

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.01.60-68>

Изучение редкого варианта гена *CFTR* с.1329_1350del в гомозиготном состоянии у ребенка с муковисцидозом с помощью функциональных тестов

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

ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Изучение редких вариантов в гене *CFTR* является актуальным в эпоху таргетной терапии *CFTR*-модуляторами. В данном исследовании изучена клиническая картина муковисцидоза, а также функция *CFTR*-канала у гомозиготного носителя редкого патогенного варианта с.1329_1350del (p.Asp443GlufsX19), относящегося к I классу нарушений в гене *CFTR*. Получена полная корреляция результатов функциональных тестов с фенотипической картиной муковисцидоза и потовым тестом. Метод определения разности кишечных потенциалов продемонстрировал отсутствие функциональной активности хлорного *CFTR* канала в ректальном биоптате; при стимулировании форсколином органоиды пациента не ответили набуханием, что свидетельствует о полном нарушении образования функционального белка *CFTR*. Воздействие на кишечные органоиды всеми зарегистрированными для терапии таргетными препаратами не привело к их набуханию, в отличие от контрольной культуры, гомозиготной по F508del, таким образом, хлорный канал пациента с генотипом p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 оказался нечувствителен ни к одному *CFTR*-модулятору.

Ключевые слова: муковисцидоз, редкие варианты гена *CFTR*, кишечные органоиды, *CFTR*-модуляторы.

Для цитирования: Кондратьева Е.И., Краснова М.Г., Мельяновская Ю.Л., Шерман В.Д., Мокроусова Д.О., Ефремова А.С., Булатенко Н.В., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В. Изучение редкого варианта гена *CFTR* с.1329_1350del в гомозиготном состоянии у ребенка с муковисцидозом с помощью функциональных тестов. *Медицинская генетика* 2024; 23(1): 60-68.

Автор для корреспонденции: Кондратьева Е.И.; e-mail: elenafpk@mail.ru

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.12.2023

Study of a rare variant of the *CFTR* c.1329_1350del gene in a homozygous state in a child with cystic fibrosis using functional tests

Kondratyeva E.I., Krasnova M.G., Melyanovskaya Yu.L., Sherman V.D., Mokrousova D.O.,
Efremova A.S., Bulatenko N.V., Bukharova T.B., Goldshtein D.V.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

The study of rare variants in the *CFTR* gene is relevant in the era of targeted therapy with *CFTR* modulators. In this study, we studied the clinical picture of cystic fibrosis, as well as the function of the *CFTR* channel in a homozygous carrier of a rare pathogenic variant c.1329_1350del (p.Asp443GlufsX19), belonging to class I disorders in the *CFTR* gene. A complete correlation of the results of functional tests with the phenotypic pattern of CF and data of a sweat test was obtained. The method for determining the difference in intestinal potentials demonstrated the absence of functional activity of the chloride *CFTR* channel in the rectal biopsy, and when stimulated with forskolin, the patient's organoids did not swell, which indicates a complete violation of the functional *CFTR* protein production. Exposure to intestinal organoids by all registered for therapy targeted drugs did not lead to their swelling, unlike the control culture, homozygous for F508del. The chloride channel of a patient with genotype p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 turned out to be insensitive to any *CFTR* modulator.

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

For citation: Kondratyeva E.I., Krasnova M.G., Melyanovskaya Yu.L., Sherman V.D., Mokrousova D.O., Efremova A.S., Bulatenko N.V., Bukharova T.B., Goldshtein D.V. Study of a rare variant of the *CFTR* c.1329_1350del gene in a homozygous state in a child with cystic fibrosis using functional tests. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2024; 23(1): 60-68. (In Russ.)

Corresponding author: Kondratyeva E.I.; e-mail: elenafpk@mail.ru

Funding. The work was carried out under the state assignment for the Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 20.12.2023

Введение

Муковисцидоз (МВ) — аутосомно-рецессивное заболевание, клинически характеризующееся комплексным фенотипом [1]. При этом ведущей причиной смертности при МВ является патология дыхательной системы, в основе которой лежит «порочный» круг: обструкция, инфекция, воспаление. Вязкость бронхиальной слизи, как и продуктов других секреторных органов, обусловлена нарушенным транспортом хлоридов и бикарбонатов из-за патогенных вариантов в гене муковисцидозного регулятора трансмембранной проводимости (*CFTR*). Количественные и качественные изменения в гене *CFTR* включают более 2000 вариантов. По состоянию на 7 апреля 2023 г. на веб-сайте CFTR2 аннотировано в общей сложности 804 варианта гена *CFTR*: 719 вариантов, вызывающих МВ, 49 вариантов с различной клинической картиной, 25 не вызывающих МВ, 11 вариантов неизвестного значения (<https://cfr2.org>). Патогенные варианты условно делятся на несколько классов. Классы I–III вызывают заболевание с большей фенотипической тяжестью и худшим прогнозом; варианты, относящиеся к классам IV–VI, характеризуются остаточной активностью белка *CFTR* с лучшим прогнозом заболевания [2]. К основным задачам современной ДНК-диагностики МВ относится идентификация вариантов в гене *CFTR* методом высокопроизводительного секвенирования. В настоящее время в связи с разработкой и применением таргетной терапии МВ особое значение приобретает определение патогенности и классификация новых, редких вариантов и вариантов неопределенной значимости гена *CFTR* с определением их чувствительности к действию *CFTR*-модуляторов [3].

