

Состояние здоровья близнецов с генотипом F508del/R334W при муковисцидозе и возможности таргетной терапии

Е.И.Кондратьева^{1,2}, А.Ю.Воронкова^{1,2}, А.С.Ефремова¹, Ю.Л.Мельяновская¹,
Н.В.Булатенко¹, Т.Б.Бухарова¹, Н.Д.Одинаева², Х.Р. де Йонге³, Д.В.Гольдштейн¹

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П.Бочкова, Москва, Российская Федерация;

²Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области, Москва, Российская Федерация;

³Отделение гастроэнтерологии и гепатологии клиники Erasmus MC, Роттердам, Нидерланды

Ген *CFTR* содержит 27 экзонов и расположен в регионе 31.1 длинного плеча 7-й хромосомы (7q31.1). В настоящее время описано более 2000 вариантов гена *CFTR*. R334W относится к вариантам с «мягким» течением заболевания.

Цель. Комплексно изучить состояние здоровья, функциональной активности канала *CFTR* и эффективности *CFTR*-модуляторов у близнецов с генотипом F508del/R334W.

Материалы и методы. Данные историй болезни, метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП), метод кишечных органоидов.

Результаты. Течение муковисцидоза у детей-близнецов – средней тяжести, с однопипными клиническими проявлениями: развитие полипозного риносинусита, эпизоды роста грамотрицательной флоры в респираторном тракте. Отягощающим сопутствующим заболеванием у обоих детей является поллиноз на фоне поливалентной аллергии. Динамическое определение количества панкреатической эластазы 1 у первого ребенка показало ее снижение с 500 до 125 мкг/г стула, что потребовало назначения панкреатина и увеличения дозы при дальнейшем наблюдении. У обоих братьев при проведении ОРКП функция хлорного канала снижена. Применение корректора (VX-809) и потенциатора (VX-770) эффективно восстанавливает работу канала, при их совместном воздействии наблюдается аддитивный эффект. Полученные на обеих культурах кишечных органоидов количественные результаты были очень близки по значениям.

Ключевые слова: муковисцидоз, ген *CFTR*, патогенный вариант R334W, метод определения разности кишечных потенциалов, кишечные органоиды, форсколиновый тест, корректоры, потенциаторы, таргетная терапия, ивакафтор, лумакафтор

Для цитирования: Кондратьева Е.И., Воронкова А.Ю., Ефремова А.С., Мельяновская Ю.Л., Булатенко Н.В., Бухарова Т.Б., Одинаева Н.Д., де Йонге Х.Р., Гольдштейн Д.В. Состояние здоровья близнецов с генотипом F508del/R334W при муковисцидозе и возможности таргетной терапии. Вопросы практической педиатрии. 2022; 17(3): 74–82. DOI: 10.20953/1817-7646-2022-3-74-82

Health status of twins with cystic fibrosis and F508del/R334W genotype: opportunities of targeted therapy

E.I.Kondratyeva^{1,2}, A.Yu.Voronkova^{1,2}, A.S.Efremova¹, Yu.L.Melyanovskaya¹,
N.V.Bulatenko¹, T.B.Bukharova¹, N.D.Odinaeva², H.R. de Jonge³, D.V.Goldshtein¹

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation;

²Research Clinical Institute of Childhood of the Moscow Region, Moscow, Russian Federation;

³Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC Clinic, Rotterdam, The Netherlands

The *CFTR* gene contains 27 exons and is located at position 31.1 of the long arm of chromosome 7 (7q31.1). More than 2000 variants of the *CFTR* gene have been described so far. The R334W variant is associated with the mild disease course.

Objective. To perform comprehensive assessment of the health status, functional *CFTR* activity, and efficacy of *CFTR* modulators in twins with the F508del/R334W genotype.

Materials and methods. Data from medical records, intestinal current measurement (ICM), intestinal organoid culture.

Для корреспонденции:

Кондратьева Елена Ивановна, профессор, доктор медицинских наук, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза, заведующая кафедрой генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова; руководитель центра муковисцидоза Научно-исследовательского клинического института детства Министерства здравоохранения Московской области

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, 1

Телефон: (495) 111-0303

E-mail: elenafpk@mail.ru

ORCID: 0000-0001-6395-0407

Статья поступила 10.12.2021 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Elena I. Kondratyeva, MD, PhD, DSc, 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, Research Centre for Medical Genetics; Head of the Cystic Fibrosis Center of the Research Clinical Institute of Childhood of the Moscow Region

Address: 1 Moskvorech'e str., Moscow, 115478, Russian Federation

Phone: (495) 587-3366

E-mail: elenafpk@mail.ru

ORCID: 0000-0001-6395-0407

The article was received 10.12.2021, accepted for publication 30.06.2022

Results. We examined two twins with moderate cystic fibrosis who had similar clinical manifestations, including rhinosinusitis with nasal polyps and respiratory infections caused by gram-negative bacteria. Both patients also had polyvalent allergy. One child presented with a decrease of pancreatic elastase 1 in stool from 500 µg/g to 125 500 µg/g, which required administration of pancreatin and dosage increase later. Both children had reduced chloride channel function as demonstrated by ICM. The administration of a corrector (VX-809) and a potentiator (VX-770) effectively restored the channel function; their simultaneous use ensured an additive effect. The quantitative results obtained in both cultures of intestinal organoids were very similar.

Key words: cystic fibrosis, CFTR gene, pathogenic variant R334W, intestinal current measurement, intestinal organoids, forskolin-induced swelling assay, correctors, potentiators, targeted therapy, ivacaftor, lumacaftor

For citation: Kondratyeva E.I., Voronkova A.Yu., Efremova A.S., Melyanovskaya Yu.L., Bulatenko N.V., Bukharova T.B., Odinaeva N.D., de Jonge H.R., Goldshtein D.V. Health status of twins with cystic fibrosis and F508del/R334W genotype: opportunities of targeted therapy. *Vopr. prakt. pediatri. (Clinical Practice in Pediatrics)*. 2022; 17(3): 74–82. (In Russian). DOI: 10.20953/1817-7646-2022-3-74-82

Наибольшую трудность при муковисцидозе (МВ) представляет оценка вклада в развитие заболевания редких и ранее не идентифицированных мутаций, а также определение связи генотип–фенотип и влияния геномодификаторов на тяжесть заболевания [1].

Степень корреляции между генотипом и фенотипом *CFTR* различается в зависимости от системы органов [2]. В ходе поиска гена *CFTR* было показано, что аллельные варианты гена *CFTR* влияют на функцию поджелудочной железы (ПЖ) у пациентов с МВ. Используя маркеры, связанные с локусом МВ, исследователи из Торонто показали устойчивую связь между маркерами и нарушением экзокринной функции ПЖ [3].

