



Клиническое наблюдение

Клиническое наблюдение пациента с муковисцидозом с патогенным вариантом N1303K в генотипе с исследованием функции канала CFTR с помощью метода определения разницы кишечных потенциалов и форсколинового теста на кишечных органоидах

Кондратьева Е.И.¹ • Одинаева Н.Д.² • Шерман В.Д.¹ • Ефремова А.С.¹ • Мельяновская Ю.Л.¹ • Булатенко Н.В.¹ • Бухарова Т.Б.¹ • Гольдштейн Д.В.¹

Кондратьева Елена Ивановна – д-р мед. наук, профессор, руководитель научно-клинического отдела муковисцидоза, заведующая кафедрой генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования, врач-педиатр отделения муковисцидоза¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6395-0407>
✉ 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация. E-mail: elenafpk@mail.ru

Одинаева Нисо Джумаевна – д-р мед. наук, профессор, главный врач²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5214-8072>. E-mail: info@mokdcd.org

Шерман Виктория Давидовна – канд. мед. наук, вед. науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза, доцент кафедры генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2206-1528>. E-mail: tovika@yandex.ru

Ефремова Анна Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетики стволовых клеток¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>. E-mail: anna.efremova.83@gmail.com

Мельяновская Юлия Леонидовна – науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>. E-mail: melcat@mail.ru

Булатенко Наталья Вадимовна – мл. науч. сотр. лаборатории генетики стволовых клеток¹. E-mail: bnv695@gmail.com

Бухарова Татьяна Борисовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории генетики стволовых клеток¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>. E-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Гольдштейн Дмитрий Вадимович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>. E-mail: dvgoldrm7@gmail.com

Обоснование. Муковисцидоз – распространенное моногенное заболевание, обусловленное патогенными вариантами нуклеотидной последовательности гена *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* (ABCC7). Ген *CFTR* содержит 27 экзонов и расположен в регионе 31.1 длинного плеча 7-й хромосомы (7q31.1). Использование метода секвенирования привело к накоплению новых сведений о разнообразии генетических вариантов при муковисцидозе. Эти сведения важны в свете подходов к разработке таргетной терапии заболевания, учитывающей генотип конкретного пациента. Для генетического варианта II класса N1303K таргетная терапия не разработана. Сопоставления функции хлорного канала при данной мутации с функцией при патогенных вариантах II класса, таких как F508del, не проводилось.

Материал и методы. Проанализирована история болезни пациента с муковисцидозом с генотипом CFTR F508del/N1303K, получены ректальные биоптаты. Проведено определение разницы кишечных потенциалов (ОРКП) и форсколиновый тест на кишечных органоидах, полученные результаты сопоставлены с клиническими данными.

Результаты. Данные ОРКП подтверждают, что генетический вариант N1303K является «тяжелым» и приводит к утрате рабочего белка CFTR, что соответствует клинической картине. Средняя плотность тока короткого замыкания (Δ ISC) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $-39 \pm 1,22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, форсколина (стимуляция хлорных каналов) – $3,83 \pm 1,43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, карбахола – $6 \pm 2,47 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, гистамина – $8,5 \pm 3,02 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Результаты форсколинового теста свидетельствуют о том, что потенциатор VX-770 и корректор VX-809 оказывают слабое влияние на стимуляцию форсколином органоидов при генетическом варианте N1303K: отмечено незначительное набухание органоидов – примерно на 20% по сравнению с исходным размером.

Заключение. Использование метода ОРКП и форсколинового теста на кишечных органоидах позволяет количественно оценить работу белка CFTR и *in vitro* определить эффективность таргетной терапии у пациентов с муковисцидозом. CFTR-модуляторы неэффективны при наличии мутации N1303K в компаунд-гетерозиготном состоянии с F508del, несмотря на то что оба патогенных варианта относятся ко II классу.

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

Для цитирования: Кондратьева ЕИ, Одинаева НД, Шерман ВД, Ефремова АС, Мельяновская ЮЛ, Булатенко НВ, Бухарова ТБ, Гольдштейн ДВ. Клиническое наблюдение пациента с муковисцидозом с патогенным вариантом N1303K в генотипе с исследованием функции канала CFTR с помощью метода определения разницы кишечных потенциалов и форсколинового теста на кишечных органоидах. Альманах клинической медицины. 2021;49(3):219–225. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-019.