Форсколиновый тест на кишечных органоидах, полученных от пациента, позволяет *in vitro* количественно определить *CFTR*-зависимый транспорт ионов хлора, бикарбоната и воды в просвет органоида и может обеспечить точную и достоверную оценку функции белка *CFTR* [4, 5]. В ряде исследований было показано, что оценки, полученные при проведении теста, коррелируют с результатами потового теста и определения разницы кишечных потенциалов *ex vivo* (ОРКП), и что тяжесть клинического проявления МВ и эффективность таргетной терапии может быть предсказана, исходя из уровня форсколин-индуцированного набухания кишечных органоидов [6].

Патогенный вариант с.1329_1350delTATTAATTTTC AAGATAGAAAGA (p.Asp443Glufs*19) гена *CFTR* относится к I классу мутаций, занимает по частоте 92 место

(0,03%) в Российском регистре пациентов с МВ 2020 года [7]. В Регистре описан всего один пациент, являющийся гомозиготным носителем данной мутации. В международной базе ClinVar вариант с точки зрения клинической значимости обозначен как патогенный/вероятно патогенный на основании двух наблюдений (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000678263>). Вариант приводит к образованию преждевременного стоп-кодона, из-за делеции с 1329 по 1350 нуклеотид (10 экзон). Целью данной работы было изучение клинической картины заболевания и функциональной активности *CFTR*-канала методом ОРКП *ex vivo* и форсколинового теста на кишечных органоидах у пациента, являющегося гомозиготным носителем редкого варианта.

Методы

Обследована пациентка 2011 г.р. с диагнозом: *Муковисцидоз, смешанная форма (E84.8), тяжелое течение*. Генетический диагноз: с.1329_1350del/c.1329_1350del (p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19). Диагноз установлен согласно критериям ECFS и клиническим рекомендациям [8, 9].

Для получения культур кишечных органоидов были использованы протоколы, разработанные группой исследователей из Нидерландов под руководством J.M. Beekman [5, 10–12]. Крипты изолировали из ректальных биоптатов и высевали в 50% «Матригель» в 24-луночные планшеты по протоколу A. Vonk [11] с последующим еженедельным пассированием и обновлением культуральной среды каждые 2–3 дня. Для изоляции достаточного количества органоидов требовалось 2–4 биоптата.

Анализ результатов, полученных методом индуцированного форсколином набухания, был адаптирован из Dekkers с соавт. [12]. Полученную культуру кишечных органоидов высевали в 96-луночные планшеты, добавляли 50 мкл культуральной среды. В среду добавляли корректоры лумакафтор (VX-809, Selleckchem, США), тезакафтор (VX-661, Selleckchem, США) и элексакафтор (VX-445, Selleckchem, США), все — в концентрации 3,5 мкМ. В остальные лунки добавляли ДМСО (ПанЭко, Россия). Через сутки проводили окрашивание 0,85 мкМ Calcein green (Biotium) в течение 40 минут. Перед визуализацией органоиды стимулировали форсколином (5 мкМ или 0,128 мкМ), в соответствующие лунки добавляли потенциатор ивакафтор (VX-770, Selleckchem, США). Для съемки культур и получения изобра-

жений с интервалом в 10 минут использовали автоматический сканер клеток BioTek Lionheart FX (Agilent Technologies, USA), форсколиновый тест проводили в течение 1 часа при поддержании 37°C и 5% CO₂ в камере Lionheart FX. Набухание органоидов определяли количественно с помощью программного обеспечения Sigma Plot 12.5. Набухание органоидов оценивалось как абсолютная площадь под кривой (AUC), рассчитанная из нормализованного увеличения площади поверхности (исходный уровень = 100%, t = 60 мин). Графическую визуализацию и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью функций, реализованных на языке программирования R (R Core Team, 2021). Количественную оценку ответа органоидов на CFTR-модуляторы рассчитывали по разнице в изменении размера органоидов в начале и в конце форсколинового теста. Положительным ответом (терапевтически значимым) считали значение AUC ≥ 1000 ед. после инкубации с модуляторами CFTR [13].

Для оценки функциональной активности ионных каналов (ENaC, CFTR, CaCCs) использовали метод ОРКП согласно алгоритму, описанному ранее [14–21].

Группу контроля составили здоровые добровольцы, группу сравнения – пациенты с МВ, гомозиготные по F508del (F508del/F508del) гена *CFTR* [14].

Пациентами были подписаны информированные добровольные согласия. Исследование и форма информированного добровольного согласия были одобрены Комитетом по Этике ФГБНУ «МГНЦ» Минобрнауки России 15 октября 2018 г.

