

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc624124>

Персонализированная оценка эффективности таргетных препаратов для терапии муковисцидоза у пациента с редкими вариантами гена *CFTR* с.264_268delATATT и с.3139+1G>C

А.С. Ефремова, В.Д. Шерман, Ю.Л. Мельяновская, Д.О. Мокроусова, М.Г. Краснова,
Н.В. Булатенко, Т.Б. Бухарова, О.В. Махнач, А.А. Алимов, Д.В. Гольдштейн, Е.И. Кондратьева

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Актуальность. При обнаружении у пациентов с муковисцидозом новых, чаще всего редких, вариантов гена *CFTR* применяют метод кишечных органоидов, который позволяет оценить остаточную функциональную активность *CFTR*-канала и действие таргетных препаратов для определения возможности дальнейшей патогенетической терапии. Проведение клинических исследований эффективности таргетных препаратов у пациентов с редкими вариантами гена *CFTR* является дорогостоящим, а группы их крайне малочисленны. Форсколиновый тест на кишечных органоидах пациента позволяет осуществить персонализированный подход при изучении редких или даже единичных вариантов гена *CFTR*.

Цель исследования — на культуре кишечных органоидов, полученной от пациентки с двумя редкими вариантами гена *CFTR* с.264_268delATATT и с.3139+1G>C изучить влияние *CFTR*-потенциатора ивакафтора, а также ивакафтора в сочетании с *CFTR*-корректорами лумакафтором, тезакафтором и элексакафтором на восстановление функциональной активности *CFTR*-канала.

Материалы и методы. Для оценки активности *CFTR*-канала применяли форсколиновый тест на кишечных органоидах и метод определения разницы кишечных потенциалов, проводили описание клинической картины у пациентки с генотипом с.264_268delATATT/с.3139+1G>C.

Результаты. *In vitro* показано, что генетические варианты с.264_268delATATT и с.3139+1G>C приводят к полной утрате функционального белка *CFTR*, при этом *CFTR*-модуляторы не оказывают положительного эффекта и не обеспечивают восстановления данного белка, в отличие от F508del/F508del-контроля. Тяжесть течения заболевания у ребёнка согласуется с результатами функциональных тестов.

Заключение. Оба исследованных варианта гена *CFTR* относятся к «тяжёлым» и вызывают полную потерю активности хлорного канала *CFTR*. Для вариантов с.264_268delATATT и с.3139+1G>C не обнаружены эффективные *CFTR*-модуляторы, поэтому в данном случае не может быть рекомендована таргетная терапия.

Ключевые слова: муковисцидоз; редкие варианты гена *CFTR*; кишечные органоиды; таргетная терапия.

Как цитировать:

Ефремова А.С., Шерман В.Д., Мельяновская Ю.Л., Мокроусова Д.О., Краснова М.Г., Булатенко Н.В., Бухарова Т.Б., Махнач О.В., Алимов А.А., Гольдштейн Д.В., Кондратьева Е.И. Персонализированная оценка эффективности таргетных препаратов для терапии муковисцидоза у пациента с редкими вариантами гена *CFTR* с.264_268delATATT и с.3139+1G>C // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 2. С. 265–277. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc624124>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc624124>

Personalized assessment of the effectiveness of targeted drugs for the treatment of cystic fibrosis in a patient with c.264_268delATATT and c.3139+1G>C rare variants of the *CFTR* gene

Anna S. Efremova, Viktoria D. Sherman, Yuliya L. Melyanovskaya, Diana O. Mokrousova, Maria G. Krasnova, Nataliya V. Bulatenko, Tatiana B. Bukharova, Oleg V. Makhnach, Andrey A. Alimov, Dmitry V. Goldshtein, Elena I. Kondratyeva

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: When new, most often rare *CFTR* gene variants, are detected in patients with cystic fibrosis, intestinal organoids are used, which allows for the assessment of the residual functional activity of the CFTR channel and the effect of targeted drugs to determine the possibility of further pathogenetic therapy. Clinical trials of the effectiveness of the targeted drugs in patients with rare *CFTR* variants are expensive, and patient groups are extremely small. A forskolin-induced swelling assay on a patient's intestinal organoids allows for a personalized approach when studying rare or even single *CFTR* variants.

AIM: To examine the effect of the CFTR potentiator ivacaftor and the combination of ivacaftor with the CFTR correctors lumacaftor, tezacaftor, and elxacaftor on the restoration of CFTR channel functions on a culture of intestinal organoids obtained from a patient with two rare *CFTR* variants c.264_268delATATT and c.3139+1G>C.

MATERIALS AND METHODS: To assess the activity of the CFTR channel, the forskolin-induced swelling assay on organoids and intestinal current measurements on rectal biopsy samples method were used. The clinical picture of a patient with the c.264_268delATATT/c.3139+1G>C genotype was described.

RESULTS: *In vitro*, the genetic variants c.264_268delATATT and c.3139+1G>C lead to a complete loss of the functional CFTR protein, whereas CFTR modulators do not positively affect and do not lead to the restoration of CFTR function, in contrast from F508del/F508del control. The disease severity in a child is consistent with the results of functional tests.

CONCLUSION: Both *CFTR* variants are classified as "severe" and cause a complete loss of chloride channel activity. No effective CFTR modulators were found for the c.264_268delATATT and c.3139+1G>C variants; thus, targeted therapy cannot be recommended to the patient.

Keywords: cystic fibrosis; rare variants of the *CFTR* gene; intestinal organoids; targeted therapy.

To cite this article:

Efremova AS, Sherman VD, Melyanovskaya YuL, Mokrousova DO, Krasnova MG, Bulatenko NV, Bukharova TB, Makhnach OV, Alimov AA, Goldshtein DV, Kondratyeva EI. Personalized assessment of the effectiveness of targeted drugs for the treatment of cystic fibrosis in a patient with c.264_268delATATT and c.3139+1G>C rare variants of the *CFTR* gene. *Genes & cells*. 2024;19(2):265–277. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc624124>

Received: 30.11.2023

Accepted: 19.02.2024

Published online: 30.05.2024

ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз представляет собой генетическое заболевание, возникающее при наличии патогенных вариантов в гене *CFTR* на обеих родительских хромосомах, в результате продукт гена — трансмембранный белок CFTR — либо не образуется, либо образуется в недостаточном количестве или с нарушенной функциональной активностью [1]. Муковисцидоз в зависимости от сохранности остаточной функциональной активности CFTR-канала и возраста пациента приводит к развитию полисистемных нарушений и может вызывать прогрессирующие бронхоэктазы, эндокринную и внешнесекреторную недостаточность поджелудочной железы, синдром дистальной кишечной непроходимости, дисфункцию печени и другие нарушения [2].

В 2012 году для патогенетической терапии муковисцидоза Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам был одобрен CFTR-модулятор ивакафтор (VX-770) для пациентов с вариантом G551D [3]. CFTR-модуляторы — низкомолекулярные вещества, которые взаимодействуют с определёнными сайтами белка CFTR либо во время (корректоры), либо после процессинга белка (потенциаторы). Ивакафтор является потенциатором, он связывается с CFTR-каналом и увеличивает время, в течение которого канал находится в открытой конфигурации, тем самым повышая активность переноса ионов через мембрану эпителиальных клеток [4]. Препараты такого действия особенно эффективны при вариантах CFTR классов III и IV, где первичный дефект связан с нарушением регуляции ионного канала, а не со снижением количества белка [1]. Корректоры способствуют правильному фолдингу, процессингу дефектного белка и его транспорту к апикальной мембране эпителиальной клетки и особенно эффективны при вариантах II класса. В состав зарегистрированных FDA на 2023 год комбинированных таргетных препаратов для пациентов с муковисцидозом входят три корректора: лумакафтор (VX-809), тезакафтор (VX-661), элексакафтор (VX-445). Корректоры в составе лекарственных препаратов используются в сочетании с ивакафтором (VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 и VX-770+VX-661+VX-445) [5].

В данной работе на модели кишечных органоидов проведено исследование влияния таргетных препаратов на восстановление функционального белка CFTR у пациентки с редким генотипом c.264_268delATATT/c.3139+1G>C.