Поступила 25.03.2021; доработана 11.04.2021; принята к публикации 12.04.2021; опубликована онлайн 23.04.2021

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

² ГБУЗ МО «Детский клинический многопрофильный центр Московской области»; 115093, г. Москва, ул. Большая Серпуховская, 62, Российская Федерация

Муковисцидоз – распространенное моногенное заболевание, обусловленное патогенными вариантами нуклеотидной последовательности (ранее называемыми мутациями) гена *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* (ABCC7). Ген *CFTR* содержит 27 экзонов и расположен в регионе 31.1 длинного плеча 7-й хромосомы (7q31.1) [1]. В настоящее время описано более 2000 вариантов гена *CFTR*, при этом на веб-сайте международного проекта CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR, <https://cftr2.org>) представлено 360 клинически значимых генетических вариантов *CFTR*. В зависимости от влияния на функцию белка *CFTR* их подразделяют на 7 основных классов: патогенные варианты I и VII классов препятствуют синтезу белка *CFTR*, мутации II класса вызывают нарушение фолдинга белка и снижение его количества, при остальных классах мутаций происходит формирование нефункционального *CFTR*, нарушается его транспорт к апикальной мембране клетки или снижается проводимость анионов хлора [2, 3].

Использование метода секвенирования привело к накоплению новых сведений о разнообразии генетических вариантов гена при муковисцидозе. Эти сведения важны в свете подходов к разработке таргетной терапии муковисцидоза, учитывающей генотип конкретного пациента. Препараты, действие которых направлено на восстановление функции белка *CFTR*, называются *CFTR*-модуляторами [4]. В связи с многообразием генетических вариантов *CFTR* и их последствий разработка этиотропной и патогенетической терапии, направленной на восстановление функции гена, изначально была сложной задачей и шла по нескольким направлениям.

В настоящее время в клинической практике применяют *CFTR*-модуляторы двух видов: потенциаторы *CFTR* (восстанавливают функцию ионного канала) и корректоры *CFTR* (улучшают фолдинг). Разрабатываются новые группы препаратов с иными механизмами действия: усилители – препараты со свойствами модуляторов и потенциаторов (увеличивают количество белка *CFTR*), стабилизаторы (улучшают стабильность *CFTR* и снижают деградацию).

Мишенью потенциаторов выступают молекулы мутантного белка *CFTR*, располагающиеся на апикальной мембране. Действие потенциаторов направлено на восстановление (активацию) функции ионного канала, образованного мутантным белком *CFTR* (мутации III–IV классов). Первым таким средством стал

ивакафтор (препарат Калидеко (Kalydeco), VX-770), разработанный биотехнологической компанией Vertex Pharmaceuticals (США) и одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) в 2012 г. В настоящее время список генетических вариантов в гене *CFTR*, которые отвечают на введение ивакафтора, расширен до 97 мутаций [5], и препарат применяется у детей, достигших 4-месячного возраста.

Корректоры – лекарственные средства, позволяющие мутантному белку *CFTR* пройти через систему внутриклеточного контроля качества и занять правильное расположение на апикальной мембране (мутации II класса). Однако действия одного корректора (VX-809) при генетических вариантах II класса оказалось недостаточно.

Первым модулятором для пациентов, гомозиготных по F508del в гене *CFTR*, стал комбинированный препарат ивакафтора (200 мг) и лумакафтора (125 мг) в лекарственной форме таблеток (препарат Оркамби (Orkambi), VX-809 + VX-770), также разработанный Vertex Pharmaceuticals и одобренный FDA в июне 2015 г. В Российской Федерации препарат Оркамби зарегистрирован в декабре 2020 г. Лекарственное средство предназначено для лечения пациентов старше 2 лет. Препарат оказывает двойное действие: лумакафтор улучшает конформационную стабильность F508del-CFTR, в результате чего улучшаются процессинг и миграция зрелого белка к поверхности клеток, в то время как ивакафтор служит активатором *CFTR*, облегчая транспорт ионов хлора за счет улучшения проводимости белка *CFTR* на клеточной поверхности [4, 6].

Для генетического варианта II класса N1303K таргетная терапия не разработана. Сопоставления функции хлорного канала при данной мутации с функцией при мутациях II класса, таких как F508del, не проводилось.