Результаты и обсуждение

Клиническая картина

Ребенок 2011 г.р., наблюдается в центре МВ с клиническим диагнозом: Муковисцидоз, смешанная форма (E84.8), тяжелое течение. Бронхоэктазы S1-3 справа, S1,2 и 6 – слева. Фиброателектаз средней доли справа. ДН 0 ст. Хронический полипозный риносинусит. Хроническая панкреатическая недостаточность тяжелой степени. Осложнения: БЭН 3 ст. Кровохарканье. Гепатомегалия. Микробиологический диагноз: хроническая инфекция *S.aureus*, инфекция *P.aeruginosa* (2016 г., 2021 г.). Генетический диагноз: c.1329_1350del/p.Asp443GluX19/p.Asp443GluX19).

Анамнез: от 3 беременности (близкородственный брак) (от 1 беременности сестра (здоровая), 2 – м/а), роды вторые на 36–37 нед., вес при рождении 2700 г, рост 49 см, выписана в ранние сроки. Неонатальный

скрининг не проводился (ребенок родился не в РФ). С рождения плохо прибавляла в весе, отмечался частый стул. В 2,5 года появился частый сухой кашель. Перенесла два эпизода пневмонии в 2 и 3 года. Заподозрен МВ. Диагноз установлен в возрасте 4,5 лет на основании повторных положительных результатов потового теста – 103,1 ммоль/л (по Гибсону-Куку, норма до 30 ммоль/л), 124 ммоль/л (проводимость, норма до 50 ммоль/л), а также клинической картины хронического обструктивного бронхита, кишечного синдрома (полифекалия, стеаторея). Панкреатическая эластаза кала менее 50 мкг/г (тяжелая степень панкреатической недостаточности).

После установления диагноза неоднократно госпитализировалась с целью проведения внутривенной антибактериальной терапии (АБТ), в том числе по поводу обострений по пневмоническому типу. В апреле 2017 г. диагностирован аллергический бронхолегочный аспергилез (АБЛА), лечение с положительным результатом. В 2021 г. (в возрасте 10 лет) зафиксирован высеv *Pseudomonas aeruginosa*, проводилась ингаляционная АБТ. В 2022 году на фоне обострения хронического бронхолегочного процесса отмечалось кровохарканье. По данным компьютерной томографии органов грудной полости (КТ ОГП) – двусторонние бронхоэктазы. Показатели функции внешнего дыхания в течение 2022 г. демонстрировали значительное снижение.

В связи с частыми обострениями, необходимостью курсов внутривенной АБТ до 4–5 раз в год ребенку рекомендована домашняя форма обучения.

Состояние на момент осмотра в возрасте 11 лет 5 мес.: вес 27 кг (долженствующий вес – 41 кг), рост 145 см (долженствующий рост – 150 см). ИМТ 12,8 кг/м² (Z-score: -3,35). Состояние тяжелой степени тяжести по заболеванию, кашель влажный, мокрота вязкая гнойного характера. Физическое развитие низкое, дисгармоничное за счет дефицита массы тела. Деформация дистальных фаланг пальцев кистей рук и стоп по типу часовых стекол. Носовое дыхание несколько затруднено, отделяемого нет. Дыхание проводится во все отделы, жесткое, хрипы влажные среднепузырчатые и мелкопузырчатые больше справа, амфорическое дыхание по передней поверхности грудной клетки справа. ЧДД – 22 в мин. Тоны сердца звучные, ритмичные. ЧСС – 98 в мин. Живот мягкий, безболезненный. Печень + 1 см из-под края реберной дуги, край эластичный. Стул 1 раз в день, оформленный, без видимой стеатореи (на фоне заместительной ферментотерапии). Сатурация кислорода 98%.

При обследовании:

1. КТ ОГК от 08.08.2022: в сравнении с КТ от 19.01.2021 нарастание полисегментарных очагов инфильтрации обоих легких по типу бронхиолита, множественные двусторонние бронхоэктазы с более утолщенными стенками прежней распространенности, в остальном без динамики. Фиброателектаз средней доли справа, буллы правого легкого.

2. Спирометрия от 15.02.2022: ОФВ1 – 1,35 л (70 %), ФЖЕЛ – 1,87 л (83%). Спирометрия от 04.10.2022: ОФВ1 – 1,06 л (51%), ФЖЕЛ – 1,59 л (65%). Заключение: динамическое снижение основных показателей.

Проводимая терапия: панкреатин 10 тыс. (9 800 ед липазы на кг), муколитическая терапия – ингаляции Дорназы-альфа 5 мг/сут (включая терапию синусита), 7% раствора NaCl с 0,1% натрия гиалуронатом, ингаляционная бронхолитическая терапия, витаминотерапия, урсодезоксихолевая кислота внутрь, плановая ежеквартальная внутривенная АБТ (14-дневные курсы в условиях стационара, препараты подбираются по результатам тестов на чувствительность микроорганизмов), дополнительное специализированное высококалорийное питание, кинезитерапия.

Таким образом, у ребенка с поздно установленным диагнозом, имеет место тяжелое течение смешанной формы МВ, характеризующееся частыми обострениями хронического бронхолегочного процесса, высокой потребностью в курсах АБТ, развитием необратимых структурных изменений легочной ткани, тяжелой степенью панкреатической недостаточности, тяжелой степенью БЭН.