Генетические варианты c.264_268delATATT и c.3139+1G>C описаны в национальном Регистре пациентов с муковисцидозом 2020 года [6] (далее — Регистр). c.264_268delATATT p.(Leu88Phefs*21) представляет собой делецию пяти нуклеотидов (c.264_268delATATT) в 3-м экзоне гена *CFTR*. По данным Регистра, частота мутации c.264_268delATATT составляет 0,01%; это значит, что она

встречается только у данного пациента с муковисцидозом. В базе CFTR2 (<https://cftr2.org/>) этот вариант нуклеотидной последовательности не описан. Вторая мутация в генотипе пациента является интронной: при мутации c.3139+1G>C происходит однонуклеотидная замена гуанина на цитозин в 19-м интроне гена *CFTR*, которая вызывает нарушение сплайсинга мРНК. По данным Регистра [6], частота мутации c.3139+1G>C составляет 0,03% (встречается у двух пациентов). В базе CFTR2 этот вариант нуклеотидной последовательности также не описан. Потенциальный эффект от применения CFTR-модуляторов ожидался за счёт влияющего на сплайсинг варианта c.3139+1G>C, поскольку c.264_268delATATT приводит к сдвигу рамки считывания.

Функциональная активность CFTR-канала оценена с применением кишечных органоидов и метода определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП). Метод кишечных органоидов специально разработан для изучения функции CFTR-канала, а также успешно применяется для персонализированной оценки влияния CFTR-модуляторов на восстановление функционального белка CFTR у пациентов с муковисцидозом, в том числе с редкими вариантами гена *CFTR* [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

Обследована девочка 2010 г.р. с диагнозом «муковисцидоз, смешанная форма, E84,8, тяжёлое течение». Генетический диагноз — c.264_268delATATT/c.3139+1G>C. Диагноз установлен согласно критериям ECFS и Клиническим рекомендациям [8]. Пациентка наблюдается в Научно-исследовательском клиническом институте детства Министерства здравоохранения Московской области (НИКИ детства, г. Мытищи, Московская область). В группы сравнения входили 5 пациентов с муковисцидозом, несущих генотип F508del/F508del, и 18 здоровых добровольцев (wt/wt *CFTR*). Участники исследования или их законные представители (в случае, если участники младше 15 лет) подписали информированное добровольное согласие. Исследования и форма информированного добровольного согласия были одобрены Комитетом по этике ФГБНУ «МГНЦ имени академика Н.П. Бочкова» 15.10.2018 г.

Получение биопсийного материала

Для обследования методом ОРКП и методом кишечных органоидов получали биоптаты прямой кишки у пациентов с муковисцидозом или здоровых добровольцев. Забор биоптатов проводили с применением оборудования EndoJaw Disposable Biopsy Forceps (model #FB-230U; Olympus, США) согласно инструкции. Размер биоптата составлял 3–5 мм. У пациентки с исследуемым генотипом c.264_268delATATT/c.3139+1G>C и у одного из пяти

пациентов с генотипом F508del/F508del проводили забор шести биоптатов (3 — для ОРКП и 3 — для получения кишечных органоидов), у остальных пациентов с генотипом F508del/F508del и у всех здоровых добровольцев выполняли забор трёх биоптатов для ОРКП.

Метод определения разницы кишечных потенциалов

Для диагностики муковисцидоза и оценки функции ионных каналов использовали метод ОРКП [9–11]. Исследование по этому методу выполнено согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 (СОПам) [12, 13] по следующему алгоритму. На первом этапе проводится калибровка каждой рециркуляционной камеры в отдельности на приборе VCC MC 8B421 (Physiologic Instrument, США). На втором этапе, после калибровки прибора, в камеру помещается ректальный биопсийный материал в специальном слайдере. Камеры заполняются буфером Meyler. Буфер готовится непосредственно перед исследованием и состоит из 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-глюкозы, а также 0,01 мМ индометацина. Регистрацию исследования начинали с записи базального тока короткого замыкания (мкА/см²) (стадия пре-амилорид).

На третьем этапе добавляли стимуляторы в следующей последовательности: амилорид* 100 мкмоль (натриевый канал), форсколин/IBMX 10/100 мкмоль (хлорный канал), гинестеин 10 мкмоль (хлорный канал), карбахол* 100 мкмоль (кальциевый канал), DIDS 200 мкмоль (анионный транспорт) и в конце — гистамин 500 мкмоль (кальциевый канал). Исследование заканчивали после записи базального тока короткого замыкания. В группу контроля (отрицательный контроль) вошли 18 здоровых добровольцев, в группу сравнения (положительный контроль) — 5 пациентов с муковисцидозом, носителей варианта F508del в гомозиготном состоянии (отсутствие комплексных аллелей подтверждено секвенированием) [9].

Получение кишечных органоидов

При получении культур кишечных органоидов и выполнении форсколинового теста за основу были взяты протоколы, разработанные под руководством Д. Бекмана [14–16].

Линия L-фибробластов мыши, трансфицированная Wnt-3A-экспрессирующим вектором, и линия клеток HEK293, трансфицированная Noggin-экспрессирующим вектором, были любезно предоставлены Д. Бекманом для получения кондиционированных сред с факторами роста [16]. Источником фактора роста R-spondin-1 была линия клеток HEK293T–R-spondin-1 mFc, трансфицированная соответствующим вектором (SCC111; Merck

Millipore S.A.S., Франция). Для получения кондиционированных сред, обогащённых ростовыми факторами, использовали среда DMEM + GlutaMax, среда Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США); эмбриональная телячья сыворотка (PAA Laboratories, Австрия); зеоцин* и G418 (Thermo Fisher Scientific, США); пенициллин/стрептомицин, 1 М HEPES Na-соль, L-глутамин, PBS, 0,25% трипсин («ПанЭко», Россия); TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, США); флаконы для культивирования клеток с фильтром T175, чашки Петри диаметром 150 мм, серологические пипетки, пробирки стерильные центрифужные 15 мл (Corning, США); пробирки 50 мл (SPL Life Sciences, Корея). Подробно метод получения кондиционированных сред описан в работе [16].

Среда для культивирования органоидов содержала Wnt-3A-, Noggin- и R-spondin-1-кондиционированные среды (50, 10 и 20% соответственно); Advanced DMEM/F12 (18%; Thermo Fisher Scientific, США); mEGF (50 нг/мл; ProSpec, Израиль); B27 (2%; Life Technologies, Gibco, США); 1,25 мМ N-ацетилцистеина и 10 мМ никотинамида (Sigma-Aldrich, США); A83-01 (5 мкМ; Tocris Bioscience, Великобритания); SB 202190 (10 мкМ; Sigma-Aldrich, США); примоцин* (100 мкг/мл; InvivoGen, США) [15, 17].

Методы получения крипт из ректальных биоптатов и пассирования органоидов подробно представлены в статьях [15, 16, 18].

Получены две культуры кишечных органоидов: органоиды пациентки с исследуемым генотипом c.264_268delATATT/c.3139+1G>C, а также контрольная культура от пациента с генотипом F508del/F508del. Для получения культуры органоидов от одного пациента достаточно трёх ректальных биоптатов. Биоптаты последовательно промывали средой Advanced DMEM/F12 и раствором PBS, затем инкубировали с раствором 10 мМ ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, США). По завершении инкубации проводили ресуспендирование с целью высвобождения отдельных крипт из массива ткани. Осадок крипт смешивали с Матригелем* (Corning, США), затем высевали в культуральные планшеты. Органоиды пересеивали раз в неделю. Для этого удаляли ростовую среду из всех лунок, механически разрушали капли Матригеля, а затем механически дробили органоиды на фрагменты меньшего размера. Полученную суспензию осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 130 g и +4 °C. Осадок органоидов смешивали с Матригелем и высевали на планшеты. Замену среды криптам и органоидам проводили один раз в 2–3 дня.

Форсколиновый тест на кишечных органоидах

Оценку влияния таргетных препаратов проводили с использованием форсколинового теста на кишечных органоидах. За день до теста кишечные органоиды высевали в каплях Матригеля в 96-луночные планшеты, на этом

* здесь и далее — препарат не зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств РФ.