Целями нашей работы стали описание клинической картины муковисцидоза при варианте N1303K в генотипе и исследование функции канала *CFTR* с помощью метода определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП) и форсколинового теста на кишечных органоидах с оценкой эффективности таргетных препаратов.

Материал и методы

Обследован пациент: девочка 2011 г.р. с диагнозом «муковисцидоз, преимущественно легочная форма, генотип c.1521_1523del p.Phe508del (F508del)/c.3909C>G p.(Asn1303Lys) (N1303K)». Диагноз устанавливали согласно клиническим



рекомендациям [7]. Пациентка наблюдается в ГБУЗ МО «Детский клинический многопрофильный центр Московской области».

Метод определения разницы кишечных потенциалов. Исследование по методу ОРКП проводили в научно-клиническом отделе муковисцидоза ФГБНУ «МГНЦ» (заведующая – проф. Е.И. Кондратьева) согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 [8] по следующему алгоритму. На первом этапе выполняли калибровку каждой рециркуляционной камеры в отдельности на приборе VCC MC 8B421 (Physiologic Instruments, США). Учитывались физические факторы, такие как наличие воздуха в контактных наконечниках с агаром и сопротивление жидкости, а также факторы окружающей среды: отсутствие вибраций вблизи оборудования, случайные контакты с электродами, отсутствие посторонних работающих приборов в кабинете. На втором этапе, после калибровки прибора, в камеру помещали ректальный биопсийный материал. Забор биоптатов проводился с использованием оборудования Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (модель #FB-23OU) согласно инструкции. Размер биоптата составлял 3–5 мм. Биопсийный материал помещали в специальный слайдер, который далее располагали в камере. Камеры заполняли раствором буфера Meyer. Буфер готовили непосредственно перед исследованием, в него входило 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, 10 мМ D-глюкозы, а также 0,01 мМ индометацина. Регистрация показаний начиналась с записи базального тока короткого замыкания (µА/см²) (стадия пре-амилорид). На третьем этапе добавляли стимуляторы в следующем порядке: амилорид (натриевый канал), форсколин/IBMX (хлорный канал), генистеин (хлорный канал), карбахол (кальциевый канал), DIDS (4,4'-диизотиоциано-2,2'-стильбен-дисульфоновая кислота) (анионный транспорт), и в завершение – гистамин (кальциевый канал). Исследование заканчивали после записи базального тока короткого замыкания. Референсные значения метода ОРКП определены нами ранее при исследовании здоровых добровольцев (контроль, n = 10) и пациентов с муковисцидозом, гомозиготных по F508del (группа сравнения – F508del/F508del, n = 3) [9].

Форсколиновый тест на кишечных органоидах. Исследование остаточной функциональной активности канала CFTR и влияния CFTR-модуляторов проводили при помощи

форсколинового теста на культуре кишечных органоидов, полученной из ректальных биоптатов пациента, в лаборатории генетики стволовых клеток ФГБНУ «МГНЦ» (заведующий – проф. Д.В. Гольдштейн). Набухание органоидов при обработке форсколином отражает функциональное состояние белка CFTR. При получении культур органоидов и выполнении форсколинового теста за основу были взяты протоколы, разработанные под руководством J.M. Beekman [10–13]. Метод получения кишечных органоидов из ректальных биоптатов в ФГБНУ «МГНЦ» был подробно описан ранее в работе [14]. Забор биологического материала пациентки выполняли после добровольного подписания ее законными представителями информированного согласия.

Из ректальных биоптатов изолировали отдельные крипты, для чего проводили инкубацию с раствором 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (Thermo Fisher Scientific, США). Крипты погружали в Матригель (Corning, США) и высевали в 24-луночные планшеты. После полимеризации Матригеля добавляли ростовую среду (состав среды указан в работах [12, 14]). Пересев органоидов осуществляли раз в 7 дней путем механического разрушения крупных почкующихся структур на мелкие фрагменты. Для проведения форсколинового теста органоиды высевали в 96-луночные планшеты. Через 24 часа органоиды окрашивали Calcein AM (Biotium) и выполняли стимуляцию форсколином в концентрациях 0,8 и 5 мкМ. Обработка продолжалась в течение 60 минут. На определенных временных точках (0, 20, 40 и 60 минут) проводили съемку «фиксированных» полей с использованием флуоресцентного микроскопа Observer D1 (Zeiss, Германия). VX-809 (3 мкМ; Selleckchem, США) добавляли на этапе посева органоидов, а VX-770 (3 мкМ; Selleckchem, США) – одновременно с форсколином. Количественный анализ набухания органоидов выполняли при помощи программы ImageJ. При ответах ниже, чем 60–70%, терапия таргетными препаратами не может быть рекомендована пациентам, поскольку их применение не приведет к видимому терапевтическому эффекту.