Оценка функциональной активности ионных каналов *ex vivo* методом ОРКП

Результаты ОРКП *ex vivo* (на ректальных биоптатах) показали (таблица, рис. 1), что плотность тока ко-

роткого замыкания (ΔI_{sc}) в ответ на введение амилорид (стимуляция ENaC натриевого канала) составила $-5,67 \pm 3,78 \mu A/cm^2$. В ответ на введение форсколина (стимуляция CFTR хлорного канала) ΔI_{sc} составила $1,33 \pm 0,2 \mu A/cm^2$, показатели соответствуют «тяжелому» генотипу. В ответ на введение гистамина (стимулятор CaCCs кальциевого канала) ΔI_{sc} изменяется в отрицательную сторону, что отражает приток ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила $8 \pm 1,22 \mu A/cm^2$.

Анализ полученных показателей (табл. 1), указывает на то, что у пациента с генотипом p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 ответ на амилорид выше, чем в группах контроля и сравнения (F508del/F508del). Ответ на форсколин ниже, чем в группе F508del/F508del и в контрольной группе. Ответ на гистамин у пациента с генотипом p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 был ниже, чем в других группах (F508del/F508del и группе контроля).

Была получена культура p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 органоидов из кишечных биоптатов пациента. Морфологически культура отличалась от культур wt/wt CFTR: у 2-3-дневных органоидов наблюдалась неправильная форма, утолщение эпителиальной стенки, отсутствие внутренней полости (рис. 2).

У пациента с p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 на модели кишечных органоидов оценили фармакологическое влияние CFTR-корректоров VX-809, VX-661, VX-445 и CFTR-потенциатора VX-770. В качестве контроля была использована культура, полученная от пациента с генотипом F508del/F508del. При воздействии форсколина не наблюдается увеличение объема кишечных органоидов пациента, что свидетельствует о полной утрате функциональной активности канала CFTR (рис. 3А, 4). При воздействии

Таблица. Анализ функциональной активности ионных каналов *ex vivo*

Table. Analysis of the functional activity of ion channels *ex vivo*

ΔI_{sc} , $\mu A/cm^2$	Амилорид ENaC канал	Форсколин CFTR канал	Карбахол CaCCs канал	Гистамин CaCCs канал
Биоптат № 1	-11,5	1,5	14,5	6
Биоптат № 2	-4,5	1,5	9,5	9
Биоптат № 3	-1	1	20	9
$M \pm m$	$-5,67 \pm 3,78$	$1,33 \pm 0,2$	$14,67 \pm 3,71$	$8 \pm 1,22$
F508del/F508del	$-15,7 \pm 3,51$	$3,33 \pm 0,63$	-	$17,83 \pm 3,57$
Контроль	$-7,12 \pm 1,34$	$26,72 \pm 2,66$	$117,44 \pm 4,32$	$109,76 \pm 8,18$

ивакафтора контрольная культура отвечает небольшим набуханием ($44,0 \pm 20,8$ отн. ед.) по сравнению с p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19-CFTR органоидами. Стимуляция F508del/F508del кишечных органоидов потенциатором в присутствии корректоров в течение 60 минут ожидаемо демонстрирует положительное влияние корректоров на восстановление функции канала CFTR. Так, при воздействии препаратом ивакафтор+лумакафтор (VX-770+VX-809) ответ составляет $378,5 \pm 59,4$ отн. ед.; ивакафтор+тезакафтор (VX-770+VX-661) – $325,6 \pm 39,2$ отн. ед.; ивакафтор+тезакафтор+элексакафтор (VX-770+VX-661+VX-445) – $1416,1 \pm 153,7$ отн. ед., что

соответствует ранее описанным результатам (рис. 3Б, 4). Ответы кишечных органоидов, полученных от пациента с генотипом p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19-CFTR, свидетельствуют об отсутствии положительного влияния CFTR-модуляторов: культуры не отвечают ни на один из зарегистрированных таргетных препаратов (рис. 3А, 4). Таким образом, на модели кишечных органоидов показано, что терапия CFTR-модуляторами не может быть рекомендована пациентам с данным генетическим вариантом (в сочетании с вариантом I класса), поскольку ее назначение возможно в случае ответов $AUC \geq 1000$ отн.ед. (рис. 3).

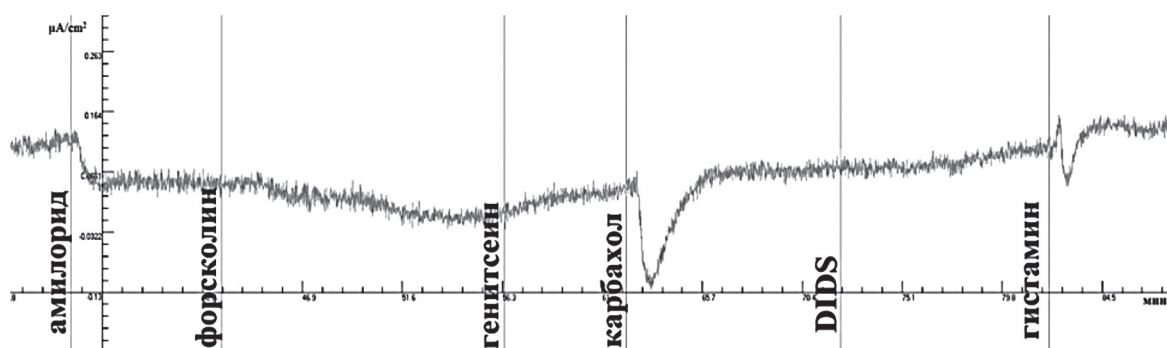


Рис. 1. Метод ОРКП ex vivo у пациента с генотипом p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19.

