

# Подбор CFTR-модуляторов для детей – носителей генетического варианта W1282R

А.Ю.Воронкова<sup>1</sup>, Н.В.Булатенко<sup>1</sup>, Ю.Л.Мельяновская<sup>1</sup>, А.С.Ефремова<sup>1</sup>,  
Т.Б.Бухарова<sup>1</sup>, С.И.Куцев<sup>1</sup>, Х.Р. де Йонге<sup>2</sup>, Н.В.Петрова<sup>1</sup>, Д.В.Гольдштейн<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Отделение гастроэнтерологии и гепатологии клиники Erasmus MC, Роттердам, Нидерланды

**Цель.** Изучение клинической картины, функциональной активности канала трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза (CFTR) и эффективности CFTR-модуляторов у пациентов с W1282R.

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

**Результаты.** Вариант с.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R) относится к миссенс-мутациям. В Регистре больных муковисцидозом (МВ) РФ 2019 г. есть сведения о 34 пациентах с вариантом W1282R в генотипе. Клиническая картина двух пациентов с вариантом W1282R соответствует тяжелому течению МВ. При проведении ОРКП выявлено отсутствие функции CFTR. Для каждого пациента на модели КО оценили влияние корректора VX-809, потенциатора VX-770 и их комплексный эффект.

**Заключение.** Результаты свидетельствовали о «тяжелом» генетическом варианте W1282R. Применение корректора VX-809 не повлияло на восстановление функции хлорного канала, в отличие от контрольного образца F508del-гомозигота (II класс мутаций). Потенциатор VX-770 не оказал эффекта на кинетические свойства белка CFTR. Но для обоих пациентов зафиксировано значительное восстановление утраченной функции канала (~45%) при совместном применении корректора VX-809 и потенциатора VX-770, что характерно для вариантов III–IV классов. Это ставит под сомнение выводы, что W1282R имеет характеристики только II класса мутаций. Пациентам с генотипами W1282R/CFTRdel2,3 и W1282R/F508del может быть рекомендована терапия препаратом, сочетающим VX-809 и VX-770.

**Ключевые слова:** муковисцидоз, ген CFTR, патогенный вариант W1282R, метод определения разности кишечных потенциалов, кишечные органоиды, форсколиновый тест, корректоры, потенциаторы, таргетная терапия, ивакафтор, лумакафтор

**Для цитирования:** Воронкова А.Ю., Булатенко Н.В., Мельяновская Ю.Л., Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Куцев С.И., Х.Р. де Йонге, Петрова Н.В., Гольдштейн Д.В. Подбор CFTR-модуляторов для детей – носителей генетического варианта W1282R. Вопросы практической педиатрии. 2022; 17(3): 83–91. DOI: 10.20953/1817-7646-2022-3-83-91

## Selection of CFTR modulators for children with the W1282R variant

A.Yu.Voronkova<sup>1</sup>, N.V.Bulatenko<sup>1</sup>, Yu.L.Melyanovskaya<sup>1</sup>, A.S.Efremova<sup>1</sup>,  
T.B.Bukharova<sup>1</sup>, S.I.Kutsev<sup>1</sup>, H.R. de Jonge<sup>2</sup>, N.V.Petrova<sup>1</sup>, D.V.Goldshtein<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC Clinic, Rotterdam, The Netherlands

**Objective.** To study the clinical manifestations of W1282R variant, functional activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel, and effectiveness of CFTR modulator therapy in patients with the W1282R variant.

**Materials and methods** included medical records, intestinal current measurement method (ICM) and method of intestinal organoids (IO).

**Results.** The c.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R) variant refers to missense mutations. The Cystic Fibrosis (CF) Patient Registry of the Russian Federation (2019) provides the data on 34 patients with the W1282R variant in the genotype. Clinical manifestations in two patients with the W1282R variant corresponds to the severe course of CF. ICM method revealed the loss of CFTR function. The effect of VX-809 corrector, VX-770 potentiator and their combined use were assessed in each patient using the method of IO.

**Conclusion.** The results indicated a “severe” W1282R variant. The application of VX-809 corrector had no effect on the restoration of chloride channel function, unlike the F508del homozygous control sample (class II mutations). The VX-770 potentiator had no effect on the kinetic properties of CFTR protein. But in both patients, a significant restoration of lost channel function (~45%) was recorded with the combined use of VX-809 corrector and VX-770 potentiator, which is typical for class III and class IV variants. This challenges the conclusions that the W1282R variant has class II characteristics only. Combination

### Для корреспонденции:

Мельяновская Юлия Леонидовна, научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, 1

Телефон: (495) 111-0303

E-mail: melcat@mail.ru

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

### For correspondence:

Yulia L. Melyanovskaya, Researcher, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Research Centre for Medical Genetics

Address: 1 Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

Phone: (495) 111-0303

E-mail: melcat@mail.ru

The article was received 10.12.2021, accepted for publication 30.06.2022

therapy with VX-809 and VX-770 may be recommended for patients with the W1282R/CFTRdel2,3 and W1282R/F508del genotypes.

**Key words:** cystic fibrosis, CFTR gene, W1282R pathogenic variant, intestinal current measurement method, intestinal organoids, forskolin-induced swelling assay, correctors, potentiators, target therapy, ivacaftor, lumacaftor

**For citation:** Voronkova A.Yu., Bulatenko N.V., Melyanovskaya Yu.L., Efremova A.S., Bukharova T.B., Kutsev S.I., de Jonge H.R., Petrova N.V., Goldshtein D.V. Selection of CFTR modulators for children with the W1282R variant. *Vopr. prakt. pediatri. (Clinical Practice in Pediatrics)*. 2022; 17(3): 83–91. (In Russian). DOI: 10.20953/1817-7646-2022-3-83-91

**М**уковисцидоз (МВ) – моногенное заболевание, обусловленное патогенными вариантами нуклеотидной последовательности (ранее называемыми мутациями) гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (*CFTR*) (ABCC7). 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*. По состоянию на 24 сентября 2021 г. на веб-сайте международного проекта CFTR2 представлено 382 клинически значимых генетических варианта *CFTR* [1].

Впервые вариант с.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R) был описан российским исследователем Т.Э.Иващенко с соавт. в 1993 г. у одного русского пациента [2]. Тогда же вариант был зарегистрирован в базе Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1).

Патогенный вариант с.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R) относится к наиболее распространенному типу, миссенс-мутациям. В результате мутации с.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R) происходит замена остатка триптофана на остаток аргинина в положении 1282-й молекулы белка (рис. 1).