Клиническое наблюдение

Пациент – девочка 2011 г.р. Диагноз: муковисцидоз, смешанная форма (E 84.8), тяжелое течение. Хронический гнойный обструктивный бронхит. Дыхательная недостаточность 0–1-й степени. Двусторонние цилиндрические бронхоэктазы (S8 справа, средней доли, S5–6 слева). Хроническая панкреатическая недостаточность тяжелой степени. Белково-энергетическая

Показатели плотности тока короткого замыкания (Δ ISC) при введении стимуляторов у пациентки, несущей в генотипе вариант N1303K

Δ ISC, μ A/ cm^2	Амилорид	Форсколин	Генистеин	Карбахол	DIDS	Гистамин
Биоптат № 1	-40	5	0	10	0	13
Биоптат № 2	-37	1,5	0	4,5	0	8
Биоптат № 3	-40	5	0	3,5	0	4,5
Средние значения больной*	-39 \pm 1,22	3,83 \pm 1,43	0	6 \pm 2,47	0	8,5 \pm 3,02
Референсные значения больных с F508del/F508del [9]*	-18,39 \pm 5,62	3,06 \pm 0,89	1,83 \pm 0,35	–	1,83 \pm 0,35	21,5 \pm 5,46
Референсные значения здоровых пациентов [9]*	-8,98 \pm 3,42	25,78 \pm 4,41	2 \pm 0,29	117,44 \pm 4,32	1,8 \pm 0,26	101,68 \pm 10,99

*Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки ($M \pm m$)

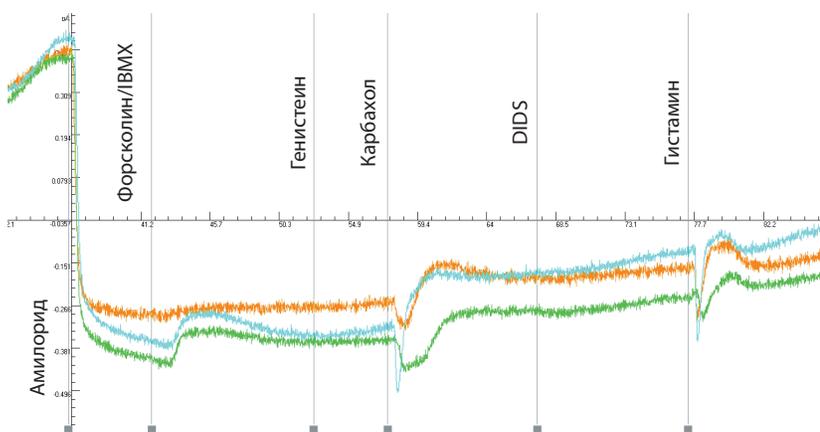


Рис. 1. Метод определения разницы кишечных потенциалов. Пациентка с генотипом N1303K/F508del. При введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания (Δ ISC) и отсутствие ответа на форсколин/IBMX, в ответ на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение Δ ISC в отрицательную сторону

недостаточность. Гипоплазия желчного пузыря. Дискинезия желчевыводящих путей. Хронический пансинусит. Микробиологический диагноз: хроническая синегнойная инфекция. Генотип: F508del/N1303K.

Диагноз муковисцидоза установлен в возрасте 3 месяцев на основании следующих факторов:

- положительного неонатального скрининга на муковисцидоз;
- положительного результата потовой пробы на аппарате «Нанодакт» (89 ммоль/л при норме до 50 ммоль/л);
- характерной клинической картины (обструктивный бронхит, ателектаз верхней доли левого легкого, стеаторея, синдром электролитных нарушений).

Течение заболевания с рождения тяжелое. На первом году жизни перенесла псевдосиндром Барттера, сопровождавшийся развитием метаболического алкалоза (лечение в условиях стационара), ателектаз верхней доли правого легкого. В течение 5 лет сохранялась

потребность в дополнительном назначении электролитов.