этапе в соответствующие лунки добавляли корректоры VX-809 (лумакафтор), VX-661 (тезакафтор), VX-445 (элексакафтор) — все в концентрации 3,5 мкМ (Selleckchem, США). Обработке форсколином (Sigma-Aldrich, США) предшествовала стадия 30-минутного окрашивания кальцеином (0,84 мкМ; Biotium, США). Потенциатор VX-770 (3,5 мкМ; Selleckchem, США) добавляли одновременно с форсколином. Кишечные органоиды инкубировали с форсколином и таргетными препаратами в течение 1 ч и одновременно осуществляли съёмку «фиксированных» полей с 10-минутным интервалом на флуоресцентном микроскопе Axio Observer 7 (Zeiss, Германия). Каждый эксперимент повторяли три раза, число повторов для каждого образца в рамках одного эксперимента (*n*) составляло 6–8. Количественный анализ набухания органоидов проводили при помощи программы Image J, статистическую обработку полученных данных — с помощью программы Sigma Plot 12.5. В качестве контроля использовали культуру органоидов, полученную от пациента с генотипом F508del/F508del (с.1521_1523delCTT/с.1521_1523delCTT). Все этапы культивирования проводили при 37 °C и 5% CO₂.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая картина

Ребёнок 2010 г.р. наблюдается в НИКИ детства (г. Мытищи, Московская область) с клиническим диагнозом «муковисцидоз, смешанная форма, E84,8, тяжёлое течение. Хронический гнойно-обструктивный бронхит. Двусторонние бронхоэктазы. Дисковидный ателектаз S5 слева. ДН 0–I степени. Хроническая панкреатическая недостаточность». Осложнения: белково-энергетическая недостаточность (БЭН) II степени; цирроз печени (F4 по METAVIR); печёночно-клеточная недостаточность, тип A по Чайлду–Пью; портальная гипертензия; варикозное расширение вен пищевода G2; спленомегалия; тромбоцитопения. Микробиологический диагноз — хронический высев *Pseudomonas aeruginosa*. Генетический диагноз — с.264_268delATATT/с.3139+1G>C.

Диагноз «муковисцидоз» установлен в возрасте 3 мес на основании положительного результата неонатального скрининга, подтверждён показателем потовой пробы (проводимость пота эквивалентна 107 ммоль/л NaCl). По результатам многоэтапного молекулярно-генетического исследования (поиск частых мутаций в гене *CFTR*, секвенирование гена, поиск крупных делеций и дупликаций) выявлено 2 генетических варианта: с.264_268delATATT/с.3139+1G>C. Оба варианта не описаны в международных базах данных (CFTR1, CFTR2).

Пациентка наблюдается регулярно в НИКИ детства с момента установки диагноза. Течение заболевания в раннем возрасте стабильное. Отмечены обострения хронического бронхита 4–6 раз в год на фоне респираторных инфекций. В ноябре 2014 года произведён первый высев

P. aeruginosa, с 2015 году высев *P. aeruginosa* носил интермиттирующий характер, с 2019 — хронический. С 2019 года отмечается резкое ухудшение состояния; увеличение частоты обострений бронхолёгочного процесса с резко отрицательной динамикой рентгенологической картины, потребовавших госпитализаций; развитие осложнений в виде кровохаркания. Потребовалось проведение комплексной терапии, включая длительные курсы антибактериальных препаратов, назначение глюкокортикоидов, гемостатической терапии.

В 2020 году у пациентки диагностирован цирроз печени, варикозное расширение вен пищевода. С 2022 года она наблюдается в Национальном медицинском исследовательском центре трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова.

С учётом тяжёлого, прогрессирующего течения муковисцидоза у ребёнка, полиорганного характера поражения, а также отсутствия информации о генетических вариантах, выявленных при молекулярно-генетической диагностике, было решено провести исследование остаточной функциональной активности CFTR-канала с помощью метода ОРКП и на модели кишечных органоидов, а также определить чувствительность к CFTR-модуляторам.

Состояние пациентки на момент осмотра в возрасте 11 лет 7 мес: вес — 34,3 кг, рост — 147,8 см, ИМТ — 15,7 (15,5-й перцентиль). Состояние тяжёлое по заболеванию, при этом самочувствие практически не страдает. Дыхание через нос затруднено, одышки нет. Аускультативно: в лёгких дыхание проводится во все отделы, равномерно, хрипов нет. Границы сердца — в пределах нормы; тоны ясные, ритмичные; пульс — 96 ударов в минуту, ритмичный; Sat O₂ — 97%. Живот увеличен в объёме, вздут, доступен глубокой пальпации, безболезненный. Печень +1+2+в/3 см, край плотный; селезёнка +1 см из-под края рёберной дуги по среднеключичной линии. Напряжения мышц живота, напряжения брюшины нет, кишечник при пальпации безболезненный. Стул — 1–2 раза в день, плотный, по типу овечьего, на фоне приёма лактулозы — нормальный, видимой стеатореи нет. Мочеиспускание свободное, безболезненное.

Результаты лабораторного и инструментального обследования

Клинический анализ крови: лейкоциты — $10,6 \times 10^9/\text{л}$, эритроциты — $5,05 \times 10^{12}/\text{л}$, тромбоциты — $101 \times 10^9/\text{л}$. При УЗИ органов брюшной полости наблюдаются признаки выраженных генерализованных изменений структур печени (цирротическая трансформация, портальная гипертензия), спленомегалия, гипоплазия желчного пузыря. На копрограмме нейтрального жира нет.

Компьютерная томография органов грудной полости выявила объёмное уменьшение средней доли правого лёгкого и дисковидный ателектаз слева, бронхоэктазы верхней доли справа. При компьютерной томографии околоносовых пазух обнаружен полисинусит.

При проведении спирометрии установлены: форсированная жизненная емкость лёгких — 1,97 л (76%), объём форсированного выдоха за 1 с — 1,79 л (81%). При посеве мокроты отмечен рост *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

Проводимая терапия

Пациентке проведена заместительная ферментная терапия, назначены гастро- и гепатопротекторы, витаминотерапия, ингаляционная муколитическая и антибактериальная терапия, пробиотики, кинезитерапия.

Оценка функциональной активности ионных каналов с помощью метода определения разницы кишечных потенциалов

Критерием оценки функциональной активности ионных каналов при ОРКП является показатель плотности тока короткого замыкания (ΔI_{SC}). Ранее в работе Ю.Л. Мельяновской с соавт. [9] при валидации метода ОРКП были определены референсные значения ответов на амилорид, форсколин, карбахол и гистамин для контрольных групп — wt/wt *CFTR* и F508del/F508del. При воздействии амилорида (ингибирование ENaC) кривая всегда меняется в отрицательную сторону и у пациентов с муковисцидозом, и у здоровых добровольцев, при этом у пациентов с муковисцидозом ответ более выражен. Ответ на форсколин (активация CFTR-канала) у пациентов с мутациями *CFTR* I–III классов отсутствует (менее 5 мкА/см²); у пациентов с мутациями IV–V классов — выше 5 мкА/см², но менее 20 мкА/см² (функция канала снижена); у здоровых добровольцев — более 20 мкА/см². Ответ на карбахол и гистамин у пациентов с муковисцидозом изменяется в отрицательную сторону, что отражает приток ионов калия в клетки, а у здоровых добровольцев — в положительную сторону, что отражает отток калия из клеток.

Пациентке с вновь выявленными вариантами с.264_268delATATT и с.3139+1G>C в генотипе было решено провести исследование методом ОРКП. Результаты показали (табл. 1, рис. 1), что плотность тока короткого замыкания в ответ на введение амилорида (натриевые каналы) составила $-11,83 \pm 5,13$ мкА/см², изменение ΔI_{SC}

в ответ на введение форсколина (хлорные каналы) — $1,17 \pm 0,20$ мкА/см². В ответ на введение карбахола (кальциевые каналы) ΔI_{SC} изменился в отрицательную сторону и составил $7,33 \pm 2,61$ мкА/см². В ответ на введение гистамина (кальциевые каналы) ΔI_{SC} также изменился в отрицательную сторону, что отражает приток ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила $8,33 \pm 3,71$ мкА/см². Данная картина свидетельствует об отсутствии функции хлорного канала.

