

# Клинико-генетическая характеристика больных муковисцидозом с впервые описанным патогенным вариантом *CFTR* с.1083G>A (p.Trp361\*) и функциональной оценкой работы хлорного канала

Кондратьева Е.И.<sup>1,2</sup>, Мельяновская Ю.Л.<sup>1</sup>, Ефремова А.С.<sup>1</sup>, Булатенко Н.В.<sup>1</sup>, Бухарова Т.Б.<sup>1</sup>, Петрова Н.В.<sup>1</sup>, Зодьбинова А.Э.<sup>1</sup>, Шерман В.Д.<sup>1,2</sup>, Каширская Н.Ю.<sup>1</sup>, Леднева В.С.<sup>3,4</sup>, Ульянова Л.В.<sup>3,4</sup>, Зинченко Р.А.<sup>1,5</sup>, Гольдштейн Д.В.<sup>1</sup>, Куцев С.И.<sup>1</sup>

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова»  
115522 г. Москва, ул. Москворечье, 1

2 — ГБУ Московской области «Московский областной консультативно-диагностический центр для детей»  
141009, Московская область, г. Мытищи, ул. Коминтерна, 24А с1,

3 — ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
394036 г. Воронеж, ул. Студенческая, 10

4 — БУЗ Воронежской области «Областная детская клиническая больница №2», Региональный центр муковисцидоза  
394024 г. Воронеж, ул.45 стрелковой дивизии, 64.

5 — ФГБНУ «Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко»  
105064, г. Москва, ул. Воронцово поле, 12/1,

В статье впервые представляется клинико-генетическая характеристика мутации с.1083G>A (p.Trp361\*) в гене *CFTR*. Патогенный генетический вариант с.1083G>A (p.Trp361\*) гена *CFTR* относится к нонсенс-мутациям (I класс) и впервые был внесён в базу данных CFTR1 (<http://www.genet.sickkids.on.ca>) в середине 2019 г. без описания клинической картины муковисцидоза.

**Методы.** Проведен анализ амбулаторных карт и историй болезни двух пациентов из неродственных семей с редким генетическим вариантом с.1083G>A (p.Trp361\*). Для определения разности кишечных потенциалов (ОРКП) и проведения форсколинового теста на кишечных органоидах использовали биопсийный материал слизистой прямой кишки пациентов. ДНК для секвенирования выделяли из лейкоцитов венозной крови пациентов.

**Результаты.** Анализ клинических проявлений заболевания у детей 6 и 9 лет показал наличие хронической панкреатической недостаточности, более выраженной у одного ребенка с синдромом дистальной интестинальной обструкции кишечника в анамнезе. Клиническая картина второго пациента характеризовалась развитием в раннем возрасте транзиторной гипербилирубинемии, синдрома псевдо-Барттера, а в дальнейшем – повторными эпизодами бронхиальной обструкции и развитием полипозного риносинусита. ОРКП и форсколиновый тест на кишечных органоидах показали, что генетический вариант с.1083G>A (p.Trp361\*) относится к вариантам гена *CFTR* с отсутствием функции хлорного канала.

**Выводы.** Впервые представлены описание клинической картины муковисцидоза у двух пациентов из неродственных семей с патогенным вариантом с.1083G>A (p.Trp361\*) в компаунде с вариантом с.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) (ранее называемом F508del) и результаты оценки функции белка *CFTR* методом ОРКП и форсколиновым тестом на кишечных органоидах.

**Ключевые слова:** муковисцидоз, генетические варианты, ген *CFTR*, определение разности кишечных потенциалов, кишечные органоиды, форсколиновый тест, корректор VX-809, потенциатор VX-770.

**Для цитирования:** Кондратьева Е.И., Мельяновская Ю.Л., Ефремова А.С., Булатенко Н.В., Бухарова Т.Б., Петрова Н.В., Зодьбинова А.Э., Шерман В.Д., Каширская Н.Ю., Леднева В.С., Ульянова Л.В., Зинченко Р.А., Гольдштейн Д.В., Куцев С.И. Клинико-генетическая характеристика больных муковисцидозом с впервые описанным патогенным вариантом *CFTR* с.1083G>A (p.Trp361\*) и функциональной оценкой работы хлорного канала. *Медицинская генетика* 2019; 18(9): 9-18

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.09.9-18

**Автор для корреспонденции:** Кондратьева Елена Ивановна, e-mail: elenafpk@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России на выполнение НИР.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