Кишечный синдром не удавалось полностью скорректировать, несмотря на высокие дозы заместительной ферментной терапии (расчет дозы исходя из 3000 Ед липазы на 1 г жира в пище), коррекцию гиперацидных состояний. Периодически развивается его декомпенсация в виде выраженной стеатореи.

С трехлетнего возраста отмечается хронический рост синегнойной палочки, с 2016 г. – мукоидный морфотип. Обострения наблюдаются несколько раз в год на фоне острых респираторных инфекций, протекают с увеличением объема мокроты, снижением аппетита, повышением утомляемости.

Проводится терапия: дополнительное высококалорийное питание ежедневно в виде высококалорийных смесей и коктейлей; ферментотерапия – панкреатин 10 тыс. (48 капс./сут); муколитическая терапия (дорназа-альфа, NaCl 7% с гиалуроновой кислотой, ацетилцистеин); бронхолитическая терапия; ингаляции противосинегнойных антибиотиков – тобрамицин и колистиметат натрия, плановые курсы внутривенной антибактериальной терапии, азитромицин в субингибирующих дозировках с противовоспалительной целью; терапия полипозного пансинусита; витаминотерапия; холеретическая терапия; кинезитерапия.

В связи с тем что N1303K, так же как и F508del, относится ко II классу мутаций гена *CFTR*, были проведены функциональные тесты для определения активности канала *CFTR* у ребенка с муковисцидозом.

Пациентке было выполнено исследование методом ОРКП (таблица, рис. 1), получены следующие результаты: средняя плотность тока короткого замыкания (Δ ISC) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила -39 \pm 1,22 μ A/ cm^2 . Среднее изменение Δ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) равнялось 3,83 \pm 1,43 μ A/ cm^2 , что свидетельствует об отсутствии функции хлорного

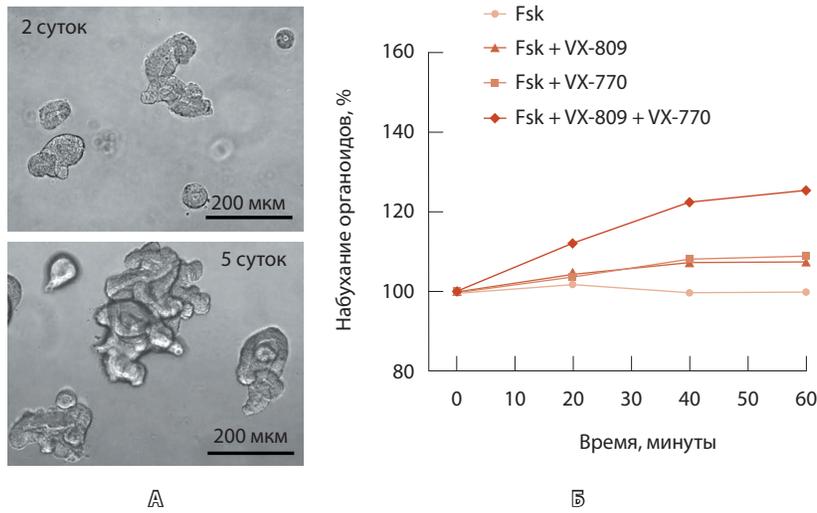


Рис. 2. Оценка функциональной активности канала CFTR при генотипе N1303K/F508del на кишечных органоидах: **А** – морфологические особенности N1303K/F508del культуры органоидов на разных сроках культивирования, **Б** – количественный анализ остаточной активности канала CFTR (ответ на форсколин, Fsk) и действия таргетных препаратов (потенциатора VX-770 и корректора VX-809); 100% – площадь органоидов до стимуляции форсколином

канала. В ответ на введение карбахола Δ ISC изменилась в отрицательную сторону и в среднем составила $6 \pm 2,47 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. В ответ на введение гистамина Δ ISC также изменилась в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки. При этом плотность тока в среднем была равна $8,5 \pm 3,02 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Для культуры N1303K/F508del органоидов были характерны морфологические признаки утраты функционального канала CFTR – редуцированный люмен, толстые стенки и несферическая форма (рис. 2А). N1303K/F508del органоиды не отвечали на стимуляцию форсколином в высокой концентрации (5 мкМ). Таргетные препараты практически не оказали влияния на активность CFTR. Незначительное набухание органоидов – примерно на 20% по сравнению с исходным размером – отмечалось только при совместной аппликации VX-809 и VX-770 (рис. 2Б).