Fig. 1. Ex vivo determining the difference in intestinal potentials in a patient with the p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 genotype

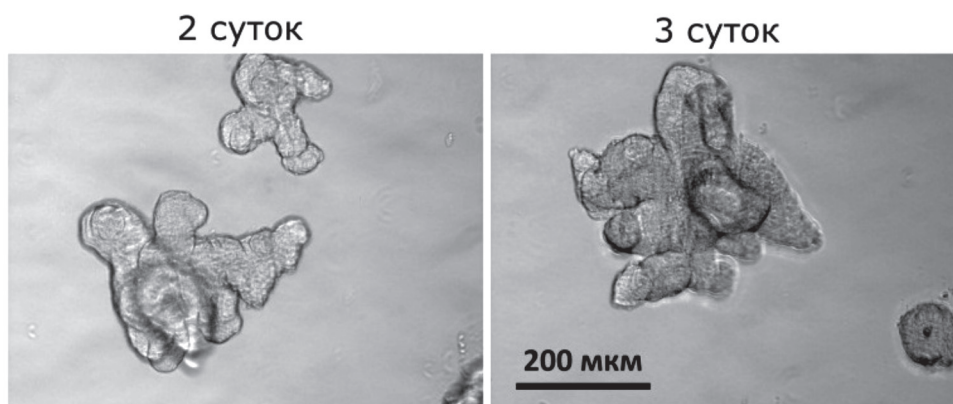


Рис. 2. Морфология культуры кишечных органоидов, полученной от пациента с генотипом p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19, которые культивировали в течение двух (левая фотография) и трех (правая фотография) суток. Органоиды характеризуются отсутствием люмена, неправильной формой, а также наличием утолщенного эпителия. Шкала – 200 мкм.

Fig. 2. Morphology of cultured intestinal organoids from a patient with the p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 genotype, which were cultured for two (left photo) and three (right photo) days. Organoids are characterized by the absence of a lumen, irregular shape, and the thickened epithelium. Scale bar: 200 μm.