Данный вариант располагается во втором нуклеотид-связывающем домене (NBD2). Оба NBD содержат несколько высоко консервативных мотивов, которые, как предполагают, участвуют в связывании и гидролизе АТФ. Помимо базы CFTR1, вариант W1282R включен в базы данных CLINVAR, EXAC. Вариант W1282R не представлен в базе данных CFTR2. CLINVAR рассматривает вариант W1282R как вариант с неизвестным функциональным значением.

С использованием ресурса Missense3D (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~missense3d>) проведено моделирование третичной структуры (3D) молекулы CFTR, содержащей остаток аргинина (R, Arg) в положении 1282 вместо остатка триптофана (W, Trp) (рис. 2). Замена W1282R меняет внутренний

гидрофобный незаряженный остаток (TRP, RSA 0,8%) на гидрофильный заряженный остаток (ARG, RSA 1,2%). Эта замена не изменяет вторичную структуру 'H'-белка ( $\alpha$ -спираль – 4 аминокислоты на звено – поворот). Эта замена не приводит к полному разрушению всех типов водородных связей (боковая цепь / боковая цепь и/или боковая цепь / главная цепь), образованных внутренним остатком TRP (RSA 0,8%). Замена W1282R приводит к расширению объема полости на 29,16 Å<sup>3</sup>.

В Российском регистре больных МВ за 2019 г. [3] приведены сведения о 34 пациентах, несущих вариант W1282R, из 32 неродственных семей. Относительная частота варианта W1282R составила 0,56% от всех идентифицированных мутантных аллелей гена *CFTR* в российской популяции.

**Цель.** Изучение клинической картины, функциональной активности канала трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза (*CFTR*) и эффективности CFTR-модуляторов у пациентов с W1282R.

## Материалы и методы

Для оценки состояния и описания клинической картины использовались данные из выписок из историй болезни и амбулаторных карт пациентов. Специфические генотипы пациентов представлены в табл. 1.

Метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП) используется для диагностики функции *CFTR*, позволяет дифференцировать мутации I–III классов (без детектируемой активности *CFTR*) с мутациями IV–VI классов (с остаточной активностью *CFTR*) [4, 5].

Забор биоптатов из прямой кишки проводился на оборудовании Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-23OU). Исследование по методу ОРКП

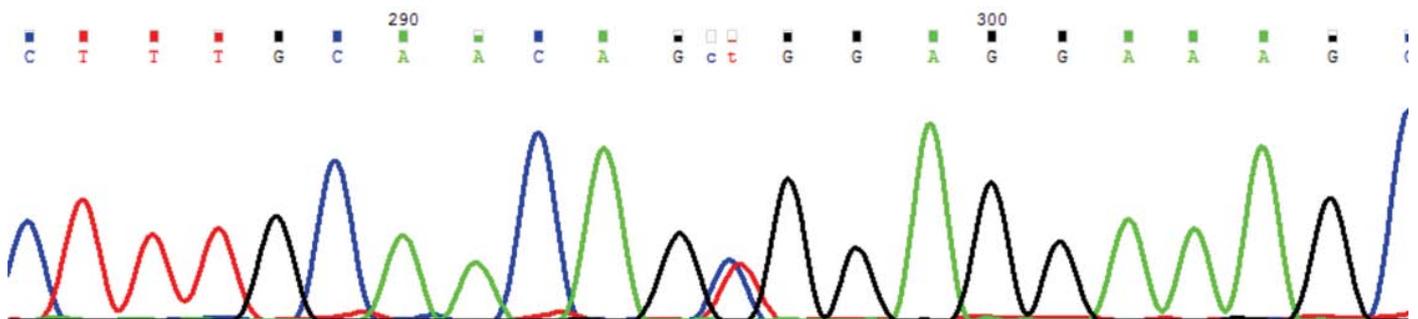


Рис. 1. Хроматограмма результатов секвенирования фрагмента ДНК, содержащего 23-й экзон гена *CFTR* с мутацией с.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R).

Fig. 1. Chromatogram of the results of sequencing a DNA fragment containing 23 exon of the *CFTR* gene with mutation c.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R).

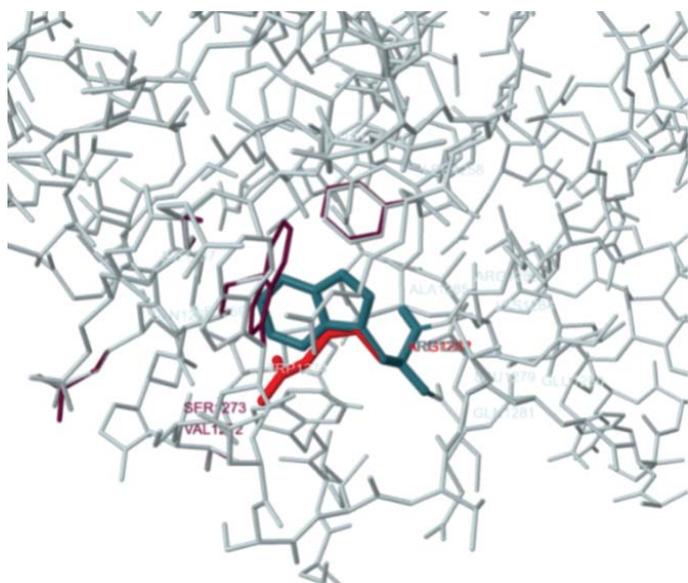


Рис. 2. 3D-моделирование молекулы белка CFTR, содержащего замену W1282R, в сравнении с белком нормального типа. Серым цветом обозначен остаток Trp1282, красным – остаток Arg1282.

Fig. 2. 3D modeling of a CFTR protein molecule containing the W1282R substitution in comparison with a normal type protein. The Trp1282 residue is gray, and the Arg1282 residue is red.

было выполнено согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7\_26.10.11 (СОПам) [6, 7] на клинической базе научно-клинического отдела муковисцидоза ФГБНУ МГНЦ (руководитель – проф. Кондратьева Е.И.) по нижеследующему 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 CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20,2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES и 10 mM D-glucose, а также 0,01 mM индометацина. Регистрация исследования начиналась с записи базального тока короткого замыкания (μA/cm<sup>2</sup>) (стадия пре-амилорид).