Обсуждение

Генетический вариант N1303K, с.3909C>G, р.(Asn1303Lys) представляет собой замену цитозина на гуанин в положении 3909 в 24-м экзоне. Вариант находится на 9-м месте в Регистре больных муковисцидозом Российской Федерации, его аллельная частота составляет 1,55% [15]. Он относится ко II классу. В Европейском регистре больных муковисцидозом данный вариант занимает 3-е место, аллельная частота составляет 2,12% [16]. Вариант описан в международных базах данных.

С помощью методов ОРКП и кишечных органоидов было показано, что вариант гена CFTR N1303K является патогенным, «тяжелым» и приводит к утрате рабочего белка CFTR в большей степени, чем у пациентов с генотипом F508del/F508del (II класс мутаций). Изменение Δ ISC на амилорид у пациентки с вариантом N1303K было более выраженным, чем в группах F508del/F508del и контрольной. Это означает, что в данном случае натриевый канал работает активнее, чем в других группах (скорее всего, это носит компенсаторный характер). Ответ (изменение Δ ISC) на добавление форсколина был ниже, чем у больных с F508del/F508del и здоровых пациентов, соответственно, функция хлорного канала оказалась снижена больше, чем у пациентов, гомозиготных по генотипу F508del/F508del. Ответ на гистамин также был ниже, чем в группах контроля и сравнения. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что функция кальциевых каналов у пациентки с вариантом N1303K в генотипе снижена.

Таким образом, потенциатор VX-770 и корректор VX-809 оказывают слабое действие на набухание органоидов при стимуляции форсколином. J.F. Dekkers и соавт. [11, 17] впервые показали, что органоиды с генотипом N1303K/F508del практически не отвечают набуханием на стимуляцию форсколином и CFTR-модуляторы неэффективны при наличии мутации N1303K. Анализы клинико-лабораторных данных пациентки с генетическим вариантом N1303K и результатов метода ОРКП совпали и свидетельствовали о «тяжелом» генетическом варианте. При сравнении с группой пациентов, гомозиготных по F508del (вариант, который также относится ко II классу), было показано, что в случае с вариантом N1303K дисфункция канала CFTR более выражена и ответа на применение CFTR-модуляторов не наблюдалось.

Заключение

CFTR-модуляторы неэффективны при наличии мутации N1303K в компаунд-гетерозиготном состоянии с F508del, несмотря на то что оба патогенных варианта относятся ко II классу. Данный клинический пример показывает необходимость использования метода ОРКП и форсколинового теста на кишечных органоидах, получаемых из ректальных биоптатов, для определения функции канала CFTR и альтернативных каналов, а также для оценки *in vitro* целесообразности назначения таргетной терапии пациентам с муковисцидозом, чьи генотипы относятся к редким, не описаны в базах данных и не обозначены в инструкциях к таргетным препаратам. ©



Дополнительная информация

Согласие пациента

Законные представители пациентки добровольно подписали информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме в журнале «Альманах клинической медицины».

Финансирование

Работа выполнена по инициативе авторов без привлечения финансирования.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.

Участие авторов

Авторы заявили о том, что внесли равный существенный вклад в концепцию или дизайн исследования, получение, анализ данных и их интерпретацию;