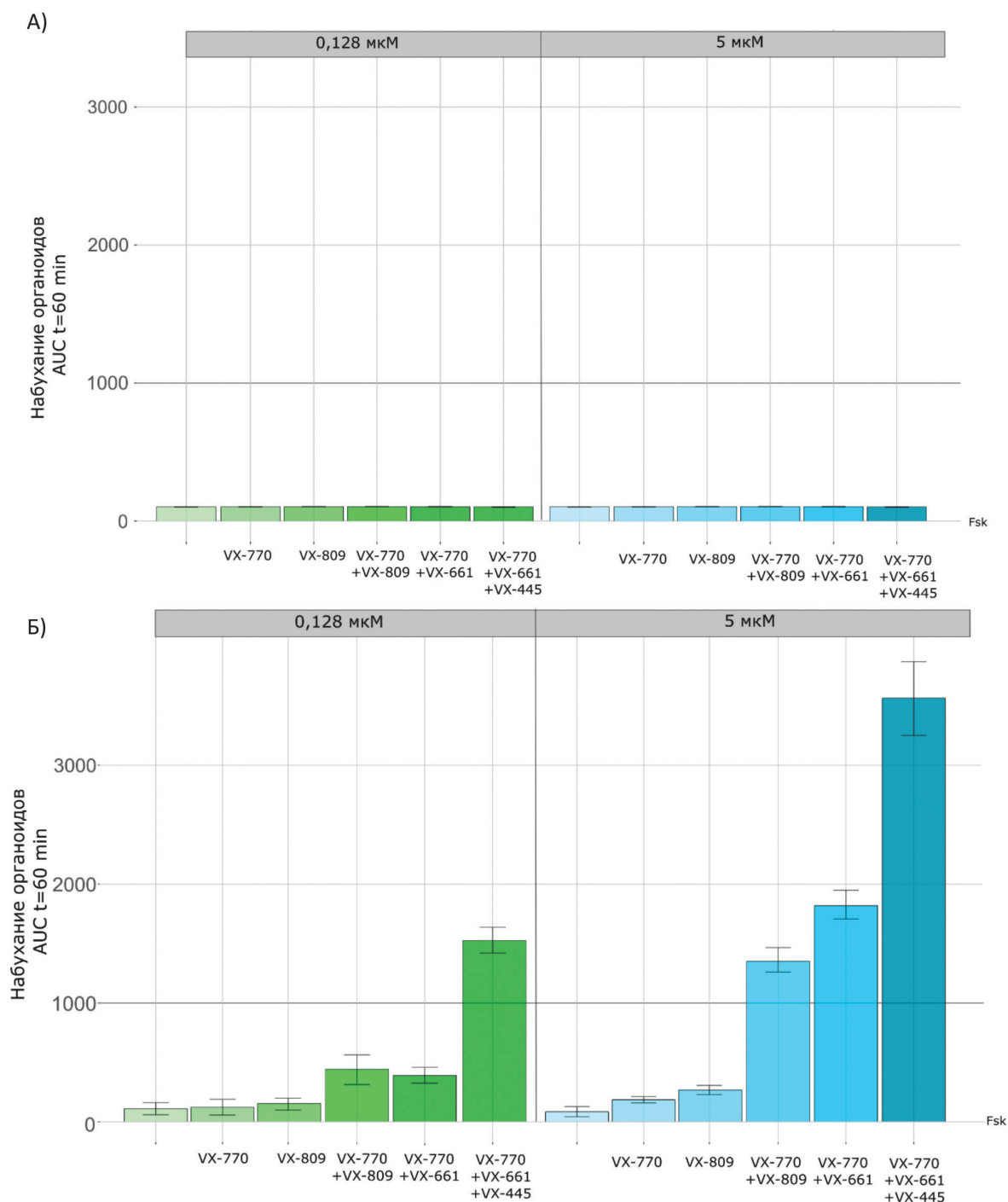


Рис. 3. Гистограммы количественной оценки набухания органоидов пациентов с генотипами (А) p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 и (Б) F508del/F508del (контроль) при стимуляции форсколином и CFTR-модуляторами. По оси Y указано абсолютное значение AUC после обработки органоидов форсколином.

Fig. 3. Histograms of quantitative assessment of swelling of organoids of a patients with the genotype (A) p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 and (Б) F508del/F508del (control) upon stimulation with forskolin and CFTR modulators. The Y-axis indicates the absolute value of AUC after forskolin exposure.

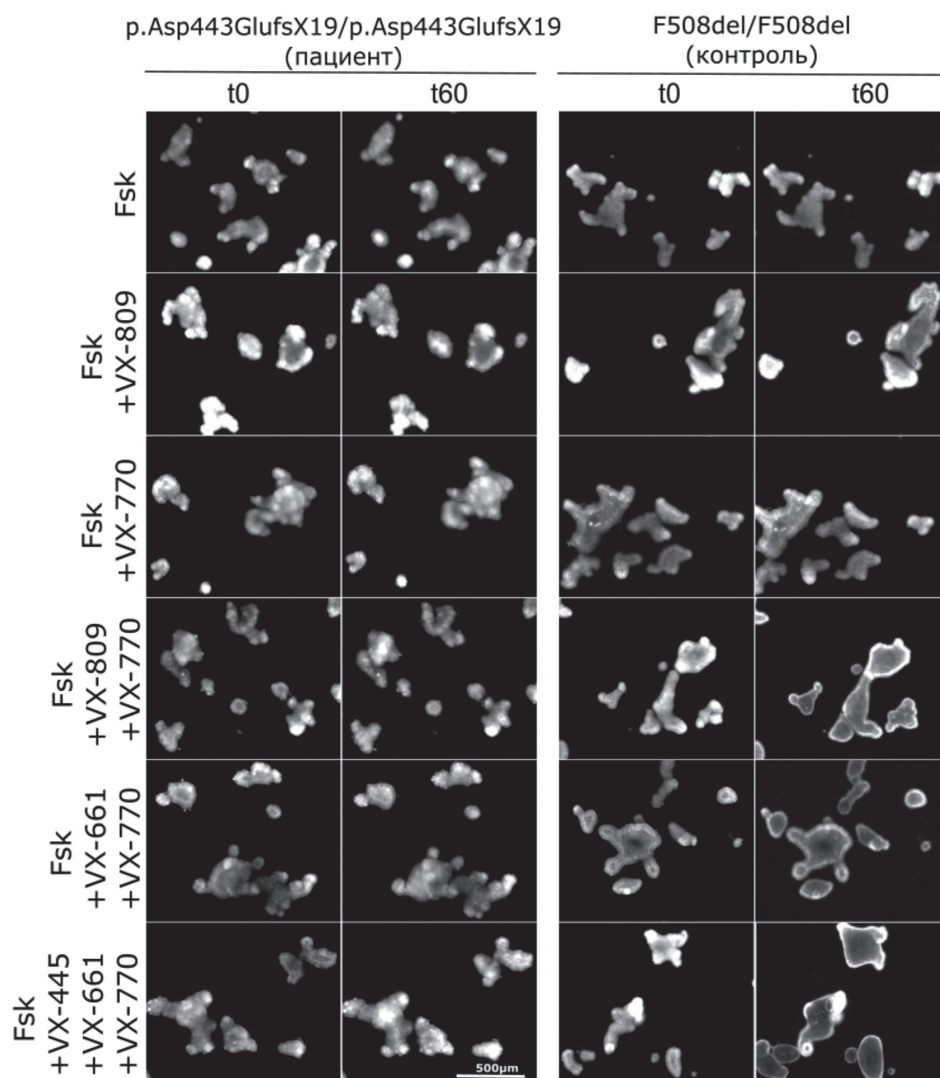


Рис. 4. Исследование остаточной функциональной активности CFTR-канала и влияния потенциатора VX-770 и корректоров VX-809, VX-661, VX-445 на его функцию у пациента с генотипом p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 по сравнению с контрольной культурой F508del/F508del. Концентрация форсколина (Fsk) составляет 5 мкМ. Концентрации потенциатора (VX-770) и корректоров (VX-809, VX-661, VX-445) составляют 3,5 мкМ. Масштабная шкала – 500 мкм.