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 замы-

Таблица 1. Генотипы пациентов, принимавших участие в исследовании

Table 1. Genotypes of patients who participated in the study

Биопсия пациента / Patient biopsy	Генотип органоидов (Специфический генотип) / Genotype of organoids (Specific genotype)	Класс мутации MB / Class of CF mutations
1	W1282R / CFTRdel2,3	II класс / I класс / Class I / II
2	W1282R / F508del	II класс / II класс / Class II / III

кания. В группу контроля вошли здоровые добровольцы. Пациенты с MB, гомозиготные по F508del, вошли в группу сравнения (F508del/F508del) [4].

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 – проф. Л.Ф.Курило).

Культуры органоидов кишечника получены в соответствии с протоколами, разработанными в Нидерландах группой ученых под руководством Дж.Бекмана [8–10]. Для создания органоидных культур толстого кишечника человека использовали ранее описанный метод выделения крипт из ректальных биоптатов [11]. Изолированные из первичного кишечного материала крипты высевали на 24-луночные планшеты в толще 50%-го внеклеточного матрикса («Матригель», Corning, США) согласно протоколам, описанным ранее в исследовании A.Vonk et al. [8]. Полученные культуры пассировали ~1 раз в неделю, поддерживая стандартные условия: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Обновление культуральной среды (Human Colon Organoid Medium/HCOM) проводили каждые 2–3 суток.

Обработка кишечных органоидов форсколином вызывает цАМФ-зависимую активацию канала CFTR и их набухание, ответ органоидов на стимуляцию форсколином напрямую зависит от функции CFTR [9–11]. Данный принцип положен в основу теста, названного CFTR-зависимое форсколин-индуцированное набухание (FIS – Forskolin-Induced Swelling Assay), который позволяет персонализировано изучать остаточную активность хлорного канала CFTR у пациентов с MB и прогнозировать индивидуальный ответ *in vivo* на терапию CFTR-модуляторами, направленную на восстановление функции мутантного CFTR. Функция белка трансмембранного регулятора проводимости MB и его восстановление модуляторами CFTR могут быть определены количественно с использованием анализа степени набухания, вызванного форсколином (адаптирован согласно протоколам Dekkers et al.) [10]. Под действием форсколина происходит активация цАМФ, в результате чего внутрь полости органоидов за счет осмоса поступает вода и ионы Cl<sup>-</sup>. Культуры ректальных органоидов высевали в каплях матригеля в 96-луночные планшеты с плоским дном, полимеризовали 15–20 мин и далее вносили в ячейки планшета по 50 мкл среды HCOM, с корректором 3,5 мкМ VX-809 (Selleckchem, США) либо без него. Инкубировали 20–24 ч при 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, после чего проводили прижизненное окрашивание 0,85 мкМ раствором Calcein green (Biotium). Затем помещали 96-луночный планшет в CO<sub>2</sub>-камеру флуоресцентного микроскопа Observer D1 (Zeiss, Германия), задав предварительно координаты (x, y, z) для каждой точки, время съемки (60 мин с интервалом 20 мин) и количе-

ство циклов (4, где цикл I соответствует  $t = 0$  мин). Перед началом эксперимента культуры органоидов стимулировали форсколином (fsk, 5; 0,8 или 0,128 мкМ) (Sigma-Aldrich, США) и/или комплексно (в сочетании) с CFTR-модуляторами 3,5 мкМ VX-770 (ивакафтор, Selleckchem, США) и 3,5 мкМ VX-809 (лумакафтор, Selleckchem, США). Измерение функции канала CFTR и специфический ответ на модуляторы анализировали при помощи программы ImageJ. Графические изображения получали в программе Sigma Plot 12.5 [12].

Анализ набухания органоидов выражается как абсолютная площадь под кривой (AUC), рассчитанная из нормализованного увеличения площади поверхности (исходный уровень = 100%,  $t = 60$  мин). Количественную оценку ответов органоидных культур на модуляторы CFTR рассчитывали как разницу между необработанными (Fsk) и обработанными органоидами (Fsk + VX-809 или Fsk + VX-770 или Fsk + VX-809 + VX-770). Считали, что ответ значительный (с рекомендацией терапии тестируемыми CFTR-модуляторами), если AUC была >1000 отн. ед. для образцов, содержащих стимулятор fsk и CFTR-модуляторы, как описано в работах Dekkers et al. [8] и Ramalho et al. [13]. Каждое заданное условие повторяли не менее 6 раз в рамках одного и того же эксперимента. В качестве положительного контроля использовали ранее полученные результаты от пациентов с генотипом F508del-гомозигота, для которых характерен ответ на комбинированную терапию ивакафтором и лумакафтором (VX-809 + VX-770) [8, 13, 14].

## Результаты исследования и их обсуждение

Приводим несколько клинических случаев пациентов с генетическим вариантом W1282R в генотипе.

### Клинический случай 1

**Мальчик, 2017 г. р.**, 3 года 6 мес., наблюдается в центре муковисцидоза с диагнозом: МВ, смешанная форма (E84.8), среднетяжелое течение. Хронический бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность, тяжелая степень. Микробиологический диагноз: *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Первичный высев *Pseudomonas aeruginosa* от 04.02.2020. Белково-энергетическая недоста-

точность (БЭН) 1–2-й степени. Холестаз (риск желчекаменной болезни). Генетический диагноз: CFTRdele2,3(21kb)/W1282R. Сопутствующий диагноз: Дисметаболическая нефропатия. Фолликулярный кератоз.

Из анамнеза: ребенок от 3-й беременности, угроза прерывания в 12 нед. Роды самостоятельные, в срок. Вес при рождении 3560 г, рост 54 см. Диагноз заподозрен на основании результатов неонатального скрининга: (иммунореактивный трипсин) ИРТ1 – 194 нг/мл, ИРТ2 – 372,3 нг/мл, подтвержден положительными результатами потовых проб на аппарате Nanoduct – 129 и 93 ммоль/л, низкими показателями панкреатической эластазы кала – <15 мкг/г кала (норма от 200 мкг/г кала), результатами генетического обследования – компаунд-гетерозигота CFTRdele2,3/W1282R.

За время наблюдения: частые острые респираторные инфекции, пневмонии, частые курсы пероральной, внутривенной и ингаляционной (тобрамицин, колистиметат натрия) антибактериальной терапии, плохая прибавка в весе, большая доза панкреатических ферментов, стеаторея не купируется, отставание в физическом развитии, БЭН 1–2-й степени, в 3 года 6 мес. БЭН 1–2-й степени, вес – 13,2 кг (10-й перцентиль), рост – 97 см (25-й перцентиль), индекс массы тела (ИМТ) 14, 11%, Z-score -1,21.