написание статьи и/или существенную переработку ее научного и интеллектуального содержания. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Кондратьева ЕИ, Каширская НЮ, Капранов НИ, ред. Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия. М.: ООО «Компания БОРГЕС»; 2018. [Kon-drat'eva EI, Kashirskaya NYu, Kapranov NI, editors. [Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, therapy]. Moscow: Kompaniya BORGES; 2018. Russian.]
2. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med.* 2016;4(8):e37–e38. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30188-6.
3. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020;109(5):893–899. doi: 10.1111/apa.15155.
4. Cain C. Cystic fibrosis two-step. *SciBX.* 2012;5(8). doi: 101038/scibx2012192.
5. Ivacaftor. Highlights of prescribing information [Internet]. Available from: https://pi.vrtx.com/files/uspi_ivacaftor.pdf.
6. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(46):18843–18848. doi: 10.1073/pnas.1105787108.
7. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Кистозный фиброз (муковисцидоз)» [Интернет]. 2020. Доступно на: <https://bazanpa.ru/minzdrav-rossii-klinicheskije-rekomendatsii-ot01012020-h4876450/>. [Ministry of Health of the Russian Federation. [Cystic fibrosis: Clinical guidelines] [Internet]. 2020. Russian. Available from: <https://bazanpa.ru/minzdrav-rossii-klinicheskije-rekomendatsii-ot01012020-h4876450/>]
8. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, Gallati S, Ballmann M. 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.
9. Мельяновская ЮЛ, Кондратьева ЕИ, Куцев СИ. 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. [Melyanovskaya YuL, Kondratyeva EI, Kutsev SI. [Determination of reference values for the method of intestinal current measurement in the Russian Federation]. *Medical News of the North Caucasus.* 2020;15(2):162–166. Russian. doi: 10.14300/mnnc.2020.15039.]
10. 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.
11. Dekkers JF, Berkers G, Kruijselbrink E, Vonk A, de Jonge HR, Janssens HM, Bronsveld I, van de Graaf EA, Nieuwenhuis EE, Houwen RH, Vleggaar FP, Escher JC, de Rijke YB, Majoer CJ, Heijerman HG, de Winter-de Groot KM, Clevers H, van der Ent CK, Beekman JM. 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.
12. Boj SF, Vonk AM, Statia M, Su J, Vries RR, Beekman JM, Clevers H. 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.
13. Vonk AM, van Mourik P, Ramalho AS, Silva IAL, Statia M, Kruijselbrink E, Suen SWF, Dekkers JF, Vleggaar FP, Houwen RHJ, Mullenders J, Boj SF, Vries R, Amaral MD, de Boeck K, van der Ent CK, Beekman JM. 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.
14. Кондратьева ЕИ, Мельяновская ЮЛ, Ефремова АС, Булатенко НВ, Бухарова ТБ, Гольдштейн ДВ, Зодьбинова АЭ, Никонова ВС, Жекайте ЕК, Каширская НЮ, Мелконян ГГ, Одинаева НД, Куцев СИ. Опыт применения методов оценки функциональности анионного канала CFTR у пациентов с установленным и предполагаемым диагнозом муковисцидоза. *Сибирское медицинское обозрение.* 2019;2(116):60–69. doi: 10.20333/2500136-2019-2-60-69. [Kon-dratyeva EI, Melyanovskaya YL, Efremova AS, Bulatenko NV, Bukharova TB, Goldstein DV, Zodbinova AE, Nikonova VS, Zhekaite EK, Kashirskaya NY, Melkonyan GG, Oдинаeva NJ, Kutsev SI. [Experience of evaluating functionality of anionic CFTR channel methods application in patients with cystic fibrosis diagnosed and supposed]. *Siberian Medical Review.* 2019;2(116):60–69. Russian. doi: 10.20333/2500136-2019-2-60-69.]
15. Амелина ЕЛ, Каширская НЮ, Кондратьева ЕИ, Красовский СА, Старинаова МА, Воронкова АЮ, ред. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2018 год. М.: Медпрактика-М; 2020. 68 с. [Amelina EL, Kashirskaya NYu, Kondrat'eva EI, Krasovskiy SA, Starinova MA, Voronkova AYU. [The registry of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation, 2018]. Moscow: Medpraktika-M; 2020. 68 p.]
16. Zolin A, Orenti A, van Rens J, Fox A, Krasnyk M, Cosgriff R, Hatzigiorgou E, Jung A, MeiZahav M, Storms V. ECFS Patient Registry Annual Data Report 2018 [Internet]. 2020. Available from: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSR_Report_2018_v1.4.pdf.
17. Dekkers JF, Gogorza Gondra RA, Kruijselbrink E, Vonk AM, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, van der Ent CK, Beekman JM. Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids. *Eur Respir J.* 2016;48(2):451–458. doi: 10.1183/13993003.01192-2015.