Для персонализированного изучения остаточной функциональной активности канала *CFTR* используют метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП) [4, 5], позволяющий выделить «мягкие» варианты с остаточной функцией *CFTR*-канала и сохранением панкреатической функции и «тяжелые» варианты с отсутствием функции *CFTR*-канала и абсолютной панкреатической недостаточностью [6].

Для оценки влияния таргетных препаратов (*CFTR*-модуляторов) применяют форсколиновый тест на кишечных органоидах, получаемых из кишечных биоптатов пациентов [7, 8]. На основании результатов этих методов, разработанных под руководством Д.Бекмана около 10 лет назад, в ряде стран Европы (Нидерланды, Бельгия) у пациентов с МВ оценивают чувствительность к таргетным препаратам и назначают терапию *CFTR*-модуляторами в случае обнаружения положительного эффекта [7, 8].

Кишечные органويدы представляют собой замкнутые, с внутренней полостью (люменом) многоклеточные структуры длительного культивирования. Канал *CFTR* располагается на апикальной мембране органоедов, поэтому его активация при добавлении форсколина вызывает транспорт ионов хлора и воды в люмен и набухание органоедов. Скорость ответа на стимуляцию форсколином и степень набухания органоедов коррелируют с функциональной активностью *CFTR* [9].

Генетический вариант R334W c.1000C>T p.(Arg334Trp) представляет собой замену цитозина на тимин в положении 1000 в 8 экзоне. Вариант относится к IV классу, имеет «мягкий» генотип, находится на 13-м месте в Национальном регистре больных муковисцидозом 2019 г., его аллельная частота составляет 0,76% [10,11]. В базе *CFTR2* данный вариант занимает 34-е место по аллельной частоте и составляет 0,3% [12].

Особый интерес представляет изучение варианта R334W на модели кишечных органоедов у пациентов-близнецов с МВ из-за уникальности случая.

Цель: комплексное изучение состояния здоровья, функциональной активности канала *CFTR* и эффективности *CFTR*-модуляторов у близнецов с генотипом F508del/R334W.

Материалы и методы

Для оценки и описания клинической картины использовались выписки из историй болезни и амбулаторных карт пациентов.

Забор биоптатов из прямой кишки проводился на оборудовании Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-23OU). Исследование по методу ОРКП было выполнено согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 (СОПам) [13, 14] на клинической базе ГБУЗ МЗМО «Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области» (директор Одинаева Н.Д.) научно-клинического отдела муковисцидоза ФГБНУ МГНЦ (директор Куцев С.И.) по следующему алгоритму.

На первом этапе проводится калибровка каждой рециркуляционной камеры в отдельности на приборе VCC MC 8B421 Physiologic Instrument (США). Учитываются 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 помещается ректальный биопсийный материал. Забор трех биоптатов проводился с использованием оборудования Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-23OU) согласно инструкции. Размер биоптата составлял 3–5 мм. Биопсийный материал помещали в специальный слайдер, который далее вставляли в камеру. Камеры заполняли раствором буфера Meuler. Буфер готовится перед исследованием, в него входят: 105 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂·6H₂O, 20,2 mM NaHCO₃, 0,4 mM NaH₂PO₄·H₂O, 0,3 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM HEPES и 10 mM D-glucose, а также 0,01 mM индометацина. Регистрация исследования начиналась с записи базального тока короткого замыкания (µA/cm²) (стадия преамилорид).

На третьем этапе добавляли стимуляторы в следующей последовательности: амилорид (натриевый канал), форсколин/IBMX (хлорный канал), гинестеин (хлорный канал), карбахол (кальциевый канал), DIDS (анионный транспорт) и в конце – гистамин (кальциевый канал). Исследование заканчивали после записи базального тока короткого замыкания. В группу контроля вошли здоровые добровольцы. Пациенты с МВ, гомозиготные по F508del, вошли в группу сравнения (F508del/F508del) [6].

Методы получения стабильных культур кишечных органоидов и форсколиновый тест детально описаны ранее в статьях Kondratyeva E. (2020, 2021) [15, 16]. При проведении исследований за основу были взяты протоколы, разработанные под руководством Д.Бекмана [17–19]. Кишечные органоиды получали из образцов ректальной биопсии, культивирование проводили в толще «Матригеля» (Corning, США), пассирование осуществляли раз в 5–7 дней. Для форсколинового теста органоиды высевали на 96-луночные планшеты, добавляли 3,5 мкМ корректора VX-809 (Selleckchem, США). Через 24 ч органоиды окрашивали кальцеином (Biotium). Потенциатор VX-770 в концентрации 3,5 мкМ (Selleckchem, США) добавляли одновременно с форсколином (0,02–5 мкМ). Кишечные органоиды инкубировали с форсколином и таргетными препаратами в течение 1 ч и одновременно на определенных временных точках (0, 20, 40 и 60 мин) снимали заранее выбранные поля с использованием флуоресцентного микроскопа Observer D1 (Zeiss, Германия). Оценку набухания органоидов проводили при помощи программы Image J, статистическую обработку полученных данных – с помощью программы Sigma Plot 12.5.

Культуры кишечных органоидов, полученные от здоровых добровольцев с функциональным каналом CFTR (wt/wt) и от пациентов с МВ с генотипами F508del/F508del и CFTRdel2,3/W227X (I class/I class), являлись в данном исследовании контролем [15, 16].

Было получено разрешение на проведение исследования и подписано информированное согласие. Исследование и форма добровольного информированного согласия были одобрены Комитетом по этике ФГБНУ «МГНЦ» Минобрнауки России 15 октября 2018 г. (председатель Этического комитета – проф. Л.Ф.Курило).

Результаты исследования и их обсуждение

Под наблюдением находились 2 ребенка (монозиготные близнецы, мальчики) в возрасте 8 лет. Приводим данные из их истории болезни.

Оба мальчика наблюдаются с диагнозом: Муковисцидоз (E 84.8). Генотип R334W/F508del. Хронический гнойный обструктивный бронхит. Бронхоэктазы средней доли справа. Дыхательная недостаточность 0. Хронический полипозный гайморит. Хроническая панкреатическая недостаточность?

Микробиологический диагноз: Хроническая стафилококковая инфекция (MSSA).

Осложнение: Желчнокаменная болезнь.