Исключены целиакия, глистная инвазия, аллергические заболевания.

При обследовании по данным ультразвукового исследования (УЗИ) органов брюшной полости: взвесь в желчном пузыре, диффузные изменения поджелудочной железы. В биохимическом анализе крови снижение альбумина до 32 г/л, в копрограмме много нейтрального жира. Рентгенография легких без патологии. Динамика микробиологического обследования – в 6 мес. высев *Pseudomonas ztuseri*, первый высев *S. maltophilia* в 9 мес., далее несмотря на антибактериальную терапию высев сохраняется с нарастанием титра до  $10^6$ . В 3 года первый высев *P. aeruginosa*, получал колистиметат натрия и цiproфлоксацин в течении 3 мес. с положительным эффектом.

Получает базисную терапию МВ согласно клиническим рекомендациям.

Случай демонстрирует тяжелое течение МВ у ребенка раннего возраста с эпизодами пневмоний с рождения, выз-

Таблица 2. Показатели плотности тока короткого замыкания ( $\Delta ISC$ ) при введении стимуляторов пациентам с генетическим вариантом W1282R в генотипе

Table 2. Short-circuit current density ( $\Delta ISC$ ) values when administering stimulants to patients with the W1282R variant in the genotype

	$\Delta ISC$ , $\mu A/cm^2$	Амилорид / Amiloride	Форсколин/IBMX / Forskolin/IBMX	Генистеин / Genistein	Карбахол / Carbachol	DIDS	Гистамин / Histamine
1	Биоптат № 1 / Biopsy material 1	-27,5	0	0	10,5	0	9
	Биоптат № 2 / Biopsy material 2	-27	0	0	15	0	8
	Биоптат № 3 / Biopsy material 3	-5	0	0	15	0	7,5
	$M \pm m$ больного / Patient $M \pm m$	-19,83 $\pm$ 9,09	0	0	13,5 $\pm$ 1,84	0	8,17 $\pm$ 0,54
2	Биоптат № 1 / Biopsy material 1	-25	1,5	0	14	0	21
	Биоптат № 2 / Biopsy material 2	-27	1,5	0	11,5	0	12,5
	Биоптат № 3 / Biopsy material 3	-22	0,5	0	5	0	15,5
	$M \pm m$ больного / Patient $M \pm m$	-24,67 $\pm$ 1,78	1,17 $\pm$ 0,41	0	10,17 $\pm$ 3,29	0	16,33 $\pm$ 3,05
$M \pm m$ общее / Total $M \pm m$		-21,06 $\pm$ 2,62	1,28 $\pm$ 0,38	0	11,67 $\pm$ 1,33	0	12,11 $\pm$ 1,59
$M \pm m$ PI-CF		-23,57 $\pm$ 3,61	2,83 $\pm$ 0,48	1 $\pm$ 0,23	–	1,19 $\pm$ 0,26	15,6 $\pm$ 2,9
Здоровые пациенты / Healthy patients		-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

Пациент 1 с генотипом CFTRdele2,3/W1282R; Пациент 2 с F508del/W1282R.

Patient 1 with the CFTRdele2,3/W1282R genotype; Patient 2 with F508del/W1282R.

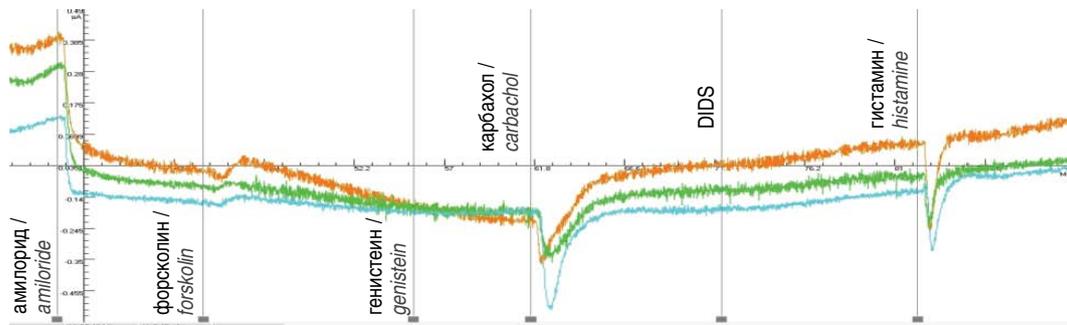


Рис. 3. Метод ОРКП. Пациент с генотипом CFTRdele2.3/W1282R. При введении амилориде происходило снижение тока короткого замыкания ( $\Delta$ ISC), ответа на форсколин/IBMX нет, а на добавление гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Fig. 3. ICM method. Patient with genotype CFTRdele2.3/W1282R. The introduction of amiloride, a decrease in short circuit current ( $\Delta$ ISC) occurred, there was no response to forskolin/IBMX, and a change in the short circuit current in the negative direction was observed on the addition of histamine.

ванных различной грамотрицательной флорой дыхательного тракта, что потребовало применения частых курсов антибактериальной терапии. Отмечается высокая потребность в заместительной ферментной терапии панкреатином на фоне нутритивного дефицита.

Было проведено исследование кишечных потенциалов. Плотность тока короткого замыкания ( $\Delta$ ISC) у исследуемого пациента с вариантом W1282R в генотипе в ответ на введение стимуляторов (табл. 2 (1-й пациент), рис. 3) была следующей. На введение амилориде (стимуляция натриевых каналов) составила  $-19,83 \pm 9,09 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Изменение  $\Delta$ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило  $0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . В ответ на введение гистамина  $\Delta$ ISC изменяется в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила  $8,17 \pm 0,54 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Заключение: тест свидетельствует об отсутствии функции канала CFTR.

### Клинический случай 2

**Мальчик 2012 г. р.**, наблюдается с диагнозом: МВ, смешанная форма (E84.8), среднетяжелое течение. Генетический диагноз: F508del/W1282R. Хронический гнойный обструктивный бронхит. Дыхательная недостаточность 1-й степени. Хроническая панкреатическая недостаточность тяжелой степени. БЭН 2-й степени. Микробиологический диагноз: интермиттирующий высев *P. aeruginosa*. Осложнение: синдром псевдо-Барттера в анамнезе.