A clinical case of cystic fibrosis patient with pathogenic N1303K genotype variant with assessment of the CFTR channel function by intestinal current measurement and forskolin-induced swelling in rectal organoids

E.I. Kondratyeva¹ • N.D. Odinaeva² • V.D. Sherman¹ •
A.S. Efremova¹ • Yu.L. Melyanovskaya¹ • N.V. Bulatenko¹ •
T.B. Bukharova¹ • D.V. Goldshtein¹

Rationale: Cystic fibrosis is a common monogenic disease related to pathogenic nucleotide sequence variants in the *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* (ABCC7) gene. The *CFTR* gene consists of 27 exons and is located in the 31.1 region on the long arm of chromosome 7 (7q31.1). The use of the sequencing method has led to the accumulation of new information about the diversity of genetic variants in cystic fibrosis. This information is important considering approaches to the development of targeted therapy for the disease, based on an individual genotype. No targeted therapy has been developed for the N1303K class II genetic variant. The function of the chloride channel in this mutation has not been compared with that in class II mutations like F508del.

Materials and methods: We have analyzed medical files of a patient with cystic fibrosis and F508del/N1303K *CFTR* genotypes, including the results of rectal biopsy samples. The assessments included measurement of the intestinal potential difference and forskolin-induced swelling assay (FIS) in rectal organoids, with the results being analyzed in relation to the clinical data.

Results: The results of intestinal current measurements (ICM) confirm that the N1303K genetic variant is “severe” and leads to the loss of the working *CFTR* protein, which is consistent with the clinical manifestations. The mean short circuit current density (Δ ISC) in response to amiloride (sodium channel stimulation) was $-39 \pm 1.22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, to forskolin (chloride channel stimulation) $3.83 \pm 1.43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$,

to carbachol $6 \pm 2.47 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, and to histamine $8.5 \pm 3.02 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

FIS results indicate that the VX-770 potentiator and the VX-809 corrector have a weak effect on the stimulation of organoids by forskolin in the genetic variant N1303K: organoid swelling was non-significant (about 20% from their baseline size).

Conclusion: The use of the ICM method and FIS assay in human intestinal organoids makes it possible to quantify the work of the *CFTR* protein and determine the *in vitro* effectiveness of targeted therapy in patients with cystic fibrosis. *CFTR* modulators are ineffective in patients with N1303K mutation in the compound-heterozygous condition with F508del, despite both pathogenic variants belong to class II.

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

For citation: Kondratyeva EI, Odinaeva ND, Sherman VD, Efremova AS, Melyanovskaya YuL, Bulatenko NV, Bukharova TB, Goldshtein DV. A clinical case of cystic fibrosis patient with pathogenic N1303K genotype variant with assessment of the *CFTR* channel function by intestinal current measurement and forskolin-induced swelling in rectal organoids. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(3):219–225. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-019.

Received 25 March 2021; revised 11 April 2021; accepted 12 April 2021; published online 23 April 2021

Informed consent statement

The patient's legal representatives have voluntarily signed their informed consent to the publication of the patient's personal medical information in an anonymized form in the *Almanac of Clinical Medicine* journal.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

The authors have equally contributed to the study concept and design, collection of the results, data analysis and interpretation, text writing and/or significant processing of its research and intellectual contents. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

Elena I. Kondratyeva – MD, PhD, Professor, Head of Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Chief of Chair of Respiratory System Diseases Genetics, Institute of Higher and Additional Professional Education; Pediatrician, Department of Cystic Fibrosis¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6395-0407>

✉ 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation. E-mail: elenafpk@mail.ru

Niso D. Odinaeva – MD, PhD, Professor, Chief Physician²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5214-8072>. E-mail: info@mokdcd.ru

Victoria D. Sherman – MD, PhD, Leading Research Fellow, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis; Associate Professor, Chair of Respiratory System Diseases Genetics, Institute of Higher and Additional Professional Education¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2206-1528>. E-mail: tovika@yandex.ru

Anna S. Efremova – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Stem Cell Genetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>. E-mail: anna.efremova.83@gmail.com

Yuliya L. Melyanovskaya – Research Fellow, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>. E-mail: melcat@mail.ru

Nataliya V. Bulatenko – Junior Research Fellow, Laboratory of Stem Cell Genetics¹. E-mail: bnv695@gmail.com

Tatiana B. Bukharova – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Stem Cell Genetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>. E-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Dmitry V. Goldshtein – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Stem Cell Genetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>. E-mail: dvgoldrm7@gmail.com

¹ Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation

² Children's Clinical Multidisciplinary Center of the Moscow Region; 62 Bol'shaya Serpukhovskaya ul., Moscow, 115093, Russian Federation