Fig. 4. Study of the residual functional activity of the CFTR channel and the effect of the potentiator VX-770 and correctors VX-809, VX-661, VX-445 on its function in a patient with the p.Asp443GlufsX19/p.Asp443GlufsX19 genotype compared to the control culture F508del/F508del. The concentration of forskolin (Fsk) is 5 μ M. The concentrations of the potentiator (VX-770) and correctors (VX-809, VX-661, VX-445) are 3.5 μ M. Scale bar: 500 μ m.

Закключение

В данном исследовании продемонстрирована история развития, клиническая картина заболевания, а также полная корреляция результатов функциональных тестов с фенотипической картиной МВ

у гомозиготного носителя редкого патогенного варианта p.Asp443GlufsX19, относящегося к I классу нарушений гена *CFTR*. Методом ОРКП *ex vivo* продемонстрировали отсутствие у пациента с МВ функциональной активности хлорного CFTR-канала, а при стимуляции форсколином органоиды пациен-

та с генотипом p.Asp443GluX19/p.Asp443GluX19 не ответили набуханием, что свидетельствует о полном нарушении образования функционального белка CFTR. Воздействие на кишечные органоиды зарегистрированными в составе лекарственных препаратов CFTR-модуляторами не привело к их набуханию, в отличие от контрольной культуры, гомозиготной по F508del. Хлорный канал пациента с генотипом p.Asp443GluX19/p.Asp443GluX19 оказался нечувствителен ни к одному CFTR модулятору, в отличие от пациента с генотипом F508del/F508del, которому, на основании результатов форсколинового теста, может быть назначена терапия тремя комбинированными таргетными препаратами: ивакафтор+люмакафтор, ивакафтор+тезакафтор, ивакафтор+тезакафтор+элексакафтор.

Литература

- Egan M.E. Genetics of Cystic Fibrosis. *Clin. Chest Med.* 2016; 37; 9–16
- Marson F.A.L., Bertuzzo C.S., Ribeiro J.D. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir. Med.* 2016; 4; e37–8
- Pereira S.V.-N., Ribeiro J.D. Ribeiro A.F., et al. Novel, rare and common pathogenic variants in the CFTR gene screened by high-throughput sequencing technology and predicted by in silico tools. *Sci. Rep.* 2019; 9; 6234
- Noordhoek J., Gulmans V., Van Der Ent K., et al. Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: A successful patient-oriented research collaboration. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2016; 22; 610–6
- Boj S.F., Vonk A.M., Statia M., et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: An in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J. Vis. Exp.* 2017; 2017; 1–12
- Muilwijk D., de Poel E., van Mourik P., et al. Forskolin-induced organoid swelling is associated with long-term cystic fibrosis disease progression. *Eur. Respir. J.* 2022; 60
- Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2020 год. Под редакцией Е.И. Кондратьевой, С.А. Красовского, М.А. Стариновой, А.Ю. Воронковой, Е.Л. Амелиной, Н.Ю. Каширской, С.Н. Авдеева, С.И. Куцева.: ИД «Медпрактика-М». 2022: 68 с.
- Castellani C., Duff A.J.A., Bell S.C., et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J. Cyst. Fibros.* 2018; 17; 153–78
- Клинические рекомендации. Кистозный Фиброз (Муковисцидоз). 2021 https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/372_2
- Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013; 1; 1–6
- Vonk A.M., van Mourik P., Ramalho A.S., et al. Protocol for Application, Standardization and Validation of the Forskolin-Induced Swelling Assay in Cystic Fibrosis Human Colon Organoids. *STAR Protoc.* 2020; 1; 1–31
- Dekkers J.F., Berkers G., Kruisselbrink E., et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8
- Ramalho A.S., Förstová E., Vonk A.M., et al. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2021; 57
- Melyanovskaya J.L., Kondratieva E.I., Kutsev S.I. Determination of reference values for the method of intestinal current measurement in the Russian Federation. *Med. News North Caucasus* 2020; 15
- Guimbellot J., Sharma J., Rowe S.M. Toward inclusive therapy with CFTR modulators: Progress and challenges. *Pediatr. Pulmonol.* 2017; 52; S4–14
- Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: Validation and reference data. *Thorax* 2010; 65; 594–9
- Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A., et al. Multicenter Intestinal Current Measurements in Rectal Biopsies from CF and Non-CF Subjects to Monitor CFTR Function. *PLoS One* 2013; 8; 1–13
- Kondratyeva E., Melyanovskaya Y., Efremova A., et al. Clinical and Genetic Characteristics of a Patient with Cystic Fibrosis with a Complex Allele [E217G;G509D] and Functional Evaluation of the CFTR Channel. *Genes (Basel).* 2023; 14; 1705
- Kondratyeva E., Melyanovskaya Y., Bulatenko N., et al. Clinical and Functional Characteristics of the E92K CFTR Gene Variant in the Russian and Turkish Population of People with Cystic Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24; 6351
- Kondratyeva E., Bulatenko N., Melyanovskaya Y., et al. Personalized Selection of a CFTR Modulator for a Patient with a Complex Allele [L467F;F508del]. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022; 44; 5126–38
- Kondratyeva E., Bukharova T., Efremova A., et al. Health characteristics of patients with cystic fibrosis whose genotype includes a variant of the nucleotide sequence c.3140-16T>A and functional analysis of this variant. *Genes (Basel).* 2021; 12.