Ребенок от 1-й беременности, срочных самостоятельных затяжных родов. Вес при рождении 3200 г, рост 51 см. гипоксически-ишемическое поражение центральной нервной системы. Кефалогематома теменной кости. Пневмопатия на фоне отека синдрома. Конъюгационная желтуха. Диагноз МВ установлен в возрасте 1 мес. ИРТ1 – 174 нг/мл, ИРТ2 – 100 нг/мл. Потовая проба – 100 ммоль/л на аппарате «Нанодакт». Синдром псевдо-Барттера, с 6 мес. для коррекции электролитных нарушений нуждался в госпитализации [15]. Панкреатическая эластаза –  $<100 \text{ мкг/г}$  кала. Обострения хронического бронхита 2–3 раза в год. В 2017–2018 гг. высев *P. aeruginosa*  $10^6$ . В 2019 г. в посевах рост *S. aureus*. Регулярно получает дорназу альфа, панкреатин 25000 15 капсул в сутки, ингаляции гипертоническим раствором NaCl.

При осмотре: Возраст 8 лет. Вес 17,8 кг. Рост 128 см. ИМТ –  $10,9 \text{ кг}/\text{м}^2$ . Состояние средней тяжести, правильного телосложения, пониженного питания. Кашель частый, продуктивный, после ингаляций или после физической нагрузки, утреннее закашливание. Носовое дыхание затруднено, отделяемого нет. В легких дыхание проводится во все отделы, хрипов нет. Частота дыхательных движений – 24/мин. Тоны сердца звучные, дыхательная аритмия. Частота сердечных сокращений – 98/мин. Сатурация кислорода 96%. Живот мягкий, при пальпации безболезненный. Стул 2 раза в день, без патологических примесей.

При обследовании: УЗИ органов брюшной полости и почек в пределах нормы. Рентгенография органов грудной клетки: усиление, обогащение, сгущение легочного рисунка в базально-медиальных отделах, справа – в проекции S2-S3 единичные очаги пневмонической инфильтрации на фоне усиления легочного рисунка.

Таким образом, у ребенка имеется тяжелое течение заболевания, выраженный дефицит веса, тяжелая БЭН, в раннем возрасте – осложнения в виде псевдо-Барттера синдрома, ранняя колонизация синегнойной палочкой.

При исследовании кишечных потенциалов  $\Delta$ ISC у исследуемого пациента с вариантом W1282R в генотипе в ответ на введение стимуляторов (табл. 2 (2-й пациент), рис. 4) была следующей. На введение амилориде (стимуляция натриевых каналов) составила  $-24,67 \pm 1,78 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Изменение  $\Delta$ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило  $1,17 \pm 0,41 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . В ответ на введение гистамина  $\Delta$ ISC изменяется в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила  $16,33 \pm 3,05 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Заключение: функция хлорного канала отсутствует.

$\Delta$ ISC у обоих пациентов с вариантом W1282R (табл. 2, рис. 3, 4) в ответ на введение амилориде (стимуляция натриевых каналов) составила  $-21,06 \pm 2,62 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Изменение  $\Delta$ ISC в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило  $1,28 \pm 0,38 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . В ответ на введение карбахола  $\Delta$ ISC изменяется в отрицательную сторону, изменение составило  $11,67 \pm 1,33 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . В ответ на введение гистамина  $\Delta$ ISC изменяется в отрицательную сторону, что отражает вход ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила  $12,11 \pm 1,59 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

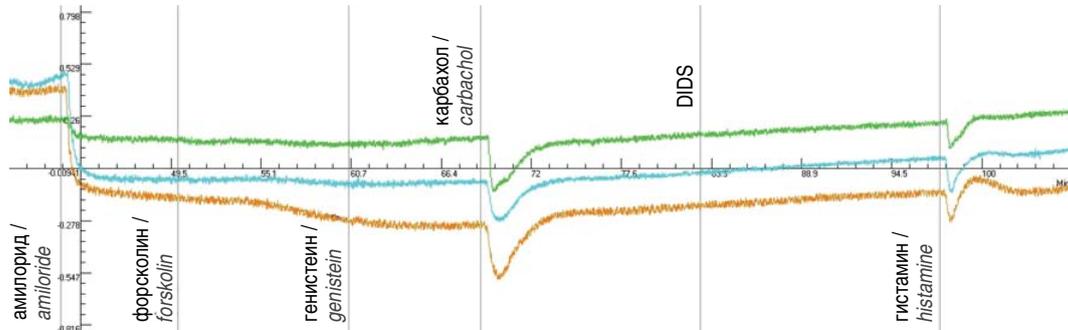


Рис. 4. Метод ОРКП. Пациент с генотипом W1282R/F508del. При введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания (ΔISC), ответа на форсколин/IBMX нет, а на добавление гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

Fig. 4. ICM method. Patient with the W1282R/F508del genotype. With the introduction of amiloride, a decrease in short circuit current (MSC) occurred, there was no response to forskolin/IBMX, and a change in the short circuit current in the negative direction was observed on the addition of histamine.

Морфология культур кишечных органоидов обоих участников исследования соответствует контрольной культуре от гомозигот по варианту F508del с дисфункцией канала CFTR: внутренняя полость – люмен – редуцирована, стенки утолщены (рис. 5). Для сравнения на рис. 5 дополнительно представлены микрофотографии культуры органоидов здорового человека (CFTR wt/wt). За счет нормального функционирования белка-канала CFTR в органоидах, подобно слизистой кишечника, осуществляется селективный транспорт воды, хлора и прочих ионов, благодаря чему для органоидных культур здорового человека (CFTR wt/wt) характерны округлая форма и тонкие стенки (рис. 5).

Для каждого пациента на модели кишечных органоидов при стимуляции форсколином оценили влияние CFTR-корректора VX-809, CFTR-потенциатора VX-770 и их комплексный эффект. Показано, что FIS коррелирует с тяжестью течения заболевания у обоих пациентов. Ответ на форсколин в концентрациях 5; 0,8 или 0,128 мкМ отдельно и совместно с корректором VX-809 отсутствует, а с потенциатором VX-770 – значительный (45–50% при 5 мкМ Fsk), что позволило сделать вывод о том, что белок CFTR присутствует на поверхности апикальной мембраны клеток (рис. 6, 7). При этом у каждого из двух исследуемых пациентов, в генотипе которых выявлен вариант W1282R-CFTR, в отсутствие потенциа-

тора канал CFTR лишен функциональной активности, поскольку ответ на стимуляцию форсколином отсутствует. Для обоих культур органоидов, у которых вторая мутация была классифицирована как «тяжелая» и отнесена к классам I – CFTRdel2,3 и II – F508del, к 60-й минуте наблюдается ответ (~70%, или AUC ~1300–1500 отн. ед. при 5 мкМ Fsk) при добавлении совместно VX-770 и VX-809 (рис. 6, 7). Обнаруженные эффекты сопоставимы с гомозиготами по мутации F508del и являются основанием для рекомендации таргетной терапии комбинированным препаратом VX-770 + VX-809 пациентам с генетическим вариантом W1282R (рис. 7).