**Поступила:** 28.09.2019

## ***Clinical and genetic features of cystic fibrosis patients with novel pathogenic variant CFTR c.1083G> A (p.Trp361 \*) and functional assessment of the activity of the chloride channel***

**Kondratyeva E.I.<sup>1,2</sup>, Melyanovskaya Y.L.<sup>1</sup>, Efremova A.S.<sup>1</sup>, Bulatenko N.V.<sup>1</sup>, Bukharova T.B.<sup>1</sup>, Petrova N.V.<sup>1</sup>, Zodbinova A.E.<sup>1</sup>, Sherman V.D.<sup>1,2</sup>, Kashirskaya N.Yu.<sup>1</sup>, Ledneva V.S.<sup>3,4</sup>, Ulyanova L.V.<sup>3,4</sup>, Zinchenko R.A.<sup>1,5</sup>, Goldshtein D.V.<sup>1</sup>, Kutsev S.I.<sup>1</sup>**

1 — Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechie st., 1, 115522 Moscow, Russia.

2 — Moscow Regional Consultative and Diagnostic Center for Children

Comintern st., 24A s1, 141009 Mytishchi, Moscow Region, Russia

3 — Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

10 Studencheskaya st., 394036 Voronezh, Russia

4 — Regional Children's Clinical Hospital No. 2, Regional Center for Cystic Fibrosis

45 Strelkovoy Divisii st., 64, 394024 Voronezh, Russia

5 — N.A. Semashko National Research Institute of Public Health

Vorontsovo pole st., 12/1, 129110 Moscow, Russia

In this article we continue to describe the pathogenic variants of the *CFTR* gene identified among Russian cystic fibrosis (CF) patients. For the first time the clinical and genetic characteristics of the mutation c.1083G> A (p.Trp361 \*) are presented.

The pathogenic genetic variant c.1083G> A (p.Trp361 \*) of the *CFTR* gene belongs to the nonsense mutations (class I) and was listed for the first time in the CFTR1 database (<http://www.genet.sickkids.on.ca>) by Professor Milan Macek et al. in mid-2019 without any description of clinical manifestations of cystic fibrosis.

**Methods.** The data of the National Register of Patients with Cystic Fibrosis of the Russian Federation 2017 were analyzed. Out-patient records and case histories of two patients from unrelated families carrying a rare genetic variant c.1083G> A (p.Trp361 \*) were analyzed. To determine the Intestinal current measurement (ICM) and Forskolin-induced swelling (FIS) in intestinal organoids, rectal biopsy material of CF patients was used. DNA for sequencing was isolated from leukocytes of venous blood of the patients.

**Results.** Variant c.1083G> A (p.Trp361 \*) was found in two patients from unrelated families from different regions of the Russian Federation, according to the Register of Cystic Fibrosis Patients in the Russian Federation 2017. Analysis of clinical manifestations of the disease in children 6 and 9 years old showed the presence of chronic pancreatic insufficiency, more expressed in one child with a history of distal intestinal obstruction syndrome. The clinical manifestation of the second patient was characterized by the development of transient hyperbilirubinemia, Pseudo-Bartter's syndrome at an early age, and subsequently repeated episodes of bronchial obstruction and the development of polypoid rhinosinusitis. The ICM method and the FIS in intestinal organoids showed that the genetic variant c.1083G> A (p.Trp361 \*) refers to the variants of the *CFTR* gene with the absence of chloride channel function.

**Conclusion.** The clinical picture of cystic fibrosis in two patients from unrelated families with the pathogenic variant c.1083G> A (p.Trp361 \*) in the compound with variant c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) (variant legacy name F508del) and results of the evaluation of the *CFTR* protein functions, obtained by the method of ICM and using the FIS assay in intestinal organoids, are presented for the first time. Patients continue to be under the control in Russian CF centers.

**Keywords:** cystic fibrosis, genetic variants, *CFTR* gene, intestinal current measurement (ICM), intestinal organoids, Forskolin-Induced Swelling (FIS) assay, corrector VX-809, potentiator VX-770.