Анализ полученных показателей (табл. 2) демонстрирует, что у пациентки с генотипом с.264_268delATATT/с.3139+1G>C ответ на амилорид выше, чем в группе отрицательного контроля (см. табл. 2; рис. 2), и ниже, чем в группе положительного контроля (см. табл. 2; рис. 3). Ответ на форсколин — ниже, чем в группах сравнения. Ответ на гистамин у пациентки с генотипом с.264_268delATATT/с.3139+1G>C — ниже, чем в других группах (положительного и отрицательного контроля).

Оценка функциональной активности CFTR-канала с применением форсколинового теста на кишечных органоидах

Из биоптатов кишечника пациентки с уникальным генотипом *CFTR* с.264_268delATATT/с.3139+1G>C получена культура кишечных органоидов. При стимуляции форсколином как в низкой (0,128 мкМ), так и в высокой концентрации (5,0 мкМ) органоиды не отвечали набуханием (рис. 4). Отдельное добавление модуляторов VX-770 (ивакафтор) и VX-809 (лумакафтор) к культуре кишечных органоидов при стимуляции форсколином, а также их совместное использование (VX-770+VX-809) не приводят к восстановлению функции белка CFTR. Неэффективной также оказались комбинации модуляторов VX-770+VX-661 (ивакафтор + тезакафтор) и VX-770+VX-661+VX-445 (ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор) (см. рис. 4; рис. 5).

При стимуляции форсколином контрольной культуры органоидов F508del/F508del (5,0 мкМ) в течение 1 ч наблюдается незначительное набухание органоидов (на 2% по сравнению с исходным размером), что указывает на отсутствие остаточной активности белка CFTR (см. рис. 5;

Таблица 1. Показатель плотности тока короткого замыкания (мкА/см²) при измерении в камере Уссинга трёх биоптатов пациентки с генотипом с.264_268delATATT/с.3139+1G>C

Table 1. Short circuit current density (μA/cm²) when measured in the Ussing chamber of three biopsies of a patient with the genotype с.264_268delATATT/с.3139+1G>C

Биоптат	Амилорид (натриевый канал)	Форсколин (хлорный канал)	Карбахол (кальциевый канал)	Гистамин (кальциевый канал)
№ 1	−19,0	1,5	6,0	8,5
№ 2	−12,0	1,0	11,5	13,5
№ 3	−4,5	1,0	4,5	3,0
М±m для 3 биоптатов пациентки	−11,83±5,13	1,17±0,20	7,33±2,61	8,33±3,71

Примечание: М — среднее значение, m — ошибка среднего значения.
Note: M — average value, m — error of average value.

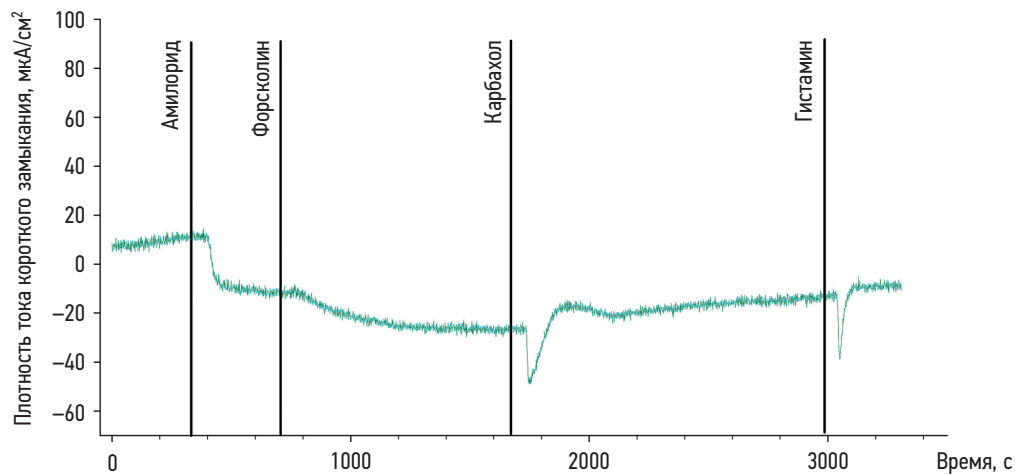


Рис. 1. Результаты измерения плотности тока короткого замыкания для биоптата № 1 пациентки с генотипом с.264_268delATATT/с.3139+1G>C. При введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания, ΔI_{sc} на форсколин отсутствовал, а на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону. Амилорид — натриевый канал, форсколин — хлорный канал, карбахол — кальцевый канал, гистамин — кальцевый канал.

Fig. 1. Results of measuring the ΔI_{sc} for biopsy sample N 1 of a patient with genotype с.264_268delATATT/с.3139+1G>C. In case of amiloride intake, a decrease in the ΔI_{sc} was detected, no response to forskolin and to carbachol and histamine ΔI_{sc} changed to negative. Amiloride — sodium channel, Forskolin — chloride channel, Carbachol — calcium channel, Histamine — calcium channel.

Таблица 2. Показатель плотности тока короткого замыкания ($\mu A/cm^2$) при измерении в камере Уссинга в сравнении с положительным и отрицательным контролем

Table 2. Short circuit current density ($\mu A/cm^2$) measured in the Ussing chamber compared to positive and negative controls

Образцы биопсии	Амилорид (натриевый канал)	Форсколин (хлорный канал)	Карбахол (кальцевый канал)	Гистамин (кальцевый канал)
Пациентка с генотипом с.264_268delATATT/с.3139+1G>C, $M \pm m$	$-11,83 \pm 5,13$	$1,17 \pm 0,20$	$7,33 \pm 2,61$	$8,33 \pm 3,71$
Пациенты с генотипом F508del/F508del (положительный контроль), $M \pm m$	$-15,70 \pm 3,51$	$3,33 \pm 0,63$	—	$17,83 \pm 3,57$
Здоровые добровольцы (отрицательный контроль), $M \pm m$	$-7,67 \pm 1,76$	$26,72 \pm 2,66$	$117,44 \pm 4,32$	$109,76 \pm 8,18$

Примечание: M — среднее значение, m — ошибка среднего значения.
Note: M — average value, m — error of average value.

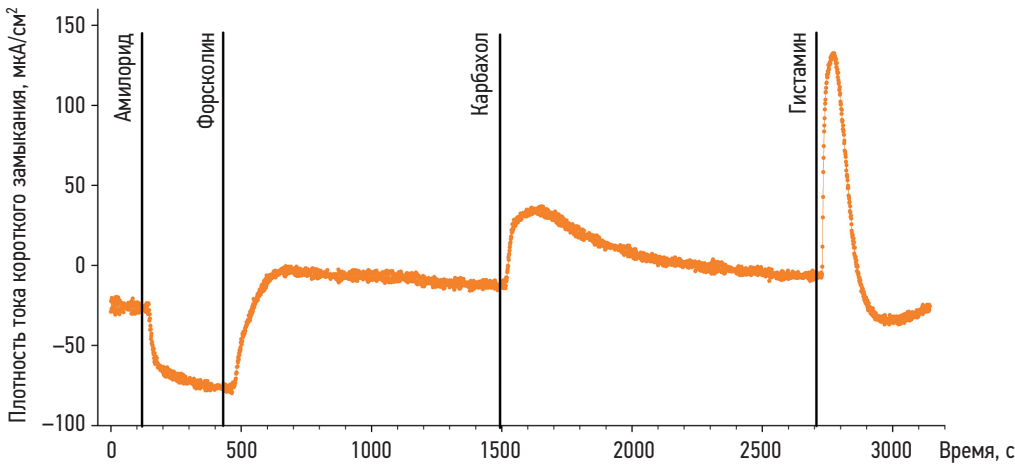


Рис. 2. Результаты измерения плотности тока короткого замыкания у здорового добровольца с функциональным CFTR-каналом (отрицательный контроль). При введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания, в ответ на форсколин — значительное увеличение ΔI_{sc} , а при добавлении карбахола и гистамина отмечено изменение тока короткого замыкания в положительную сторону.

Fig. 2. Results of measuring the ΔI_{sc} in a healthy volunteer with a functional CFTR-channel (a negative control). Incase of amiloride intake, a decrease in the ΔI_{sc} was detected, a response to forskolin ΔI_{sc} increased significantly and to carbachol and histamine ΔI_{sc} changed to positive.