Клиническая картина двух пациентов с вариантом W1282R соответствует тяжелому течению МВ. У обоих пациентов отмечаются хроническая панкреатическая недостаточность и ранняя колонизация *P. aeruginosa*.

Методом ОРКП были обследованы два пациента с генотипами CFTRdel2.3/W1282R и F508del/W1282R, оба классифицируются как тяжелые.

В целом при анализе полученных данных было выявлено, что ответ на амилорид в группе W1282R был выше, чем в группах F508del/F508del и контрольной. Ответ на добавление форсколина в исследуемой группе был ниже, чем в группе F508del/F508del и контрольной группе. Ответ на гистамин также был ниже, чем в остальных группах.

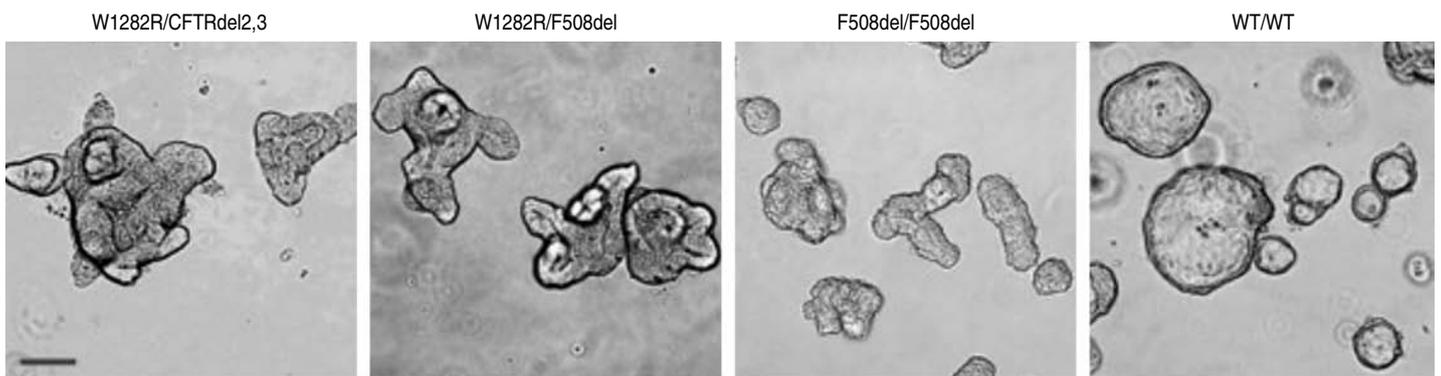


Рис. 5. Морфология органоидных культур исследуемых пациентов с вариантом W1282R-CFTR (W1282R/CFTRdel2,3 и W1282R/F508del) в сравнении с контрольной культурой гомозиготой F508del и здоровым контролем (wt/wt). Масштабная шкала – 200 мкм.

Fig. 5. Morphology of organoid cultures of the studied patients with the W1282R-CFTR variant (W1282R/CFTRdel2,3 and W1282R/F508del) in comparison with the control culture homozygous F508del and healthy control (wt/wt). Scale scale – 200 microns.

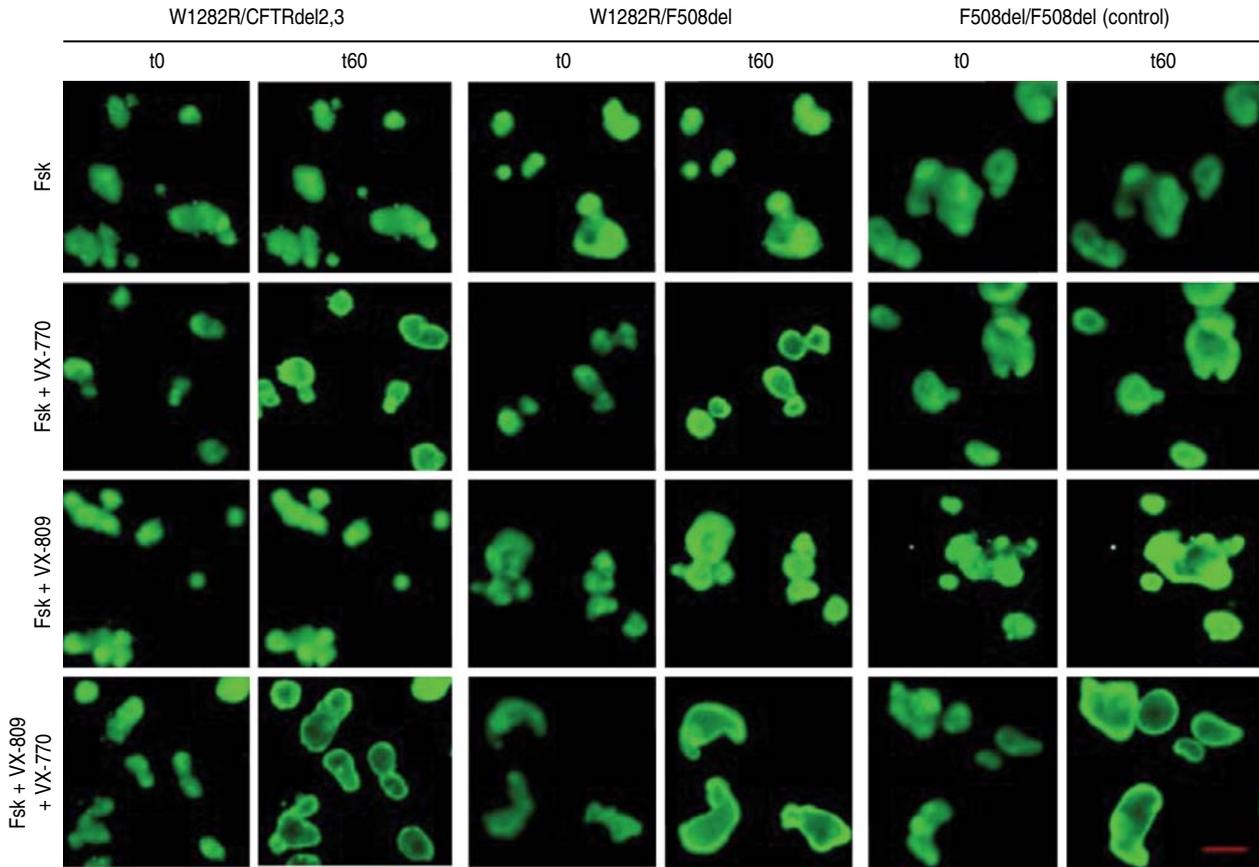


Рис. 6. Исследование остаточной функциональной активности канала CFTR и влияния потенциатора (VX-770), потенциатора VX-770 и корректора VX-809 на восстановление функции для обоих гетерозигот по варианту W1282R-CFTR. Концентрации – 5 мкМ Fsk, 3,5 мкМ VX-770 и 3,5 VX-809. Масштабная шкала – 200 мкм.