**For citation:** Kondratyeva E.I., Melyanovskaya Y.L., Efremova A.S., Bulatenko N.V., Bukharova T.B., Petrova N.V., Zodbinova A.E., Sherman V.D., Kashirskaya N.Yu., Ledneva V.S., Ulyanova L.V., Zinchenko R.A., Goldshtein D.V., Kutsev S.I. Clinical and genetic features of cystic fibrosis patients with novel pathogenic variant CFTR c.1083G> A (p.Trp361\*) and functional assessment of the activity of the chloride channel. *Medical genetics* 2019; 18(9): 9-18. [In Rus]

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.09.9-18

**Corresponding author.** Kondratyeva Elena, e-mail: elenafpk@mail.ru

**Funding.** The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 28.09.2019

## **Введение**

**М**уковисцидоз (МВ) или кистозный фиброз (cystic fibrosis) — аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене муковисцидозного трансмембранного регулятора про-

водимости (*CFTR* — cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) и поражающее жизненно важные органы и системы. Средняя частота заболевания в России составляет 1 на 10000 новорожденных [1] с вари-

цией между регионами. Ген *CFTR* расположен в регионе 31.1 длинного плеча хромосомы 7(7q31.1), имеет протяженность около 250 т.п.н. и включает 27 экзонов. Белок CFTR относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассетных белков и состоит из пяти доменов: двух мембранно-охватывающих (MSD1 и MSD2), двух нуклеотидсвязывающих (NBD1 и NBD2) и регуляторного (R) [2,3]. Функционирует CFTR как цАМФ-зависимый хлорный канал, участвующий не только в переносе ионов хлора, но и в регуляции других ионных каналов и мембранного транспорта [4]. Нарушение функции CFTR приводит к блокировке транспорта ионов хлора, увеличению абсорбции ионов натрия, нарушению электролитного состава секрета, следствием чего является снижение или полное прекращение секреции жидкости через апикальную мембрану эпителиальных клеток.

Клинически заболевание проявляется хроническим и прогрессирующим поражением дыхательных путей, экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, нарушениями работы желудочно-кишечного тракта и печени, а также снижением репродуктивной функции у больных и рядом других проявлений [5]. МВ характеризуется широкой вариабельностью клинических проявлений, в большей мере обусловленной многообразием вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR* [6]. По состоянию на 11 марта 2019 г. на веб-сайте международного проекта CFTR2 представлено 346 патогенных вариантов гена. В Регистре больных МВ РФ за 2017 г. представлены 196 патогенных вариантов гена *CFTR*, 94 из них встретились неоднократно [7]. В зависимости от влияния на функцию белка все варианты гена *CFTR* подразделяют на шесть классов. Патогенные варианты I–III классов гораздо более серьезно нарушают функцию CFTR, чем варианты IV–VI классов, и ассоциированы с классическим течением МВ. При наличии у больного генетического варианта IV, V или VI класса частично сохраняется работа хлорного канала. Для этих вариантов характерно сохранение функции поджелудочной железы и преимущественное поражение дыхательного тракта.

В международной базе данных мутаций гена *CFTR* (Cystic Fibrosis Mutation Database, CFTR1) вариант с.1083G>A (p.Trp361\*) впервые описан у одного пациента М. Мацеком с соавт. [8]. Данный генетический вариант у российских пациентов впервые был отмечен в статье [9]. Однако клинические проявления не были описаны в обеих работах. Идентификация новых редких генетических вариантов *CFTR* и генотипов расширяет базу данных генетических вариантов и требует описания их фенотипов.

**Целью** данного исследования является описание клинической картины заболевания двух пациентов,

несущих в своем генотипе редкий генетический вариант с.1083G>A (p.Trp361\*).

## Методы

Для оценки клинической картины были использованы данные национального регистра больных МВ РФ за 2017 г. [10] и выписки из историй болезни и амбулаторной карты пациента. Проект «Регистр больных муковисцидозом Российской Федерации» одобрен Комитетом по этике ФГБНУ «МГНЦ» 20 декабря 2012 г., пациенты с МВ и/или их представители дали информированное согласие на участие в исследовании.

Данные в регистр вносились согласно требованиям европейского регистра [11]. При анализе анамнестических данных оценивали возраст установления диагноза, показатели хлоридов пота при проведении потового теста, микробный пейзаж, нутритивный статус, данные спирометрии, осложнения течения МВ (МВ-зависимый сахарный диабет — МЗСД, цирроз печени, назальные полипы, кровохарканье и легочные кровотечения, эпизоды пневмоторакса), терапию.

Выделение геномной ДНК пациентов проводили из лейкоцитов венозной крови с использованием набора реактивов «Wizard Genomic DNA Purification Kit» фирмы «Promega» (USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ последовательности гена *CFTR* проведен методом секвенирования по Сэнгеру. При анализе результатов секвенирования использована информация о патогенных вариантах гена *CFTR* в базах данных МГНЦ [12], CFTR1 [13], CFTR2 [14], Exome Aggregation Consortium [15], Genome Aggregation Database [16], Exome Variant Server [17], 1000 Genomes Project [18], dbSNP [19], dbVar [20], OMIM [21], Human Gene Mutation Database [22], Clin Var [23], Human Genome Variation Society [24], DECIPHER [25].