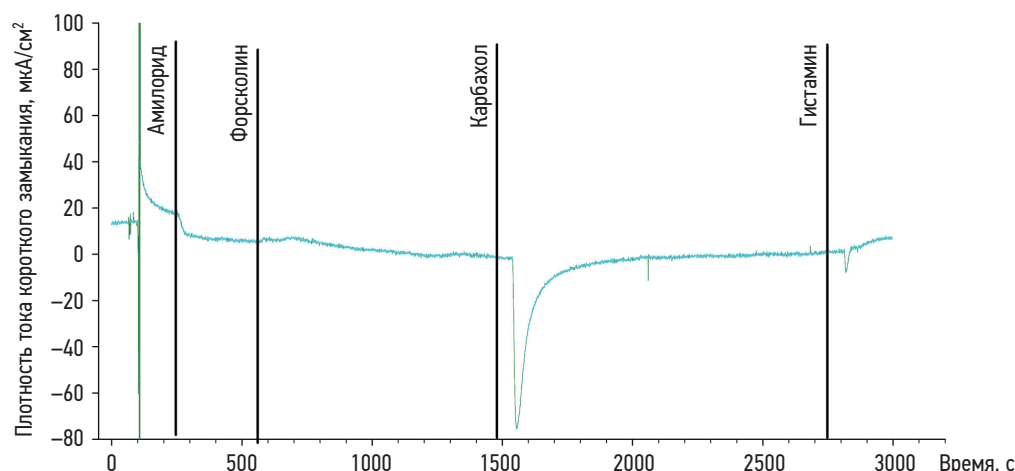


Рис. 3. Результаты измерения плотности тока короткого замыкания у пациента с генотипом F508del/F508del (положительный контроль). При введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания, ΔI_{SC} на форсколин отсутствовал, а на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Fig. 3. Results of measuring the ΔI_{SC} in a patient with F508del/F508del genotype (a positive control). In case of amiloride intake, a decrease in the ΔI_{SC} was detected, no response to forskolin and to carbachol and histamine ΔI_{SC} changed to negative.

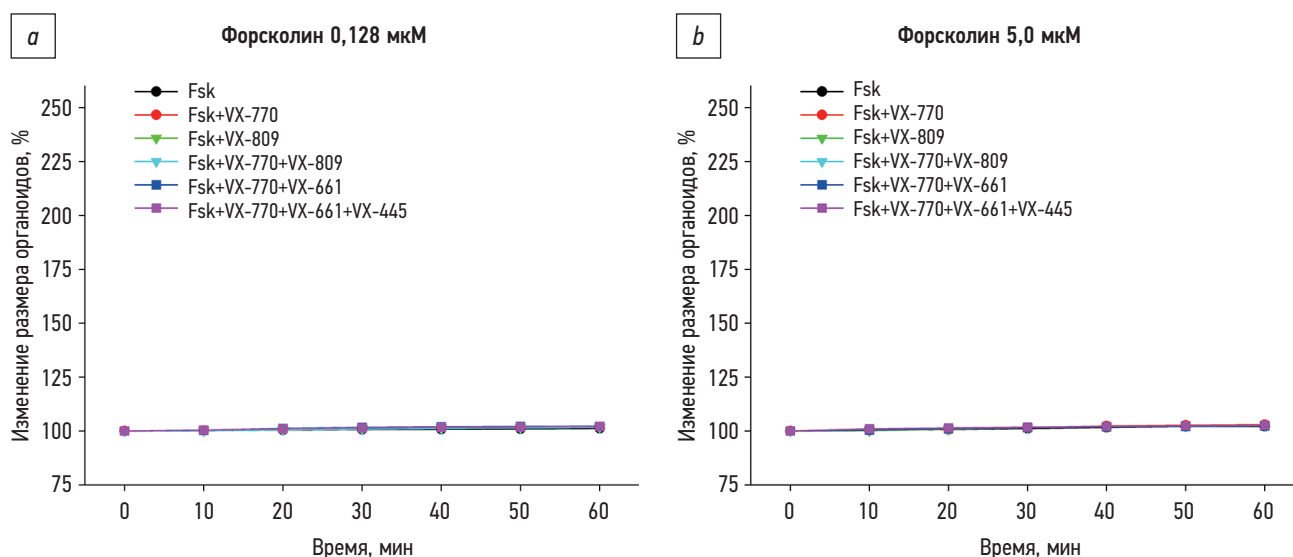


Рис. 4. Количественный анализ набухания органоидов с генотипом c.264_268delATATT/c.3139+1G>C в ответ на стимуляцию форсколином (Fsk) и таргетными препаратами (VX-770 — ивакафтор, VX-809 — лумакафтор, VX-661 — тезакафтор и VX-445 — элексакафтор): *a* — ответы при стимуляции 0,128 мкМ форсколина; *b* — ответы при стимуляции 5,0 мкМ форсколина.

Fig. 4. Quantitative analysis of swelling of organoids with genotype c.264_268delATATT/c.3139+1G>C in response to stimulation with forskolin (Fsk) and targeted drugs (VX-770 — Ivacaftor, VX-809 — Lumacaftor, VX-661 — Tezacaftor and VX-445 — Elexacaftor); *a* — responses upon stimulation with 0.128 μ M forskolin; *b* — responses upon stimulation with 5.0 μ M forskolin.

рис. 6), в этих же условиях VX-770 (ивакафтор) или VX-809 (лумакафтор) вызывают набухание органоидов на 5 и 10% по сравнению с исходным размером (0 мин) соответственно. При совместном действии потенциатора и корректоров наблюдается значительный положительный эффект: увеличение размера на 56% (VX-770+VX-809) и 36% (VX-770+VX-661). При воздействии на органоиды тройным таргетным препаратом VX-770+VX-661+VX-445 (ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор) совместно с 5,0 мкМ форсколина органоиды увеличиваются на 115% (см. рис. 5 и 6). При концентрации форсколина 0,128 мкМ размер органоидов увеличивается на 51%.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время известно более 2000 вариантов гена *CFTR*, причиной муковисцидоза являются лишь патогенные варианты. В данном исследовании комплексно изучен уникальный генотип *CFTR*, включающий сразу два редких варианта: c.264_268delATATT и c.3139+1G>C. Ранний возраст постановки диагноза на основании результатов неонатального скрининга, показатели потовой пробы, панкреатическая недостаточность, нарушение функции лёгких являются основанием для подтверждения патогенности данных вариантов. Оценку остаточной