Сопутствующий диагноз: Аллергический персистирующий ринит. Поллиноз. Атопический дерматит. Пищевая, пыльцевая аллергия. Аденоиды 2–3-й степени.

Дети, близнецы мужского пола, 2012 года рождения, с положительным неонатальным скринингом на МВ. Данные первого ребенка: ИРТ1 – 141,96 нг/мл, ИРТ2 – 96,15 нг/мл; данные второго ребенка: ИРТ1 – 296,5 нг/мл, ИРТ2 – 81,7 нг/мл, вес при рождении первого ребенка – 2860 г, второго ребенка – 2570 г.

Диагноз установлен в возрасте 3 мес. на основании положительной потовой пробы – 118 ммоль/л у первого ребенка и 120 ммоль/л – у второго ребенка (на аппарате «Нанодакт»), подтвержден ДНК-диагностикой. У обоих детей выявлены два патогенных варианта гена *CFTR* в компаунд-гетерозиготном состоянии F508del/R334W.

При дальнейшем обследовании детей на протяжении 6 лет выявлялось высокое содержание панкреатической эластазы 1 в кале – >500 мкг/г стула (норма от 200 мкг/г), что свидетельствовало о нормальной функции ПЖ. Однако у первого ребенка к 2019 г. (7 лет) отмечено снижение панкреатической эластазы 1 до 125 мкг/г стула с одновременно появившимися признаками панкреатической недостаточности (стул до 6 раз в сутки без применения панкреатических ферментов, обильный, видимая стеаторея) и потребностью в панкреатических ферментах. Отмечен положительный эффект от применения минимальной дозы панкреатина – 40 000–60 000 Ед в сутки, 1300–2000 Ед липазы/кг массы тела.

У обоих близнецов отмечались частые обструктивные бронхиты на фоне острых респираторных инфекций (ОРИ), в 2016 г. в возрасте 4 лет выявлен первичный рост грамотрицательной флоры в виде *Pseudomonas aeruginosa*, проведен курс эрадикационной терапии колистиметатом натрия в ингаляциях по 1 млн Ед 2 раза в день в сочетании с ципрофлоксацином 40 мг/кг/сутки в течение 1 мес. с дальнейшей пролонгацией ингаляций колистиметата натрия в течение 6 мес. Получен стойкий положительный эффект, в контрольных микробиологических исследованиях роста синегнойной палочки не регистрировалось.

В 2017 г. при микробиологическом исследовании выявлен рост *Achromobacter* spp., эрадикация произошла после 2-недельного курса внутривенной антибактериальной терапии (цефтазидим + амикацин) и ингаляций колистиметатом натрия в течение 12 мес. В дальнейшем роста *Achromobacter* spp. в контрольных бактериологических анализах не отмечалось.

Обследование

По данным компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки в возрасте 7 лет у обоих детей диагностированы сформированные бронхоэктазы с локализацией в средней доле. По данным КТ околоносовых пазух (7 лет) выявлен полипозный риносинусит у обоих детей.

Диагноз желчнокаменной болезни у обоих детей установлен по данным УЗИ в возрасте 7 лет. По данным непрямой эластометрии печени данных за фиброз печени нет (F0 METAVIR).

Дети наблюдаются аллергологом по поводу поливалентной аллергии (пищевой, пыльцевой, пылевой аллергии, а также на шерсть домашних животных). Установлен поллиноз с сезонным ухудшением состояния в период цветения растений. В анализах крови постоянно отмечается эозино-

Таблица 1. Показатели плотности тока короткого замыкания (ΔI_{sc}) при введении стимуляторов у пациентов-близнецов, несущих в генотипе вариант R334W

Table 1. Short-circuit current (ΔI_{sc}) after treatment with stimulators in twins carrying the R334W variant

| | ΔI_{sc} , $\mu A/cm^2$ | Амилорид / Amiloride | Форсколин/IBMX / Forskolin/IBMX | Генистеин / Genistein | Карбахол / Carbachol | DIDS | Гистамин / Histamine |
|--------------------------------------|--|-------------------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| Ребенок 1 / Child 1 | Биоптат № 1 / Biopsy #1 | -6 | 16,5 | 0,5 | 35 | 0,5 | 16 |
| | Биоптат № 2 / Biopsy #2 | -10 | 13 | 0,5 | 22 | 0,5 | 15,5 |
| | Биоптат № 3 / Biopsy #3 | -5 | 15,5 | 0,5 | 32,5 | 0,5 | 20,5 |
| | <i>M ± m</i> больного / of the patient | $-7 \pm 1,87$ | $15 \pm 1,27$ | 0,5 | $29,83 \pm 4,88$ | 0,5 | $17,33 \pm 1,95$ |
| Ребенок 2 / Child 2 | Биоптат №1 / Biopsy #1 | -80,5 | 27,5 | 0,5 | 21 | 0,5 | 13,5 |
| | Биоптат №2 / Biopsy #2 | -42,5 | 30 | 0,5 | 29 | 0,5 | 10 |
| | Биоптат №3 / Biopsy #3 | -77 | 27,5 | 0,5 | 33 | 0,5 | 26 |
| | <i>M ± m</i> больного / of the patient | $-66,67 \pm 14,85$ | $28,33 \pm 1,02$ | 0,5 | $27,67 \pm 4,32$ | 0,5 | $16,5 \pm 5,95$ |
| F508del/F508del | $-18,39 \pm 5,62$ | $3,06 \pm 0,89$ | $1,83 \pm 0,35$ | - | $1,83 \pm 0,35$ | $21,5 \pm 5,46$ | |
| Здоровые пациенты / Healthy controls | $7,67 \pm 1,76$ | $26,72 \pm 2,66$ | $2,08 \pm 0,38$ | $117,44 \pm 4,32$ | $1,92 \pm 0,37$ | $109,76 \pm 8,18$ | |

филия и повышение общего IgE до 1000-400 Ед/мл. Иммуноглобулины Е к *Aspergillus flavus* не обнаружены, аллергический бронхолегочный аспергиллез исключен.

Потребность в проведении курсов внутривенной антибактериальной терапии возникала редко. Дефицита витамина D нет.

Физическое развитие детей на протяжении жизни соответствует возрастным нормам или выше их. В возрасте 8 лет у первого ребенка: масса тела соответствует 96,5-му перцентилю (Z-score 1,62), рост соответствует 71,1-му перцентилю (Z-score 1,84), индекс массы тела (ИМТ) 18,9 кг/м² (96,5%, Z-score 1,84); у sibса масса тела – 90-й перцентиль (Z-score 1,62), рост – 75-й перцентиль (Z-score 1,84), ИМТ 18,9 кг/м² (96,5%, Z-score 1,84). Показатели функции внешнего дыхания в пределах нормы: ОФВ₁ – 105% у первого ребенка и 116% у второго. При осмотре в 8 лет: деформации грудной клетки, деформации дистальных фаланг пальцев, ногтевых пластинок не выявлено. Вне периодов обострения кашля не наблюдается.