Fig. 6. Study of the residual functional activity of the CFTR channel and the effect of the potentiator (VX-770), VX-770 potentiator and the VX-809 corrector on the restoration of function for both heterozygotes according to the W1282R-CFTR variant. Concentrations – 5  $\mu$ M Fsk, 3.5  $\mu$ M VX-770 and 3.5  $\mu$ M VX-809. The scale is 200 microns.

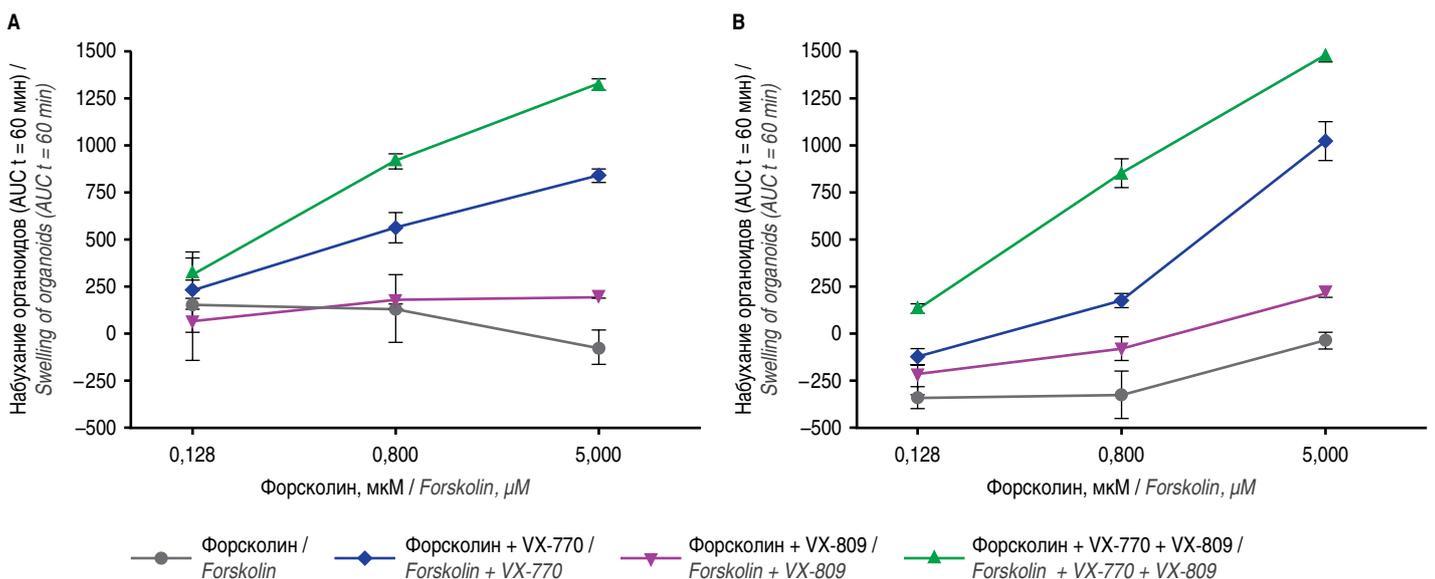


Рис. 7. Результаты количественной оценки набухания органоидов при действии форсколина и CFTR-модуляторов для гетерозигот по варианту W1282R-CFTR. Концентрации 3,5 мкМ VX-770 и 3,5 VX-809. А – W1282R/CFTRdele2,3; В – W1282R/F508del.

Fig. 7. Results of quantitative assessment of organoid swelling induced by forskolin and CFTR modulators for W1282R-CFTR heterozygotes. Concentrations of 3.5  $\mu$ M VX-770 and 3.5  $\mu$ M VX-809. A – W1282R/CFTRdele2,3; B – W1282R/F508del.

Тест ОРКП свидетельствует об отсутствии функции канала CFTR у обоих пациентов с генетическим вариантом W1282R в генотипе.

Для обоих пациентов, в генотипе которых выявлен патогенный вариант W1282R-CFTR, характеризованный ранее как мутация II класса, применение корректора VX-809 не повлияло на восстановление функции хлорного канала, в отличие от контрольного образца F508del-гомозигота, для которого наблюдался незначительный ответ (~20%). Полученные данные позволяют предположить, что исследуемый вариант W1282R не относится ко II классу, поскольку для генетических вариантов II класса при действии лумакафтора (VX-809) характерно увеличение общего количества функционального белка CFTR. Для пациентов с МВ, в генотипе которых оба варианта гена CFTR относятся к классу II, потенциатор VX-770 не оказывает значительного эффекта на кинетические характеристики белка CFTR на мембране. Однако, согласно полученным результатам, для обоих пациентов, принимавших участие в исследовании, зафиксировано значительное восстановление утраченной функции канала (~45%) при совместном применении корректора VX-809 и потенциатора VX-770.

### Электронная версия

#### Заключение

Таким образом, анализ клинико-лабораторных данных пациентов с генетическим вариантом W1282R и результаты метода ОРКП совпали и свидетельствовали о «тяжелом» генетическом варианте. Остаточная функция CFTR в органах коррелирует с клиническими параметрами заболевания и биомаркерами функции CFTR. Обоим пациентам с генотипами W1282R/CFTRdele2.3 и W1282R/F508del может быть рекомендована терапия комбинированным препаратом, сочетающим лумакафтор с ивакафтором (VX-809 + VX-770).

#### Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» 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.