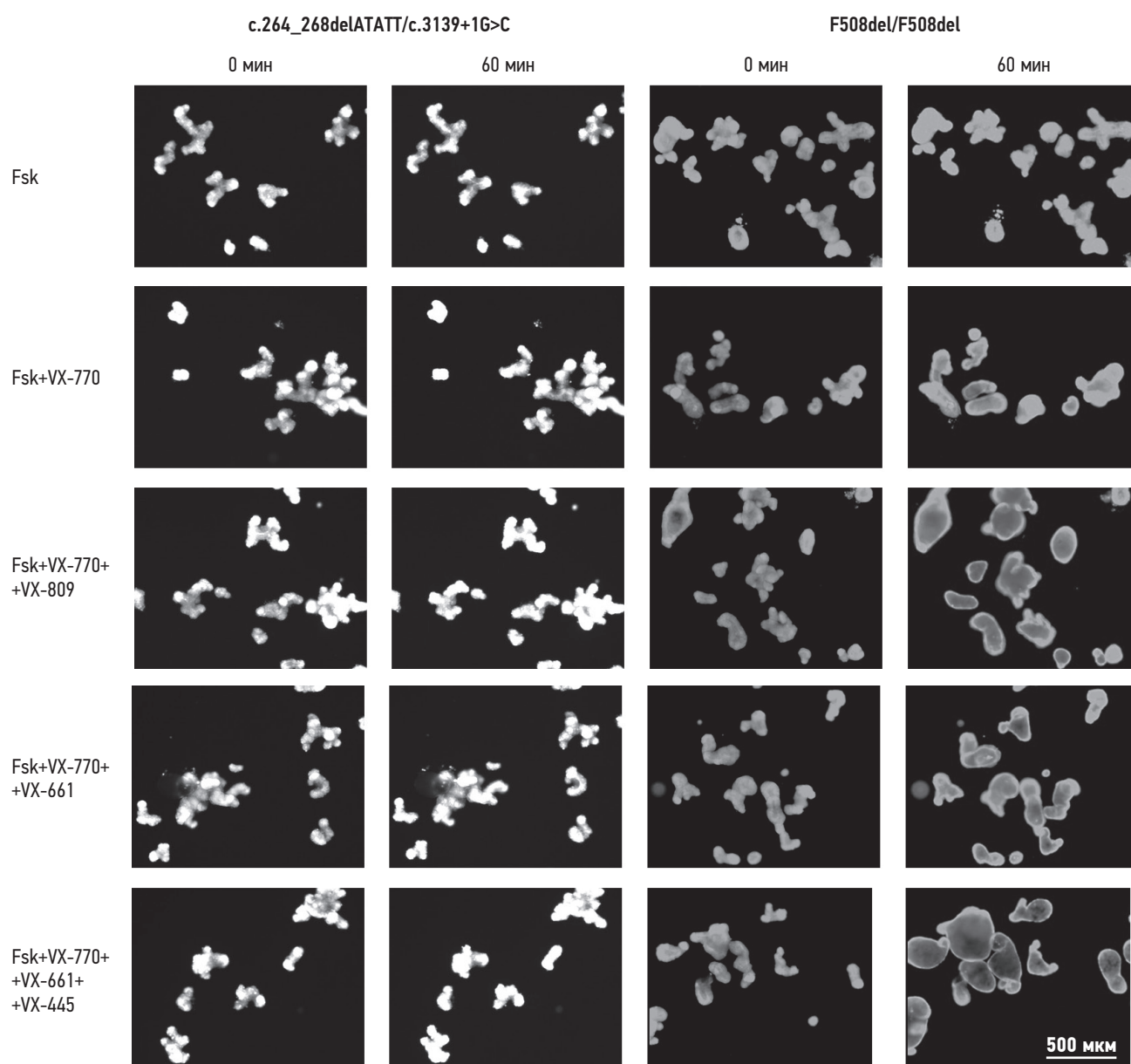


Рис. 5. Характерные изображения исследуемой и контрольной культур кишечных органоидов до воздействия форсколина (5,0 мкМ) и таргетных препаратов (концентрация каждого — 3,5 мкМ) и после завершения обработки. Fsk — форсколин, VX-770 — ивакафтор, VX-809 — лумакафтор, VX-661 — тезакафтор, VX-445 — элексакафтор. Окраска — кальцеин (0,84 мкМ, 30 мин); $\times 5$. **Fig. 5.** Representative images of intestinal organoids before exposure to forskolin (5 μ M) and targeted drugs (concentration of each — 3.5 μ M) and after completion of treatment. Fsk — forskolin, VX-770 — Ivacaftor, VX-809 — Lumacaftor, VX-661 — Tezacaftor, VX-445 — Elexacaftor. Staining — Calcein (0.84 μ M, 30 min); $\times 5$.

функциональной активности CFTR-канала при диагностике муковисцидоза в случае обнаружения новых (часто редких или уникальных) вариантов гена *CFTR* осуществляют при помощи метода ОРКП наряду с потовой пробой. Результаты, полученные методом ОРКП, свидетельствуют об отсутствии функции CFTR-канала и согласуются с клиническими проявлениями муковисцидоза.

Форсколиновый тест на кишечных органоидах, получаемых из собственной ткани пациента, также даёт возможность персонализированного подхода при исследовании остаточной активности белка CFTR и действия CFTR-модуляторов для подбора наиболее эффективной

патогенетической терапии. Обработка кишечных органоидов форсколином вызывает ц-АМФ-зависимую активацию CFTR и их набухание. Степень набухания (ответ на форсколин) отражает сохранность функции белка CFTR при муковисцидозе, а также позволяет оценить действие таргетных веществ [14, 15, 19].

Метод кишечных органоидов без проведения клинических испытаний позволил изучить патогенность комплексных аллелей [20, 21], ряда распространённых [17, 22] и редких для РФ вариантов гена *CFTR* [18] и определить дополнительные показания к назначению таргетных препаратов российским пациентам.

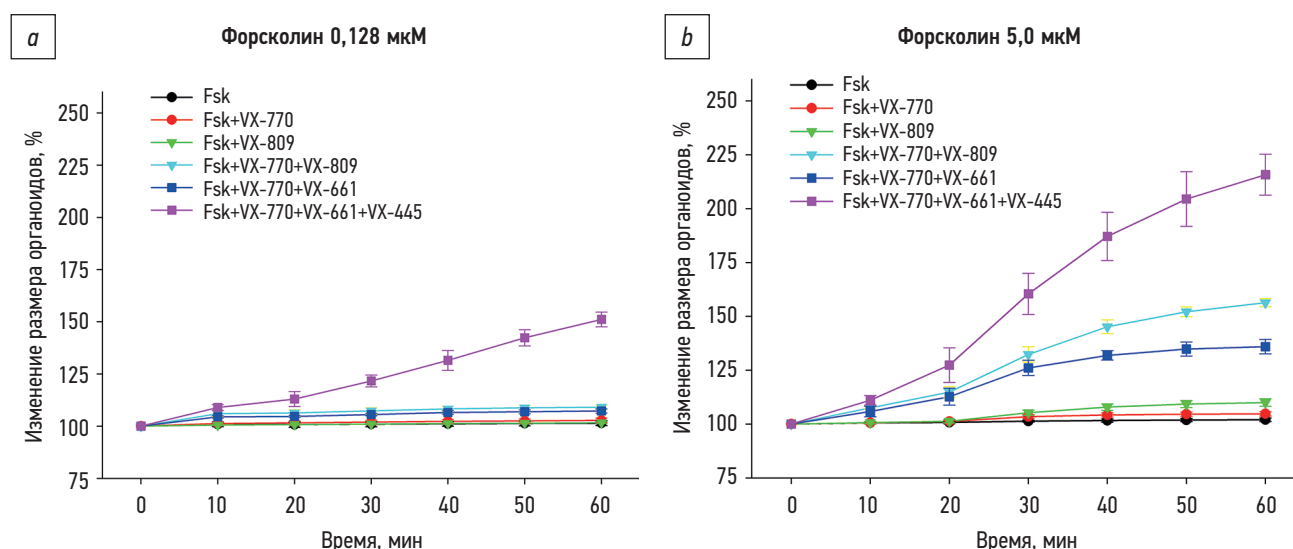


Рис. 6. Количественный анализ набухания контрольной культуры органоидов с генотипом F508del/F508del в ответ на стимуляцию форсколином (Fsk) и таргетными препаратами (VX-770 — ивакафтор, VX-809 — лумакафтор, VX-661 — тезакафтор и VX-445 — элексакафтор): *a* — ответы при стимуляции 0.128 мкМ форсколина; *b* — ответы при стимуляции 5,0 мкМ форсколина.

Fig. 6. Quantitative analysis of swelling of a control organoid culture with the F508del/F508del genotype in response to stimulation with forskolin (Fsk) and targeted drugs (VX-770 — Ivacaftor, VX-809 — Lumacaftor, VX-661 — Tezacaftor and VX-445 — Elexacaftor); *a* — responses upon stimulation with 0.128 μ M forskolin; *b* — responses upon stimulation with 5.0 μ M forskolin.

В данном исследовании с применением форсколинового теста на кишечных органоидах показано, что функциональная активность CFTR-канала при генотипе с.264_268delATATT/с.3139+1G>C полностью нарушена. Кроме того, при редком генотипе с.264_268delATATT/с.3139+1G>C не могут быть рекомендованы зарегистрированные FDA до 2023 года таргетные препараты, поскольку они не окажут терапевтического действия. В качестве контроля использовали органоиды F508del/F508del. Полученные на этой культуре результаты соотносятся с литературными данными [15, 23] и подтверждают статистическую значимость результатов для исследуемой культуры с редкими вариантами гена *CFTR*.