Оба ребенка получают базисную терапию – панкреатические ферменты в количестве 2000 Ед/кг массы получает 1-й ребенок и 1300 Ед/кг массы его близнец, дорназу альфа 2,5 мг через мундштук и через «Пари синус», гипертонический раствор 7% с 0,1%-й гиалуроновой кислотой 5 мл 1 раз в день, урсодезоксихолевая кислота 500 мг в день, комплекс

жирорастворимых витаминов А, D, Е, К, мометазон 2 дозы в день. При ОРИ, обострениях назначается антибактериальная терапия широкого спектра действия.

Дети были обследованы с помощью метода ОРКП и форсколинового теста на кишечных органоидах. Представляет интерес описание работы хлорного канала у близнецов при помощи этих методов в связи с тем, что у одного ребенка имеется тенденция к снижению эластазы кала. Результаты метода ОРКП представлены в табл. 1 и на рис. 1, 2.

Плотность тока короткого замыкания (ΔI_{sc}) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $-7 \pm 1,87 \mu A/cm^2$ у первого ребенка и $-66,67 \pm 14,85 \mu A/cm^2$ у второго. Изменение ΔI_{sc} в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило у первого ребенка $15 \pm 1,27 \mu A/cm^2$ и $28,33 \pm 1,02 \mu A/cm^2$ у второго. В ответ на введение карбахола ΔI_{sc} изменяется в отрицательную сторону, что отражает апикальный отток ионов калия у обоих пациентов, и составила $29,83 \pm 4,88 \mu A/cm^2$ у первого и $27,67 \pm 4,32 \mu A/cm^2$ у второго. Добавление гистамина вызывает хлоридсекреторный ответ, опосредованный исключительно путем передачи сигнала Ca²⁺/протеинкиназа С, а не путем, опосредованным цАМФ, поэтому у пациентов с МВ кривая изменяется в отрицательную сторону. При этом плотность тока составила $17,33 \pm 1,95 \mu A/cm^2$ у первого ребенка и $16,5 \pm 5,95 \mu A/cm^2$ у второго.

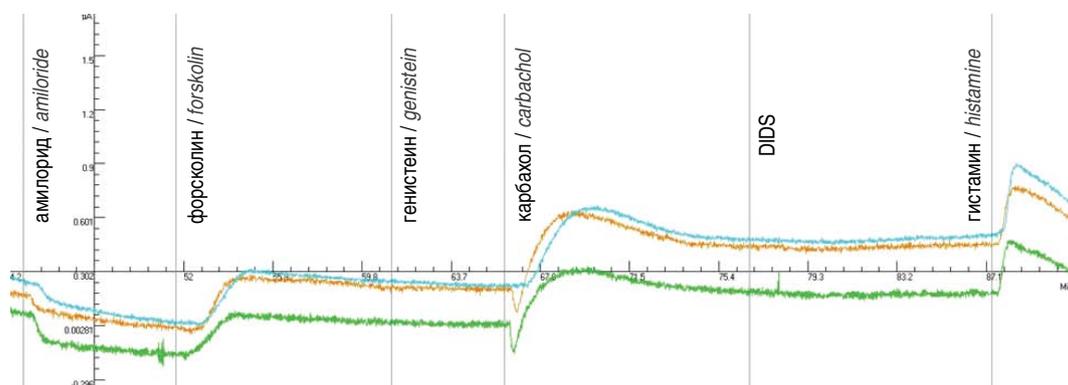


Рис. 1. Метод ОРКП. 1-й ребенок с генотипом R334W/F508del. При введении амилорида почти не происходило снижение тока короткого замыкания (ΔI_{sc}), ответ на форсколин/IBMX сниженный, а на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Fig. 1. Intestinal current measurements. First child with the R334W/F508del genotype. Amiloride caused almost no decrease in the short-circuit current (ΔI_{sc}); the response to forskolin/ IBMX was reduced; carbachol and histamine caused a reduction in the short-circuit current.

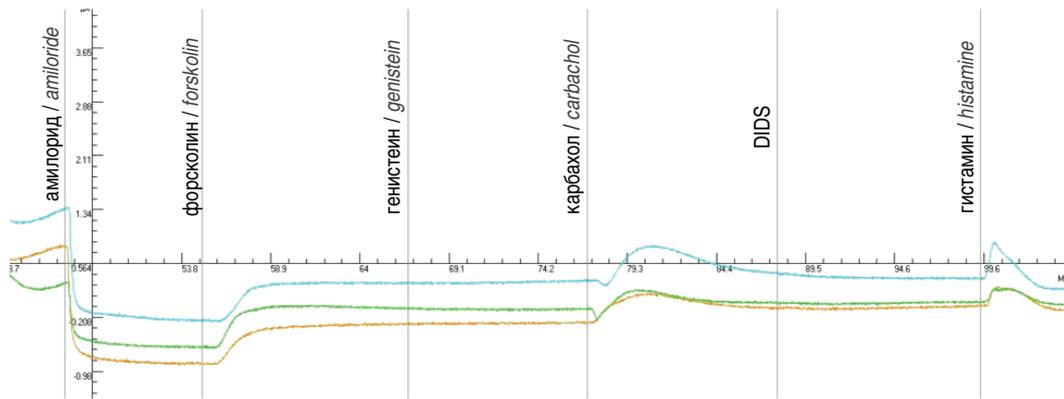


Рис. 2. Метод ОРКП. 2-й ребенок с генотипом R334W/F508del. При введении амилорида происходило сильное снижение тока короткого замыкания (ΔI_{sc}), ответ на форсколин/IBMX сниженный, а на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Fig. 2. Intestinal current measurements. Second child with the R334W/F508del genotype. Amiloride caused a significant decrease in the short-circuit current (ΔI_{sc}); the response to forskolin/IBMX was reduced; carbachol and histamine caused a reduction in the short-circuit current.

Сделано заключение, что в ответ на введение форсколина у обоих близнецов функция CFTR-канала была снижена, но более выражено – у первого близнеца. Работа натриевого канала у первого пациента соответствовала контрольной группе, у 2-го близнеца была повышена. Функционирование кальциевого канала было нарушено у обоих пациентов.

