfr-modulator-therapies>
- Deletang K., Taulan-Cadars M. Splicing mutations in the CFTR gene as therapeutic targets. *Gene Ther.* 2022; 29 (7-8): 399–406. DOI: 10.1038/s41434-022-00347-0.
- Dos Anjos F., Wruck J., do Carmo T. et al. Pancreatic Insufficiency in a Child with p.Gly542* and c.2657+5G>a heterozygote CFTR: a case report. *Clin. Med. Res.* 2022; 20 (1): 46–51. DOI: 10.3121/cmr.2022.1618.
- Kalydeco. Who Kalydeco is for. Available at: <https://www.kalydeco.com/who-kalydeco>

9. Symdeko. Who Symdeko is for. Available at: <https://www.symdeko.com/who-symdeko-is-for>
10. Muilwijk D., de Poel E., van Mourik P. et al. Forskolin-induced organoid swelling is associated with long-term cystic fibrosis disease progression. *Eur. Respir. J.* 2022; 60 (2): 2100508. DOI: 10.1183/13993003.00508-2021.
11. Lopes-Pacheco M. CFTR modulators: the changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front. Pharmacol.* 2020; 10: 1662. DOI: 10.3389/fphar.2019.01662.
12. Bengtson C., Silswal N., Baumlín N. et al. The CFTR amplifier nesolacofor rescues TGF- β 1 inhibition of modulator-corrected F508del CFTR function. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23 (18): 10956. DOI: 10.3390/ijms231810956.
13. Melyanovskaya J., Kondratyeva E., Kutsev S. Determination of reference values for the method of intestinal current measurement in the Russian Federation. *Med. News North Caucasus.* 2020; 15 (2). DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039.
14. 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.
15. de Winter-de Groot K.M., Berkers G., Marck-van der Wilt R.E.P. et al. Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations. *J. Cyst. Fibros.* 2020; 19 (4): 614–619. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.10.022.
16. Melyanovskaya L.Yu., Kondratyeva E.I., Kutsev S. I. [Determination of reference values for the method of determining the difference in intestinal potentials in the Russian Federation]. *Meditinskii vestnik Severnogo Kavkaza.* 2020; 15: 162–166. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039 (in Russian).
17. Guimbellot J., Sharma J., Rowe S. Toward inclusive therapy with CFTR modulators: progress and challenges. *Pediatr. Pulmonol.* 2017; 52 (Suppl. 48): S4–14. DOI: 10.1002/ppul.23773.
18. Clancy J., Szczesniak R., Ashlock M. et al. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS ONE.* 2013; 8 (9): e73905. DOI: 10.1371/journal.pone.0073905.
19. Vonk A., van Mourik P., Ramalho A. 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.
20. Boj S., Vonk A., 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. Melyanovskaya Yu.L. [Molecular epidemiology of cystic fibrosis in the Russian Federation and a comprehensive assessment of the pathogenetic role of CFTR gene variants based on studying the function of epithelial ion channels (ENaC, CFTR, CaCCs)]. Dis. Moscow; 2023 (in Russian).
22. Highsmith W., Burch L., Zhou Z. et al. Identification of a splice site mutation (2789 + 5G>A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis. *Hum. Mutat.* 1997; 9 (4): 332–338. DOI: 10.1002/(sici)1098-1004(1997)9:4%3C332::aid-humu5%3E3.0.co;2-7
23. Dörk T., Mekus F., Schmidt K. et al. Detection of more than 50 different CFTR mutations in a large group of German cystic fibrosis patients. *Hum. Genet.* 1994; 94 (5): 533–542. DOI: 10.1007/BF00211022.
24. Duguépéroux I., De Braekeleer M. The CFTR 3849+10kbC->T and 2789+5G->A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur. Respir. J.* 2005; 25 (3): 468–473. DOI: 10.1183/09031936.05.10100004.
25. Van Barneveld A., Stanke F., Claass A. et al. CFTR protein analysis of splice site mutation 2789+5G->A. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7 (2): 165–167. DOI: 10.1016/j.jcf.2007.07.007.
26. Bell S., De Boeck K., Amaral M. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol. Therapeutics.* 2015; 145: 19–34. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.005.
27. Masvidal L., Igreja S., Ramos M. et al. Assessing the residual CFTR gene expression in human nasal epithelium cells bearing CFTR splicing mutations causing cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014; 22 (6): 784–791. DOI: 10.1038/ejhg.2013.238.
28. Pranke I., Golec A., Hinzpeter A. et al. Emerging therapeutic approaches for cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 121. DOI: 10.3389/fphar.2019.00121.
29. Tümmeler B. Post-approval studies with the CFTR modulators Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor. *Front. Pharmacol.* 2023; 14: 1158207. DOI: 10.3389/fphar.2023.1158207.
30. Hanger S., Felton I., Ukör E. et al. The effectiveness of CFTR modulators in people with CF and rare mutations: a real-world study. *Pediatr. Pulmonol.* 2024; 59 (1): 221–224. DOI: 10.1002/ppul.26713.
31. Amistadi S., Maule G., Ciciani M. et al. Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor. *Mol. Ther.* 2023; 31 (6): 1647–1660. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.03.004.
32. Igreja S., Clarke L., Botelho H. Correction of a cystic fibrosis splicing mutation by antisense oligonucleotides. *Hum. Mutat.* 2016; 37 (2): 209–215. DOI: 10.1002/humu.22931.