Таким образом, комплексное изучение с.264_268delATATT и с.3139+1G>C доказало принадлежность этих вариантов к классам I–III с «тяжёлыми» проявлениями заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование новых, ранее не описанных в литературе вариантов гена *CFTR* с.264_268delATATT и с.3139+1G>C, обнаруженных в генотипе одного пациента, доказало патогенность обоих вариантов, их принадлежность к «тяжёлым» мутациям и нечувствительность к действию CFTR-модуляторов. Полная утрата активности CFTR-канала была доказана методами кишечных органоидов и определения разницы кишечных потенциалов (отсутствие ответа на форсколин). Тяжесть течения заболевания у ребёнка, наличие цирроза печени, относящегося наряду с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы и мекониевым илеусом к признакам тяжёлого фенотипа при муковисцидозе,

согласуются с этими результатами. Пациенту с редким генотипом с.264_268delATATT/с.3139+1G>C не может быть рекомендована терапия таргетными препаратами (ивакафтор, ивакафтор + лумакафтор, ивакафтор + тезакафтор, ивакафтор + тезакафтор + элексакафтор), поскольку они не оказывают положительного влияния на восстановление функциональной активности белка CFTR в исследованиях *in vitro*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена за счёт 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».

Конфликт интересов отсутствует.

Вклад авторов. А.С. Ефремова — дизайн экспериментов с культурами органоидов, оценка полученных результатов, написание рукописи; В.Д. Шерман — описание клинической картины, сбор данных и их интерпретация, написание рукописи; Ю.Л. Мельяновская — дизайн экспериментов по ОРКП, анализ полученных результатов, написание рукописи; Д.О. Мокроусова, М.Г. Краснова, Н.В. Булатенко — проведение экспериментов на кишечных органоидах, количественный анализ результатов, оформление рисунков; Т.Б. Бухарова — дизайн экспериментов на кишечных органоидах, интерпретация результатов, редактирование рукописи; О.В. Махнач, А.А. Алимов — редактирование рукописи; Д.В. Гольдштейн, Е.И. Кондратьева — руководство на всех этапах выполнения работы, редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего

авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This research was funded by the Russian Science Foundation (grant N 22-15-00473, "Investigation of the effect of complex alleles of the CFTR gene on the functional activity of the chloride channel for personalized selection of targeted therapy for cystic fibrosis").

Competing interests. The authors declared no potential conflicts of interest.

Authors' contribution. A.S. Efremova — design of experiments with organoid cultures, evaluation of the results obtained, writing

of the text of the article; V.D. Sherman — description of the clinical picture, data collection and interpretation, writing of the text of the article; Y.L. Melyanovskaya — design of experiments on ICM, analysis of the results obtained, writing of the manuscript; D.O. Mokrousova, M.G. Krasnova, N.V. Bulatenko — experiments on intestinal organoids, quantitative analysis of the results, design of figures; T.B. Bukharova — design of experiments on intestinal organoids, interpretation of results, editing of the manuscript, O.V. Makhnach, A.A. Alimov — editing the manuscript; D.V. Goldshtein, E.I. Kondratyeva — guidance at all stages of the work, editing the manuscript. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jia S., Taylor-Cousar J.L. Cystic fibrosis modulator therapies // *Annu Rev Med.* 2023. Vol. 74. P. 413–426. doi: 10.1146/annurev-med-042921-021447
2. Mielus M., Sands D., Woynarowski M. Improving nutrition in cystic fibrosis: a systematic literature review // *Nutrition.* 2022. Vol. 102. P. 111725. doi: 10.1016/j.nut.2022.111725
3. InformedHealth.org [Internet]. Ivacaftor (Kalydeco) for the treatment of cystic fibrosis: overview. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK552266/>
4. Liu F., Zhang Z., Levit A., et al. Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation // *Science.* 2019. Vol. 364, N 6446. P. 1184–1188. doi: 10.1126/science.aaw7611
5. <https://www.cff.org> [Internet]. Cystic Fibrosis Foundations. Режим доступа: <https://www.cff.org/>
6. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2020 год / под ред. Е.И. Кондратьевой, С.А. Красовского, М.А. Стариновой. Москва: ИД «Медпрактика-М», 2022. 68 с.
7. Beekman J.M. Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors // *Pediatr Pulmonol.* 2016. Vol. 51, N S44. P. S23–S34. doi: 10.1002/ppul.23553
8. Castellani C., Duff A.J.A., Bell S.C., et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision // *J Cyst Fibros.* 2018. Vol. 17, N 2. P. 153–178. doi: 10.1016/j.jcf.2018.02.006
9. 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. Т. 15, № 2. С. 162–166. EDN: VPNUZI doi: 10.14300/mnnc.2020.15039
10. Guimbellot J., Sharma J., Rowe S.M. Toward inclusive therapy with CFTR modulators: progress and challenges // *Pediatr Pulmonol.* 2017. Vol. 52, N S48. P. S4–S14. doi: 10.1002/ppul.23773
11. 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. Vol. 19, N 4. P. 614–619. doi: 10.1016/j.jcf.2019.10.022
12. 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. Vol. 65, N 7. P. 594–599. doi: 10.1136/thx.2009.125088
13. Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A., et al. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, N 9. P. e73905. doi: 10.1371/journal.pone.0073905
14. 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. N 120. P. 55159. doi: 10.3791/55159
15. Dekkers J.F., Berkers G., Kruisselbrink E., et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis // *Sci Transl Med.* 2016. Vol. 8, N 344. P. 344ra84. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8278
16. 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. Vol. 1, N 1. P. 100019. doi: 10.1016/j.xpro.2020.100019
17. Kondratyeva E., Melyanovskaya Y., Bulatenko N., et al. Clinical and functional characteristics of the E92K CFTR gene variant in the russian and turkish population of people with cystic fibrosis // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24. P. 6351. doi: 10.3390/ijms24076351
18. Kondratyeva E., Efremova A., Melyanovskaya Y., et al. Clinical and genetic characterization of patients with cystic fibrosis and functional assessment of the chloride channel with the pathogenic variant c.831G>A (p.Trp277*), described for the first time // *Gene.* 2020. Vol. 761. P. 145023. doi: 10.1016/j.gene.2020.145023
19. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids // *Rare Dis.* 2013. Vol. 1. P. e27112. doi: 10.4161/rdis.27112
20. Kondratyeva E., Efremova A., Melyanovskaya Y., et al. Evaluation of the complex p.[Leu467Phe;Phe508del] CFTR allele in the intestinal organoids model: implications for therapy // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 18. P. 10377. doi: 10.3390/ijms231810377
21. Краснова М.Г., Мельяновская Ю.Л., Красовский С.А., и др. Описание клинической картины и оценка функциональной активности канала CFTR у пациента с комплексным аллелем

[S466X;R1070Q] // Пульмонология. 2023. Т. 33, № 2. С. 233–242. EDN: KMTWRS doi: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-233-242

22. Kondratyeva E., Bukharova T., Efremova A., et al. Health characteristics of patients with cystic fibrosis whose genotype includes a variant of the nucleotide sequence c.3140-16T>A and

functional analysis of this variant // Genes (Basel). 2021. Vol. 12, N 6. P. 837. doi: 10.3390/genes12060837

23. Awatade N.T., Ramalho S., Silva I.A.L., et al. R560S: a class II CFTR mutation that is not rescued by current modulators // J Cyst Fibros. 2019. Vol. 18, N 2. P. 182–189. doi: 10.1016/j.jcf.2018.07.001