Наличие функционального канала CFTR (wt/wt) определяет фенотипические признаки кишечных органоидов. Органоиды, полученные от здоровых добровольцев, на ранних сроках культивирования (1–4 суток) чаще всего имеют сферическую форму, тонкие стенки и большой люмен (рис. 3). Культуры кишечных органоидов, полученные от пациентов-близнецов, морфологически не отличались между собой и от контрольной культуры с генотипом F508del/F508del. Они имели неправильную форму и сильно редуцированный люмен (рис. 3). Наличие «мягкой» мутации IV класса R334W не повлияло на морфологические признаки обеих исследуемых культур – количество органоидов с выраженным люменом не превышало данный показатель в контрольной культуре.

Анализ результатов набухания R334W/F508del-органов при стимуляции форсколином доказал высокую сохранность

остаточной функциональной активности канала CFTR при данном генотипе, которая безусловно связана с генетическим вариантом R334W. При воздействии форсколина в высокой концентрации (5 мкМ) культуры органоидов увеличиваются на 43–47% (табл. 2). Ответы носят концентрационно-зависимый характер и практически не отличаются между близнецами (рис. 4А, С и табл. 2). Контрольная культура (рис. 4Е) с «тяжелым» генотипом не отвечает при воздействии форсколина.

Оба исследуемых CFTR-модулятора увеличивают проводимость (потенциатор VX-770) и количество (корректор VX-809) белка CFTR, усиливают действие друг друга (VX-770 + VX-809) и положительно влияют на общую функциональную активность CFTR (рис. 4 А–D). При этом более эффективным оказался потенциатор, что наблюдается при мутациях, влияющих на кинетические характеристики (III и IV классы), а не на количество синтезируемого белка CFTR (II и V классы). При воздействии форсколина в концентрации 0,128 мкМ различия в эффективности наиболее очевидны – присутствие корректора не вызывает набухания органоидов при стимуляции форсколином, в отличие от потенциатора, который даже при слабом воздействии форсколина приводит к увеличению размера органоидов на 54–56%

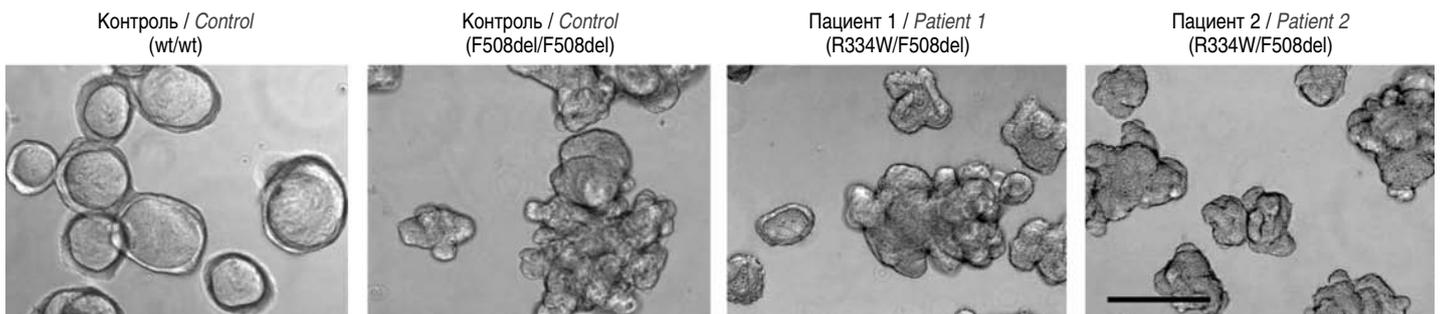


Рис. 3. Морфологические признаки кишечных органоидов от пациентов-близнецов с генотипом R334W/F508del в сравнении с контрольными культурами, несущими генотип F508del/F508del и два нормальных аллеля CFTR (wt/wt). Время культивирования – 4 суток. Масштабная шкала – 200 мкм.

Fig. 3. Morphological features of the intestinal organoids from twins with the R334W/F508del genotype compared with the control cultures carrying the F508del/F508del genotype and two normal CFTR alleles (wt/wt). Cultivation for 4 days. Scale – 200 μ m.

Таблица 2. Сравнительная таблица результатов по набуханию кишечных органоидов, полученных от близнецов с генотипом R334W/F508del, при часовой стимуляции форсколином и действии CFTR-модуляторов
 Table 2. Comparison of swelling of the intestinal organoids from twins with the R334W/F508del genotype after stimulation with forskolin and CFTR modulators

| Концентрация форсколина, мкМ / Forskolin concentration, μM | Обработка форсколином, %, $M \pm m$ / Treatment with forskolin, %, mean + SD | | Обработка форсколином и VX-770, %, $M \pm m$ / Treatment with forskolin and VX-770, %, mean + SD | | Обработка форсколином и VX-809, %, $M \pm m$ / Treatment with forskolin and VX-809, %, mean + SD | | Обработка форсколином и VX-809 + VX-770, %, $M \pm m$ / Treatment with forskolin and VX-809 + VX-770, %, mean + SD | |
|---|--|-------------------|--|-------------------|--|-------------------|--|-------------------|
| | П 1 | П 2 | П 1 | П 2 | П 1 | П 2 | П 1 | П 2 |
| 0,02 | 99,21 \pm 1,06 | 97,29 \pm 3,3 | 107,69 \pm 0,34 | 107,79 \pm 0,28 | 101,78 \pm 1,03 | 98,86 \pm 1,33 | 112,90 \pm 0,4 | 111,98 \pm 0,57 |
| 0,128 | 104,2 \pm 1,25 | 102,40 \pm 0,72 | 154,09 \pm 0,72 | 156,73 \pm 0,8 | 103,61 \pm 0,2 | 104,86 \pm 1,27 | 174,87 \pm 1,35 | 176,73 \pm 0,41 |
| 0,8 | 125,59 \pm 1,89 | 127,08 \pm 0,96 | 163,93 \pm 0,86 | 169,80 \pm 1,17 | 154,42 \pm 1,73 | 151,48 \pm 1,32 | 176,25 \pm 0,83 | 181,56 \pm 2,31 |
| 5 | 143,66 \pm 1,26 | 147,09 \pm 0,44 | 186,06 \pm 0,26 | 186,75 \pm 1,06 | 181,80 \pm 0,36 | 180,75 \pm 0,38 | 197,42 \pm 0,84 | 204,63 \pm 1,19 |

П 1 и П 2 – пациенты 1 и 2; за 100% принимали размер органоидов до начала воздействия форсколином; число повторов – 6; концентрации VX-770 и VX-809 – 3,5 мкМ.
 P 1 and P 2 – patients 1 and 2; the size of organoids before treatment with forskolin was considered as 100%; the number of repeats was 6; concentrations of VX-770 and VX-809 were 3.5 μM .