Received: August 09, 2024

Accepted for publication: November 08, 2024

Информация об авторах / Authors Information

Краснова Мария Геннадьевна — аспирант, 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: krasnova.m.g.0605@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2195-3025>)

Maria G. Krasnova, Postgraduate Student, 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: krasnova.m.g.0605@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2195-3025>)

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 research scientist of Stem cell genetics laboratory, 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>)

Мельяновская Юлия Леонидовна — к. м. н., старший научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Федерального государ-

ственного 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: melcat@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>)

Yuliya L. Melyanovskaya, Candidate of Medicine, Senior 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: melcat@mail.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 муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; врач-пульмонолог отделения респираторной медицины Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени С.С.Юдина Департамента здравоохранения города Москвы»; тел.: (926) 273-76-34; e-mail: sa_krasovsky@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9642-0947>)

Stanislav A. Krasovskiy, Candidate of Medicine, Senior Researcher, Laboratory of Cystic Fibrosis, Federal State Budgetary Institution “Pulmonology Scientific Research Institute” under Federal Medical and Biological Agency of Russian Federation; Leading 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; Pulmonologist, Department of Respiratory Medicine, Moscow State Budgetary Healthcare Institution “Moscow City Hospital named after S.S.Yudin”, Moscow Healthcare Department; tel.: (926) 273-76-34; e-mail: sa_krasovsky@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9642-0947>)

Мокроусова Диана Олеговна, 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: diana-mok2000@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2066-0009>)

Diana O. Mokrousova, 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: diana-mok2000@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2066-0009>)

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, Stem Cell Genetics Laboratory, 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>)

Булaltenko Наталья Вадимовна — 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
Natalya 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

Кондратьева Елена Ивановна — д. м. н., профессор, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза, заведующая кафедрой генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (499) 324-15-01; e-mail: elenafpk@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>)

Elena I. Kondratyeva, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Head of the Department of Genetics of Respiratory System Diseases, Institute of Higher and Additional Professional Education, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; (499) 324-15-01; e-mail: elenafpk@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>)

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 Stem Cell Genetics Laboratory, 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

Ефремова А.С. — дизайн экспериментов с культурами органоидов, оценка полученных результатов, редактирование рукописи

Мельяновская Ю.Л. — дизайн экспериментов методом ОРКП, анализ полученных результатов, оформление рисунков, написание рукописи

Красовский С.А. — описание клинической картины, сбор данных и их интерпретация, написание и редактирование рукописи

Мокроусова Д.О. — проведение экспериментов на кишечных органоидах, количественный анализ результатов

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

Булaltenko Н.В. — проведение экспериментов на кишечных органоидах

Кондратьева Е.И. — описание клинической картины, сбор данных и их интерпретация, 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 the experiments on intestinal organoids, quantitative analysis of the results, design of the figures, writing and editing the manuscript

Efremova A.S. — design of the experiments with organoid cultures, evaluation of the results, editing the manuscript

Melyanovskaya Yu.L. — design of the ICM experiments, analysis of the results, figure's design, writing the manuscript

Krasovskiy S.A. — description of the clinical picture, data collection and interpretation, writing and editing the manuscript

Mokrousova D.O. — conducting the experiments on intestinal organoids, quantitative analysis of the results

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

Bulatenko N.V. — conducting the experiments on intestinal organoids

Kondratyeva E.I. — clinical description, data collection and interpretation, manuscript editing

Goldshtein D.V. — management at all stages of the work, manuscript editing

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