Для установления/подтверждения клинической значимости нового генетического варианта применялся метод определения разности кишечных потенциалов (ОРКП). Исследование проведено одному пациенту (клинический случай 1). Метод ОРКП основан на определении функциональной активности ионных каналов, в том числе хлорных, слизистой прямой кишки при добавлении стимуляторов (амилорид, форсколин/IBMX, генистеин, карбахол, 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновой кислоты (DIDS) и гистамин). Исследование методом ОРКП проводилось согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7\_26.10.11 [26]. Функциональная активность CFTR определялась на мембранах эпителиальных клеток ректальных (кишечных) биоптатов, полученных от пациента, в ответ на

введение стимуляторов: амилорида, форсколина/IBMX (3-изобутил-1-метилксантин), генистеина, карбахола, DIDS и гистамина. Исследование проводилось после подписания представителями пациента информированного добровольного согласия на участие в исследовании с использованием ОРКП. Исследование и форма информированного добровольного согласия были одобрены Комитетом по Этике ФГБНУ «МГНЦ» 15 октября 2018 г. Контролем служили результаты многоцентрового исследования «Multicenter Intestinal Current Measurements in Rectal Biopsies from CF and Non-CF Subjects to Monitor CFTR Function» [27].

Для исследования остаточной функциональной активности канала CFTR из ректальных биоптатов пациента (клинический случай 1) по стандартным протоколам [28, 29, 30] была получена стабильная культура кишечных органоидов. После серии промывок раствором PBS для изоляции крипт биоптаты инкубировали в 10 мМ EDTA в PBS. После центрифугирования (5 мин, 130 g, +4°C) к осадку с криптами добавляли «Матригель» (Corning, США), смешанный со средой культивирования в соотношении 1:1. Затем полученную суспензию высевали на 24-луночные планшеты из расчета 30 мкл на лунку (примерно 7–10 крипт на лунку). После полимеризации «Матригеля» с заключенными в нем криптами в каждую лунку добавляли по 0,5 мл среды культивирования. Через 5–7 дней, после разрастания и почкования крипт проводили их пересев. Разделение крупных, разросшихся структур на небольшие фрагменты осуществляли механическим способом (интенсивным ресуспендированием) в среде Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США). После центрифугирования (5 мин, 130 g, +4°C) осадок органоидов смешивали с «Матригелем», высевали на культуральные планшеты, оставляли на 30 мин для полимеризации и заливали средой культивирования. Состав среды культивирования: Wnt-3A- и Noggin- кондиционированные среды (50% и 10%, соответственно), Advanced DMEM/ F12 (40%; Thermo Fisher Scientific, США), mEGF (50 нг/мл; Prospeс), hR-Spondin-3 (300 нг/мл; Peprotech), B27 (2%; Life Technologies: Gibco, США), N-ацетилцистеин (1.25 мМ; Sigma-Aldrich, США), никотинамид (10 мМ; Sigma-Aldrich, США), A83-01 (5 мМ; Tocris, Великобритания), SB 202190 (10 мМ; Sigma-Aldrich, США), примоцин (100 мкг/мл; InvivoGen, США). Все этапы культивирования осуществляли при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для проведения форсколинового теста кишечные органоиды высевали на 96-луночные планшеты (Corning, США) с соблюдением тех же условий, что и при пассировании. Через 24 ч органоиды прижизненно окрашивали 0,84 мМ Calcein AM в течение

1 часа (Biotium, США) и обрабатывали только форсколином (Sigma-Aldrich, США) или форсколином в присутствии таргетных препаратов. Концентрация форсколина – 5 мМ. Корректор VX-809 (Selleckchem, США) в концентрации 5 мМ добавляли на стадии посева, а потенциатор VX-770 (Selleckchem, США) в концентрации 5 мМ одновременно с форсколином. Через определенные интервалы времени (0, 20, 40, 60 и 90 мин) проводили съемку «фиксированных» полей с использованием флуоресцентного микроскопа Observer. D1 (Zeiss, Германия) для регистрации ответа органоидов на стимуляцию. Изображения были получены при использовании объектива х5. Количественный анализ набухания органоидов проводили с использованием программы Image J, статистическую обработку полученных данных – с помощью программы Sigma Plot 12.5. Для каждого образца (Fsk, Fsk+VX-770, Fsk+VX-809 и Fsk+VX-770+VX-809) было проанализировано не меньше 6 лунок. За 100% принимали площадь органоидов в «фиксированном» поле до стимуляции форсколином (0 мин).