(рис. 4 А, С и табл. 2). В отношении контрольной культуры с мутациями I класса ни потенциатор, ни корректор не оказали положительного эффекта (рис. 4 Е, F).

Сравнительный анализ полученных для близнецов результатов обнаружил лишь незначительные отклонения в ответах на одинаковые стимулы, у пациента 2 наблюдались повышенные на 2–6% значения при одновременном воздействии форсколином, VX-809 и VX-770 (табл. 2). Статистически значимых отличий между результатами, полученными на двух культурах кишечных органоидов, не было.

Течение МВ у детей-близнецов средней тяжести, с одноклеточными клиническими проявлениями: развитие полипозного риносинусита, эпизоды роста грамотрицательной флоры в респираторном тракте. Отягощающим сопутствующим заболеванием у обоих детей является поллиноз на фоне поливалентной аллергии. Динамическое определение количества панкреатической эластазы 1 у первого ребенка показало ее снижение с 500 до 125 мкг/г стула, что потребовало назначения панкреатина и увеличения дозы при дальнейшем наблюдении. Необходимо обследование детей в динамике для верификации панкреатической недостаточности, которая может манифестировать с годами при «мягких» генотипах. Однако более высокий показатель ИРТ1 отмечался при рождении у 2-го ребенка.

У близнецов получены различные результаты при оценке функционирования натриевого и хлорного канала методом ОРКП. В ответ на введение форсколина у обоих близнецов функция CFTR-канала была снижена и соответствовала «мягким» генетическим вариантам. Снижение функции CFTR-канала было более выражено у первого близнеца, что сопровождалось снижением панкреатической эластазы в динамике. Работа натриевого канала у первого пациента соответствовала контрольной группе, в отличие от второго пациента. У второго ответ был выше, возможно, причина – влияние генов-модификаторов, в том числе стимуляторов натриевых каналов [20].

У обоих пациентов функция кальциевого канала, которая участвует в секреции хлоридов без вовлечения цАМФ [21], отличалась от нормального функционирования в связи со снижением функции CFTR-канала. При добавлении стимуляторов кальциевого канала (карбахол и гистамин) у здоро-

вой группы кривая идет в положительную сторону, в то время как у обоих пациентов кривая идет вниз [6].

Ранее на культурах кишечных органоидов с генетическим вариантом R334W уже исследовали остаточную функциональную активность канала CFTR и действие таргетных препаратов [18, 22, 23]. Полученные для пациентов-близнецов результаты полностью соотносятся с ранее опубликованными литературными данными. Форсколин-индуцированное набухание органоидов в статьях J.Dekkers et al. [18] и G.Berkers et al. [22] подтверждают относительно высокую сохранную активность CFTR для мутации R334W.

В исследованиях G.Berkers и A.S.Ramalho корректор VX-809 (люмакафтор) оказывал слабое, а потенциатор VX-770 (ивакафтор) – значительное влияние на восстановление функциональной активности канала CFTR, при комбинированном воздействии VX-809 и VX-770 происходило значительное, указывающее на возможный терапевтический эффект VX-809 + VX-770, набухание органоидов с генотипами R334W/F508del (II класс) и R334W/N1303K (II класс), [22,23]. Для пациента с гетерозиготным генотипом R334W/R746X (I класс) комбинированное применение VX-770 + VX-809 оказало умеренное влияние на функциональную активность канала [18]. Результаты, полученные для близнецов с генотипом R334W/F508del, коррелируют с литературными данными – в наших исследованиях значительный эффект на восстановление функции белка CFTR также был обнаружен в случаях применения потенциатора VX-770 и при совместном воздействии потенциатора и корректора.

Мутация R334W локализована в TM6 домена MSD1 и связана со снижением проводимости канала на 60% из-за нарушения ион-ионных взаимодействий внутри ионной поры CFTR [23], именно по этой причине высокая эффективность обнаружена для потенциатора VX-770, а также при совместном применении потенциатора и корректора как в наших исследованиях, так и в ранее опубликованных [18, 22, 23].

В настоящее время генетический вариант R334W отсутствует в инструкции к ивакафтору [24]. Проведенное исследование демонстрирует возможный эффект для этих пациентов.