REFERENCES

- Jia S, Taylor-Cousar JL. Cystic fibrosis modulator therapies. *Annu Rev Med.* 2023;74:413–426. doi: 10.1146/annurev-med-042921-021447
- Mielus M, Sands D, Woynarowski M. Improving nutrition in cystic fibrosis: a systematic literature review. *Nutrition.* 2022;102:111725. doi: 10.1016/j.nut.2022.111725
- InformedHealth.org [Internet]. Ivacaftor (Kalydeco) for the treatment of cystic fibrosis: overview. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK552266/>
- Liu F, Zhang Z, Levit A, et al. Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation. *Science.* 2019;364(6446):1184–1188. doi: 10.1126/science.aaw7611
- <https://www.cff.org> [Internet]. Cystic Fibrosis Foundations. Available from: <https://www.cff.org/>
- Kondratyeva EI, Krasovsky SA, Starinova MA, et al, editors. *Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation.* Moscow: Publishing House “Medpraktika-M”; 2022. 68 p. (In Russ).
- Beekman JM. Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors. *Pediatr Pulmonol.* 2016;51(S44):S23–S34. doi: 10.1002/ppul.23553
- Castellani C, Duff AJA, Bell SC, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros.* 2018;17(2):153–178. doi: 10.1016/j.jcf.2018.02.006
- Melyanovskaya YuL, Kondratyeva EI, Kutsev SI. Determination of reference values for the method of determining the difference in intestinal potentials in the Russian Federation. *Medical News of North Caucasus.* 2020;15(2):162–166. EDN: VPNUZI doi: 10.14300/mnnc.2020.15039
- Guimbellot J, Sharma J, Rowe SM. Toward inclusive therapy with CFTR modulators: progress and challenges. *Pediatr Pulmonol.* 2017;52(S48):S4–S14. doi: 10.1002/ppul.23773
- de Winter-de Groot KM, Berkers G, Marck-van der Wilt REP, 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
- 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
- Clancy JP, Szczesniak RD, Ashlock MA, 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
- Boj SF, Vonk AM, 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
- Dekkers JF, Berkers G, Kruisselbrink E, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med.* 2016;8(344):344ra84. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8278
- Vonk AM, van Mourik P, Ramalho AS, 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
- Kondratyeva E, Melyanovskaya Y, Bulatenko N, et al. Clinical and functional characteristics of the E92K CFTR gene variant in the russian and turkish population of people with cystic fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6351. doi: 10.3390/ijms24076351
- Kondratyeva E, Efremova A, Melyanovskaya Y, et al. Clinical and genetic characterization of patients with cystic fibrosis and functional assessment of the chloride channel with the pathogenic variant c.831G>A (p.Trp277*), described for the first time. *Gene.* 2020;761:145023. doi: 10.1016/j.gene.2020.145023
- Dekkers JF, van der Ent CK, Beekman JM. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013;1:e27112. doi: 10.4161/rdis.27112
- Kondratyeva E, Efremova A, Melyanovskaya Y, et al. Evaluation of the complex p.[Leu467Phe;Phe508del] CFTR allele in the intestinal organoids model: implications for therapy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10377. doi: 10.3390/ijms231810377
- Krasnova MG, Melyanovskaya YuL, Krasovskiy SA, et al. Description of the clinical picture and assessment of the functional activity of the CFTR channel in a patient with a complex allele [S466X;R1070Q]. *Pulmonologiya.* 2023;33(2):233–242. EDN: KMTWRS doi: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-233-242
- Kondratyeva E, Bukharova T, Efremova A, et al. Health characteristics of patients with cystic fibrosis whose genotype includes a variant of the nucleotide sequence c.3140-16T>A and functional analysis of this variant. *Genes (Basel).* 2021;12(6):837. doi: 10.3390/genes12060837
- Awatade NT, Ramalho S, Silva IAL, et al. R560S: a class II CFTR mutation that is not rescued by current modulators. *J Cyst Fibros.* 2019;18(2):182–189. doi: 10.1016/j.jcf.2018.07.001

ОБ АВТОРАХ

*** Ефремова Анна Сергеевна**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1;
ORCID: 0000-0001-5035-6396;
eLibrary SPIN: 6006-8355;
e-mail: anna.efremova.83@gmail.com

Шерман Виктория Давидовна, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0003-2206-1528;
eLibrary SPIN: 1594-6052;
e-mail: e-mail: tovika@yandex.ru

Мельниковская Юлия Леонидовна;
ORCID: 0000-0002-8814-5532;
eLibrary SPIN: 5828-0122;
e-mail: melcat@mail.ru

Мокроусова Диана Олеговна;
ORCID: 0000-0003-2066-0009;
e-mail: diana-mok2000@yandex.ru

Краснова Мария Геннадьевна;
ORCID: 0000-0002-2195-3025;
eLibrary SPIN: 9339-9163;
e-mail: krasnova.m.g.0605@gmail.com

Булатенко Наталья Вадимовна;
ORCID: 0000-0002-5188-9255;
eLibrary SPIN: 8544-2257;
e-mail: natasha.bulatenko@yandex.ru

Бухарова Татьяна Борисовна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-0481-256X;
eLibrary SPIN: 2092-5580;
e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Махнач Олег Владимирович, канд. хим. наук;
ORCID: 0000-0002-2707-8313;
eLibrary SPIN: 1453-9189;
e-mail: buben6@yandex.ru

Алимов Андрей Анатольевич, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-8495-7728;
eLibrary SPIN: 1289-6931;
e-mail: andrei.alimov2010@yandex.ru

Гольдштейн Дмитрий Вадимович, д-р биол. наук, профессор;
ORCID: 0000-0003-2438-1605;
eLibrary SPIN: 7714-9099;
e-mail: dvgoldshtein@gmail.com

Кондратьева Елена Ивановна, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0001-6395-0407;
eLibrary SPIN: 9535-9331;
e-mail: elenafpk@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

*** Anna S. Efremova**, Cand. Sci. (Biology);
address: 1 Moskvorechye street, 115522 Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0001-5035-6396;
eLibrary SPIN: 6006-8355;
e-mail: anna.efremova.83@gmail.com

Victoria D. Sherman, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0003-2206-1528;
eLibrary SPIN: 1594-6052;
e-mail: e-mail: tovika@yandex.ru

Yuliya L. Melyanovskaya;
ORCID: 0000-0002-8814-5532;
eLibrary SPIN: 5828-0122;
e-mail: melcat@mail.ru

Diana O. Mokrousova;
ORCID: 0000-0003-2066-0009;
e-mail: diana-mok2000@yandex.ru

Maria G. Krasnova;
ORCID: 0000-0002-2195-3025;
eLibrary SPIN: 9339-9163;
e-mail: krasnova.m.g.0605@gmail.com

Nataliya V. Bulatenko;
ORCID: 0000-0002-5188-9255;
eLibrary SPIN: 8544-2257;
e-mail: natasha.bulatenko@yandex.ru

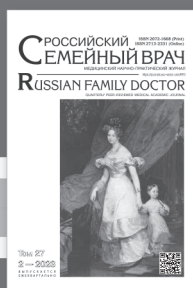
Tatiana B. Bukharova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-0481-256X;
eLibrary SPIN: 2092-5580;
e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Oleg V. Makhnach, Cand. Sci. (Chemistry);
ORCID: 0000-0002-2707-8313;
eLibrary SPIN: 1453-9189;
e-mail: buben6@yandex.ru

Andrey A. Alimov, PhD in Biology, Doctor of Medicine;
ORCID: 0000-0002-8495-7728;
eLibrary SPIN: 1289-6931;
e-mail: andrei.alimov2010@yandex.ru

Dmitry V. Goldshtein, Dr. Sci. (Biology), Professor;
ORCID: 0000-0003-2438-1605;
eLibrary SPIN: 7714-9099;
e-mail: dvgoldshtein@gmail.com

Elena I. Kondratyeva, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0001-6395-0407;
eLibrary SPIN: 9535-9331;
e-mail: elenafpk@mail.ru



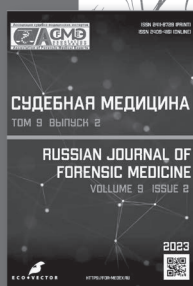
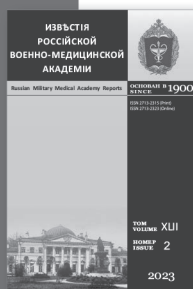
Тематика научных журналов:

- медицина и здравоохранение;
- физико-математические науки;
- философия;
- экономика;
- юриспруденция;
- биологические науки;
- искусство и культура;
- педагогика;
- политика и др.

«Эко-Вектор» — основатель и организатор Школы научного ремесла «SciCraft».

«Эко-Вектор» проводит тренинги по наукометрии и подготовке материалов к публикациям в международных журналах, академическому английскому языку.

Одно из направлений компании — предоставление полного цикла издательских услуг. На данный момент в редакционном портфеле издательства более 100 научно-практических журналов и 350 наименований книг.



191186, Санкт-Петербург,
Аптекарский переулок, д. 3,
литера А, помещение 1Н.
Тел. 8(812) 648-83-66.
E-mail: info@eco-vector.com
Сайт: <https://www.eco-vector.com>

127349, Москва,
Шенкурский проезд, д. 3Б,
офис 311
Тел. +7 (495) 409-83-09.
E-mail: infomos@eco-vector.com
Сайт: <https://www.eco-vector.com>