#### Литература / References

1. CFTR2. Available at: [https://cftr2.org/mutations\\_history](https://cftr2.org/mutations_history)
2. Ivaschenko TE, Baranov VS, Dean M. Two new mutations detected by single-strand conformation polymorphism analysis in cystic fibrosis from Russia. Hum Genet. 1993 Mar;91(1):63-5. DOI: 10.1007/BF00230224

3. 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).
4. 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, 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):162-165. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15039 (In Russian).
5. Кондратьева ЕИ, Мельяновская ЮЛ, Шерман ВД, Хьюго Р. де Йонге, Ефремова АС, Бухарова ТБ, и др. Функциональные методы диагностики нарушений гена CFTR и его продукта. Вопросы практической педиатрии. 2018; 13(4):50–64. / Kondratyeva EI, Melyanovskaya YuL, Sherman VD, De Jonge H.R., Efremova AS, Bukharova TB, et al. Functional methods of diagnosing disorders of the CFTR gene and its product. Vopr. prakt. pediatri. (Clinical Practice in Pediatrics). 2018;13(4):50–64. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-4-50-64 (In Russian).
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. Dekkers JF, van der Ent CK, Beekman JM. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. Rare Dis. 2013 Nov 11;1:e27112. DOI: 10.4161/rdis.27112
11. 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
12. Hagemeyer MC, Vonk AM, Awatade NT, Silva IAL, Tischer C, Hilsenstein V, et al. An open-source high-content analysis workflow for CFTR function measurements using the forskolin-induced swelling assay. Bioinformatics. 2020 Dec 26;btaa1073. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa1073
13. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, van den Brink S, Geurts V, Beumer J, Clevers H. Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. Curr Protoc Immunol. 2020 Sep;130(1):e106. DOI: 10.1002/cpim.106
14. Petrova NV, Kashirskaya NY, Krasovskiy SA, Amelina EL, Kondratyeva EI, Marakhonov AV, et al. Clinical Presentation of the c.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R) Variant in Russian Cystic Fibrosis Patients. Genes (Basel). 2020 Sep 27;11(10):1137. DOI: 10.3390/genes11101137
15. Камилова АТ, Абдуллаева ДА, Убайходжаева ХТ, Геллер СИ, Умарназарова ЗЕ, Султанходжаева ШС. Муковисцидоз, осложненный синдромом псевдо-Барттера, у ребенка. Вопросы детской диетологии. 2019;17(2):63–66. / Kamilova AT, Abdullaeva DA, Ubaikhodjayeva KT, Geller SI, Umarnazarova ZE,

Sultankhodjaeva SS. Cystic fibrosis complicated by pseudo-Bartter syndrome in a child. *Vopr. det. dietol. (Pediatric Nutrition)*. 2019;17(2):63–66. DOI: 10.20953/1727-5784-2019-2-63-66 (In Russian).

Гольдштейн Дмитрий Вадимович, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова  
E-mail: dvgoldrm7@gmail.com

#### Информация о соавторах:

Воронкова Анна Юрьевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова  
ORCID: 0000-0002-8183-7990

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

Булaltenko 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

Кутев Сергей Иванович, доктор медицинских наук, директор Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова

Хьюго Р. де Йонге, кандидат медицинских наук, профессор, руководитель отделения гастроэнтерологии и гепатологии клиники Erasmus MC, Роттердам, Нидерланды  
E-mail: h.dejonge@erasmusmc.nl

Петрова Ника Валентиновна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова  
E-mail: npetrova63@mail.ru

#### Information about co-authors:

Anna Yu. Voronkova, MD, PhD, Leading Researcher of the Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis of the Research Centre for Medical Genetics  
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

Natalya V. Bulaltenko, 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

Sergey I. Kutsev, MD, PhD, DSc, Director of the Research Centre for Medical Genetics

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

Nika V. Petrova, PhD, DSc of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Genetic Epidemiology, Research Centre for Medical Genetics  
E-mail: npetrova63@mail.ru

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

## НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ

### Сезонные колебания уровня витамина D у детей и взрослых при различных заболеваниях

Оценить уровень 25(OH)D у пациентов с различными заболеваниями, проживающих в Москве и Московском регионе, с учетом сезона года и возраста – цель исследования, результаты которого опубликованы в журнале «Вопросы детской диетологии».

Проведено одномоментное неконтролируемое диагностическое кросс-секционное исследование. Обследовано 10 707 человек: 8441 (78,8%) женщина и 2266 (21,2%) мужчин. Дети составили 15% (1501 ребенок), взрослые – 85% (9206 человек), средний возраст взрослых составил  $49,86 \pm 21,92$  года, детей –  $13,45 \pm 11,76$  года.

Максимальная частота выраженного дефицита 25(OH)D регистрировалась среди пациентов с новообразованиями (48,9%), пациенты с болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани имели выраженный дефицит в 16,9% случаев, с заболеваниями мочеполовой системы – в 19,6%, при болезнях органов пищеварения – в 19,0%, болезнях перинатального периода – в 15,7%, болезнях крови, кроветворных органов – в 22,3% случаев, что оказалось в 2–3 раза чаще по сравнению с лицами, имеющими болезни других классов. Лица, проходившие профилактическое обследование, имели самую низкую частоту (1,4%) выраженного дефицита 25(OH)D. При заболеваниях, в основе которых лежит непрерывно-прогрессирующий аутоиммунный воспалительный процесс (сахарный диабет 1-го типа, ревматоидный артрит), новообразованиях, а также осложнениях различных по патогенезу заболеваний, таких как хроническая почечная недостаточность, наблюдается недостаточная обеспеченность витамином D в течение всего года, которая не отвечает на увеличение продолжительности светового дня. Дети с перинатальными заболеваниями и недоношенностью имеют выраженный дефицит и недостаточность 25(OH)D, которые реализуются сразу после рождения.

Частота низкой обеспеченности витамином D составила 82,9%, самые низкие значения 25(OH)D регистрируются в зимне-весенний период. У пациентов с аутоиммунными заболеваниями, хронической почечной недостаточностью выявлены глубокие круглогодичные нарушения метаболизма 25(OH)D.

*Одинаева Н.Д., Кондратьева Е.И., Лошкова Е.В., Османов И.М., Хавкин А.И., Захарова И.Н., Шубина Ю.Ф., Паснова Е.В., Пономаренко Ю.Б.*

*Сезонные колебания уровня витамина D у детей и взрослых при различных заболеваниях.*

*Вопросы детской диетологии. 2022; 20(2): 29–37.*

*DOI: 10.20953/1727-5784-2022-2-29-37*

*Источник: www.phdynasty.ru*