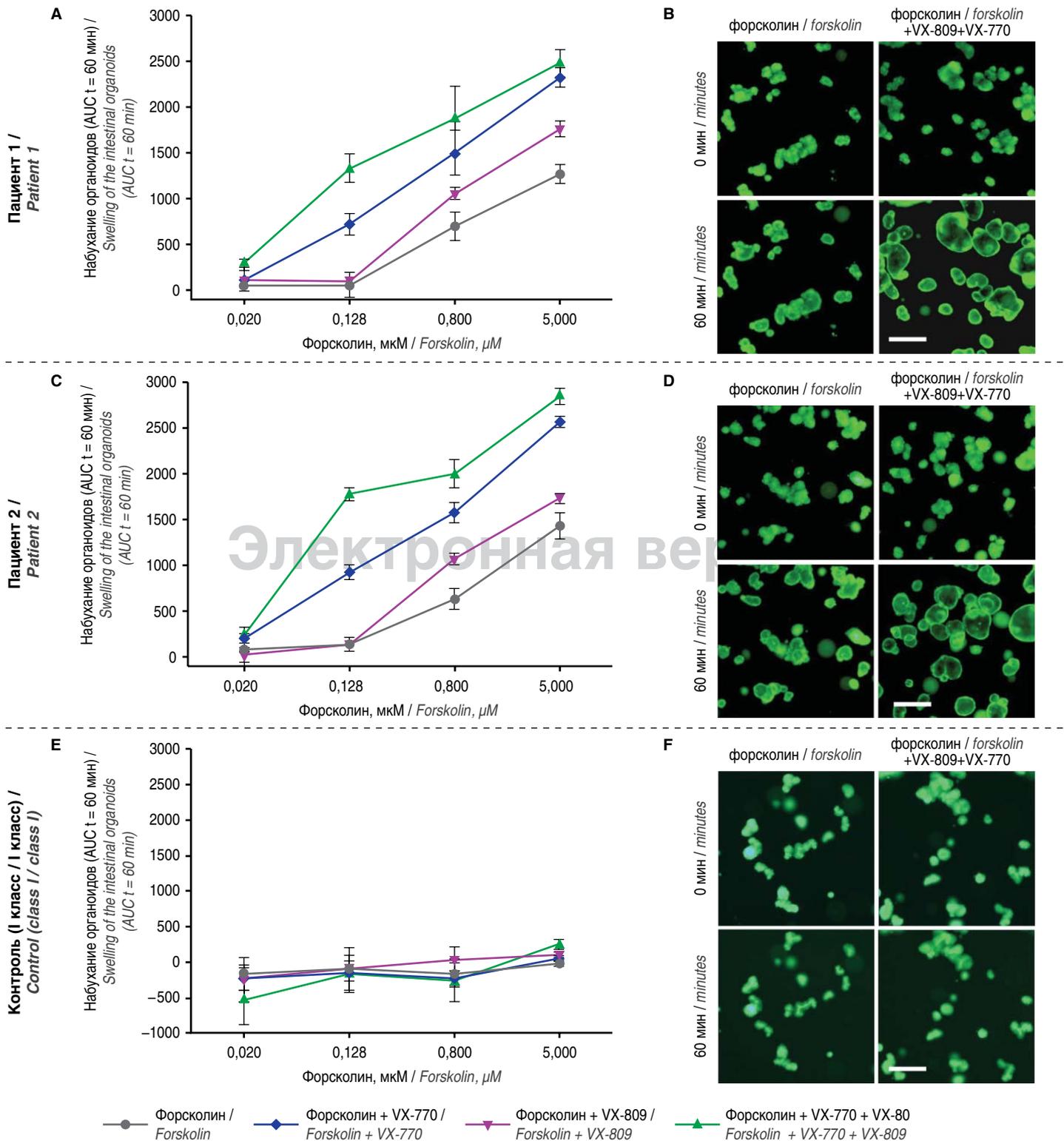


Рис. 4. Исследование на модели кишечных органоидов, полученных от близнецов с генотипом R334W/F508del, остаточной функциональной активности канала CFTR и эффективности потенциатора VX-770 и корректора VX-809. Контрольная культура – органоиды с генотипом CFTRdel2,3/W227X (I class / I class). А, С и Е – результаты количественного анализа форсколин-индуцированного набухания органоидов; В, D и F – характерные изображения органоидов до начала воздействия форсколином и CFTR-модуляторами и после часовой инкубации. Концентрации – 0,8 мкМ форсколина (пациенты 1 и 2) и 5 мкМ форсколина (контроль), 3,5 мкМ VX-770 и 3,5 мкМ VX-809. Масштабная шкала – 200 мкм.

Fig. 4. Assessment of the residual CFTR function and the effectiveness of the VX-770 potentiator and VX-809 corrector using a model of intestinal organoids obtained from twins with the R334W/F508del genotype. Control culture: organoids with the CFTRdel2,3/W227X genotype (I class/I class). A, C, and E – results of the quantitative analysis of forskolin-induced swelling of the organoids; B, D, and F – images of organoids before treatment with forskolin and CFTR modulators and after 1-hour incubation. Concentrations: forskolin – 0.8 μM (patients 1 and 2) and 5 μM (control); VX-770 – 3.5 μM; VX-809 – 3.5 μM. Scale – 200 μm.

Заключение

Несмотря на то, что близнецы имеют одинаковый генотип, фенотипические проявления течения заболевания со временем у данной пары близнецов начинают различаться. Первый пациент с течением времени демонстрирует ухудшение внешнесекреторной функции ПЖ по результатам снижения панкреатической эластазы с развитием кишечного синдрома, потребовавшим назначения панкреатических ферментов.

Методами ОРКП и кишечных органоидов обнаружена остаточная функция канала CFTR. Более значимое снижение функции CFTR-канала первого близнеца при исследовании методом ОРКП было ассоциировано со снижением функции ПЖ.

Особый интерес представляло изучение варианта R334W на модели кишечных органоидов у пациентов-близнецов с МВ из-за уникальности случая. Культуры кишечных органоидов, полученные от обоих близнецов с генотипом F508del/R334W, отвечали сильным набуханием на стимуляцию форсколином, что свидетельствует о наличии сохранной остаточной функциональной активности канала CFTR. Применение корректора (VX-809) и потенциатора (VX-770) эффективно восстанавливает работу канала, при их совместном воздействии наблюдается аддитивный эффект. Полученные на обеих культурах количественные результаты были очень близки по значениям. На основании проведенных исследований сделан вывод, что для пациентов с генетическим вариантом R334W может быть рекомендована как терапия комбинированными препаратами, сочетающими VX-770 и VX-809 (ивакафтор и лумакафтор), так и монотерапия ивакафтором (VX-770).

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» и при финансовой поддержке благотворительного фонда «Острова».

Financial support

The work has been carried out within the framework of the government assignment to the Research Centre for Medical Genetics and with the financial support of the Charitable Foundation «Ostrova».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is not conflict of interests.

Информированное согласие

При проведении исследования было получено информированное согласие пациентов или их родителей либо законных представителей.

Informed consent

In carrying out the study, written informed consent was obtained from all patients or their parents or legal representatives.