References

- Egan M.E. Genetics of Cystic Fibrosis. *Clin. Chest Med.* 2016; 37; 9–16
- Marson F.A.L., Bertuzzo C.S., Ribeiro J.D. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir. Med.* 2016; 4; e37–8
- Pereira S.V.-N., Ribeiro J.D. Ribeiro A.F., et al. Novel, rare and common pathogenic variants in the CFTR gene screened by high-throughput sequencing technology and predicted by in silico tools. *Sci. Rep.* 2019; 9; 6234
- Noordhoek J., Gulmans V., Van Der Ent K., et al. Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: A successful patient-oriented research collaboration. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2016; 22; 610–6
- Boj S.F., Vonk A.M., Statia M., et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: An in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J. Vis. Exp.* 2017; 2017; 1–12
- Muilwijk D., de Poel E., van Mourik P., et al. Forskolin-induced organoid swelling is associated with long-term cystic fibrosis disease progression. *Eur. Respir. J.* 2022; 60
- Registratsiyentov s mukovistsidozom v Rossiyskoy Federatsii. 2020 god. Pod redaktsiyey Ye.I. Kondrat'yevoy, S.A. Krasovskogo, M.A. Starinovoy, A.YU. Voronkovoy, Ye.L. Amelinoy, N.YU. Kashirskoy, S.N. Avdeyeva, S.I. Kutseva [Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. 2020 Edited by E.I. Kondratyeva, S.A. Krasovskiy, M.A. Starinova, A.Yu. Voronkova, E.L. Amelina, N.Yu. Kashirskaya, S.N. Avdeev, S.I. Kutsev]. ID «Medpraktika-M» [Publishing House “Medpraktika-M”]. 2022 ; 68 p. (In Russ.)
- Castellani C., Duff A.J.A., Bell S.C., et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J. Cyst. Fibros.* 2018; 17; 153–78
- Klinicheskkiye rekomendatsii. Kistoznyy Fibroz (Mukovistsidoz). 2021 [Clinical recommendations. Cystic Fibrosis (Cystic Fibrosis). 2021] https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/372_2 (In Russ.)

10. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.* 2013; 1; 1–6
11. Vonk A.M., van Mourik P., Ramalho A.S., et al. Protocol for Application, Standardization and Validation of the Forskolin-Induced Swelling Assay in Cystic Fibrosis Human Colon Organoids. *STAR Protoc.* 2020; 1; 1–31
12. Dekkers J.F., Berkers G., Kruisselbrink E., et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8
13. Ramalho A.S., Förstová E., Vonk A.M., et al. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2021; 57
14. Melyanovskaya J.L., Kondratieva E.I., Kutsev S.I. Determination of reference values for the method of intestinal current measurement in the Russian Federation. *Med. News North Caucasus* 2020; 15
15. Guimbellot J., Sharma J., Rowe S.M. Toward inclusive therapy with CFTR modulators: Progress and challenges. *Pediatr. Pulmonol.* 2017; 52; S4–14
16. Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: Validation and reference data. *Thorax* 2010; 65; 594–9
17. Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A., et al. Multicenter Intestinal Current Measurements in Rectal Biopsies from CF and Non-CF Subjects to Monitor CFTR Function. *PLoS One* 2013; 8; 1–13
18. Kondratyeva E., Melyanovskaya Y., Efremova A., et al. Clinical and Genetic Characteristics of a Patient with Cystic Fibrosis with a Complex Allele [E217G;G509D] and Functional Evaluation of the CFTR Channel. *Genes (Basel).* 2023; 14; 1705
19. Kondratyeva E., Melyanovskaya Y., Bulatenko N., et al. Clinical and Functional Characteristics of the E92K *CFTR* Gene Variant in the Russian and Turkish Population of People with Cystic Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24; 6351
20. Kondratyeva E., Bulatenko N., Melyanovskaya Y., et al. Personalized Selection of a CFTR Modulator for a Patient with a Complex Allele [L467F;F508del]. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022; 44; 5126–38
21. Kondratyeva E., Bukharova T., Efremova A., et al. Health characteristics of patients with cystic fibrosis whose genotype includes a variant of the nucleotide sequence c.3140-16T>A and functional analysis of this variant. *Genes (Basel).* 2021; 12