Литература / References

1. Кондратьева ЕИ, Каширская НЮ, Капранов НИ (коорд.) Национальный консенсус. Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия. М.: Боргес; 2016. / Kondrat'eva EI, Kashirskaya NYu, Kapranov NI (koord.) Natsional'nyi konsensus. Mukovistsidoz: opredelenie, diagnosticheskie kriterii, terapiya. M.: Borges Publ; 2016. (In Russian).
2. Ferec C, Cutting GR. Assessing the Disease-Liability of Mutations in *CFTR*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Dec 1;2(12):a009480. DOI: 10.1101/cshperspect.a009480
3. Kerem BS, Buchanan JA, Durie P, Corey ML, Levison H, Rommens JM, et al. DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. Am J Hum Genet. 1989 Jun;44(6):827-34.
4. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. J Pediatr. 2017 Feb;181S:S4-S15.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064
5. Кистозный фиброз (муковисцидоз) (взрослые и дети). Клинические рекомендации. 2020. / Kistoznyi fibroz (mukovistsidoz) (vzroslye i deti). Klinicheskie rekomendatsii. 2020. (In Russian).
6. Мельяновская ЮЛ, Кондратьева ЕИ, Куцев СИ. Определение референтных значений для метода определения разности кишечных потенциалов в РФ. Медицинский вестник Северного Кавказа 2020;15(2):162-165. / Melyanovskaya JL, Kondratieva 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):162-165. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039 (In Russian).
7. Beekman JM. Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors. Pediatr Pulmonol. 2016 Oct;51(S44):S23-S34. DOI: 10.1002/ppul.23553
8. Noordhoek J, Gulmans V, van der Ent K, Beekman JM. Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: a successful patient-oriented research collaboration. Curr Opin Pulm Med. 2016 Nov;22(6):610-6. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000315
9. Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. Nat Med. 2013 Jul;19(7):939-45. DOI: 10.1038/nm.3201
10. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2019 год. Под ред. Каширской НЮ, Кондратьевой ЕИ, Красовского СА, Стариновой МА, Воронковой АЮ, Амелиной ЕЛ, Ашеровой ИК. М.: Медпрактика-М, 2021. / Registr bol'nykh mukovistsidozom v Rossiiskoi Federatsii. 2019 god. Pod red. Kashirskoi NYu, Kondrat'evoi EI, Krasovskogo SA, Starinovi MA, Voronkovi AYu, Amelinoi EL, Asherovoi IK. M.: Medpraktika-M Publ, 2021. (In Russian).
11. Petrova NV, Kashirskaya NY, Vasilyeva TA, Kondratyeva EI, Zhekaite EK, Voronkova AY, et al. Analysis of *CFTR* Mutation Spectrum in Ethnic Russian Cystic Fibrosis Patients. Genes (Basel). 2020 May 15;11(5):554. DOI: 10.3390/genes11050554
12. CFTR2. Available at: https://cftr2.org/mutations_history
13. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. Thorax. 2010 Jul;65(7):594-9. DOI: 10.1136/thx.2009.125088
14. Clancy JP, Szczesniak RD, Ashlock MA, Ernst SE, Fan L, Hornick DB, et al. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. PLoS One. 2013 Sep 10;8(9):e73905. DOI: 10.1371/journal.pone.0073905
15. Kondratyeva E, Efremova A, Melyanovskaya Y, Petrova N, Satsuk N, Bulatenko N, 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 Nov 30;761:145023. DOI: 10.1016/j.gene.2020.145023
16. Kondratyeva E, Bukharova T, Efremova A, Melyanovskaya Y, Bulatenko N, Davydenko K, 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 May 28;12(6):837. DOI: 10.3390/genes12060837
 17. Boj SF, Vonk AM, Statia M, Su J, Vries RR, Beekman JM, et al. Forskolin-induced Swelling in Intestinal Organoids: An In Vitro Assay for Assessing Drug Response in Cystic Fibrosis Patients. *J Vis Exp*. 2017 Feb 11;(120):55159. DOI: 10.3791/55159
 18. Dekkers JF, Berkers G, Kruisselbrink E, Vonk A, de Jonge HR, Janssens HM, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med*. 2016 Jun 22;8(344):344ra84. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad8278
 19. Vonk AM, van Mourik P, Ramalho AS, Silva IAL, Statia M, Kruisselbrink E, et al. Protocol for Application, Standardization and Validation of the Forskolin-Induced Swelling Assay in Cystic Fibrosis Human Colon Organoids. *STAR Protoc*. 2020 Jun 3;1(1):100019. DOI: 10.1016/j.xpro.2020.100019
 20. Pinto MC, Silva IAL, Figueira MF, Amaral MD, Lopes-Pacheco M. Pharmacological Modulation of Ion Channels for the Treatment of Cystic Fibrosis. *J Exp Pharmacol*. 2021 Jul 23;13:693-723. DOI: 10.2147/JEP.S255377
 21. Graeber SY, Vitzthum C, Mall MA. Potential of Intestinal Current Measurement for Personalized Treatment of Patients with Cystic Fibrosis. *J Pers Med*. 2021 May 8;11(5):384. DOI: 10.3390/jpm11050384
 22. Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, et al. Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis. *Cell Rep*. 2019 Feb 12;26(7):1701-1708.e3. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.068
 23. Ramalho AS, Fürstová E, Vonk AM, Ferrante M, Verfaillie C, Dupont L, et al; Belgian Organoid Project. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2021 Jan 5;57(1):1902426. DOI: 10.1183/13993003.02426-2019
 24. Cystic Fibrosis Foundation. Available at: <https://www.cff.org/Life-With-CF/Treatments-and-Therapies/Medications/CFTR-Modulator-Therapies>
- Ефремова Анна Сергеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова
E-mail: anna.efremova.83@gmail.com
- Мельяновская Юлия Леонидовна, научный сотрудник научно-клиническим отделом муковисцидоза Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова
E-mail melcat@mail.ru
- Булатенко Наталья Вадимовна, младший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова
E-mail: bnv695@gmail.com
- Бухарова Татьяна Борисовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова
E-mail: bukharova-rmt@yandex.ru
- Одинаева Нуриноса Джумаевна, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского клинического института детства Министерства здравоохранения Московской области
E-mail: nig05@mail.ru
- де Йонге Хьюго Р., кандидат медицинских наук, профессор, руководитель подразделения гастроэнтерологии и гепатологии клиники Erasmus MC, Роттердам, Нидерланды
E-mail: h.dejonge@erasmusmc.nl
- Гольдштейн Дмитрий Вадимович, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра
E-mail: dvgoldrm7@gmail.com

For correspondence:

Anna Yu. Voronkova, MD, PhD, Leading Researcher of the Scientific and Clinical Department of Cystic of the Research Centre for Medical Genetics; pediatrician of the Department of Cystic Fibrosis of the Research Clinical Institute of Childhood of the Moscow Region
E-mail: voronkova111@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-8183-7990

Anna S. Efremova, PhD of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Research Centre for Medical Genetics
E-mail: anna.efremova.83@gmail.com

Yulia L. Melyanovskaya, Researcher, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Research Centre for Medical Genetics
E-mail melcat@mail.ru

Natalya V. Bulatenko, Junior Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Research Centre for Medical Genetics
E-mail: bnv695@gmail.com

Tatyana B. Bukharova, PhD of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Stem Cell Genetics, Research Centre for Medical Genetics
E-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Nuriniso D. Odinaeva, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the Research Clinical Institute of Childhood of the Moscow Region
E-mail: nig05@mail.ru

Hugo R. de Jonge, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC Clinic, Rotterdam
E-mail: h.dejonge@erasmusmc.nl

Dmitry V. Goldshtein, PhD, DSc of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Stem Cell Genetics, Research Centre for Medical Genetics
E-mail: dvgoldrm7@gmail.com

Для корреспонденции:

Воронкова Анна Юрьевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова; врач-педиатр отделения муковисцидоза Научно-исследовательского клинического института детства Министерства здравоохранения Московской области
E-mail: voronkova111@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-8183-7990