## Результаты

По данным регистра больных МВ в РФ за 2017 год [10], вариант с.1083G>A (p.Trp361\*) встречается у двух больных из неродственных семей из разных регионов РФ, и его аллельная частота составляет 0,04% аллельной частоты всех вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR*. В международной базе CFTR2 [14] данный вариант p.Trp361\* не описан. По обновленным данным в базе CFTR1 (<http://www.genet.sickkids.on.ca>) М. Мацеком с соавт. в середине 2019 г. был впервые представлен данный вариант у одного больного в сочетании с p.Phe508del, однако клиническая картина проявлений МВ не была представлена [9]. Петрова Н.В. с соавт. в 2019 г. указали данный вариант в числе редких аллелей гена *CFTR* у больных РФ [8], выявив его у одного пациента (рис. 1). В дальнейшем данный вариант обнаружен еще у одного больного из неродственной семьи.

Фенотипические особенности генотипа p.Trp361\*/p.Phe508del у 2-х пациентов 6 и 9 лет, наблюдающихся в центрах муковисцидоза страны, описаны нами впервые.

**Клинический случай 1.** Ребенок, девочка 2012 года рождения (6 лет), с диагнозом: *Муковисцидоз, смешанная форма, среднетяжелое течение (E 84.8). Генотип с.[1521\_1523delCTT];[1083G>A] (p.[Phe508del];[Trp361\*]). Хронический бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность Микробиологический диагноз: хроническая стафилококковая инфекция. Осложнения: дефицит вита-*

мина D, синдром дистальной интестинальной обструкции при муковисцидозе (СДИО, 2019.)

Диагноз «муковисцидоз» установлен в 2 месяца на основании положительного неонатального скрининга на МВ (иммунореактивный трипсин (ИРТ)1 — 184 нг/мл (норма до 65 нг/мл), ИРТ2 — 541,7 нг/мл (норма до 40 нг/мл)), положительного результата потовой пробы на аппарате «Нанодакт» (проводимость пота эквивалентна 118 ммоль/л NaCl при норме до 50 ммоль/л), результатов генетического обследования (генотип с.[1521\_1523delCTT];[1083G>A] (p.[Phe508del];[Trp361\*]), низкого значения панкреатической эластазы 1 (менее 15 мкг/г кала).

**Анамнез жизни.** Ребенок от 3 беременности, протекавшей с угрозой прерывания, первых родов (1 беременность — выкидыш, 2 беременность — медицинский аборт). Срок гестации — 30 недель. Вес при рождении — 2750 г, рост — 49 см. К 1 году жизни развивалась по возрасту, нутритивный статус соответствовал возрасту, 2-3 раза в год переносила острые респираторные инфекции (ОРИ) в легкой форме, антибактериальную терапию не получала. Родственники не верили в заболевание ребенка, в связи с чем он наблюдался нерегулярно. Доза панкреатина на первом году жизни была не более 5 капсул в сутки (2000-5000 ЕД/кг массы тела).

На 2-м году жизни зарегистрирована ОРИ однократно, по этому поводу получала азитромицин и цефуроксим последовательно в связи с длительной лихорадкой и изменениями воспалительного характера со стороны общего анализа крови (СОЭ — 18 мм/час, лейкоциты —  $11,7 \times 10^9/\text{л}$ ). При рентгенологическом исследовании легких инфильтративных теней не выявлено. Со стороны биохимического анализа изменений также не зарегистрировано. Микробиологическое исследование в 2014 г. (2 года) выявило наличие *Staphylococcus aureus*  $10^5$  в мокроте, чувствительность к антибиотикам была сохранена. Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной (2012-2014 гг.)

полости показало усиление сосудистого рисунка печени, усиление эхогенности поджелудочной железы.

В 2015 г. (3 года) при копрологическом исследовании обнаружено большое количество нейтрального жира. Проведено исследование уровня панкреатической эластазы кала 1, который составил 5 мкг/г кала. В связи с чем доза панкреатина была увеличена до 14–15 капсул в день (10 000 ЕД/кг в сутки). В связи с тем, что родители длительно не принимали диагноз ребенка, регулярную муколитическую терапию в виде ингаляций Пульмозима (Дорназа-альфа) 2,5 мл через небулайзер 1 раз в день и 4% натрия хлорида пациентка стала получать только с трех лет.

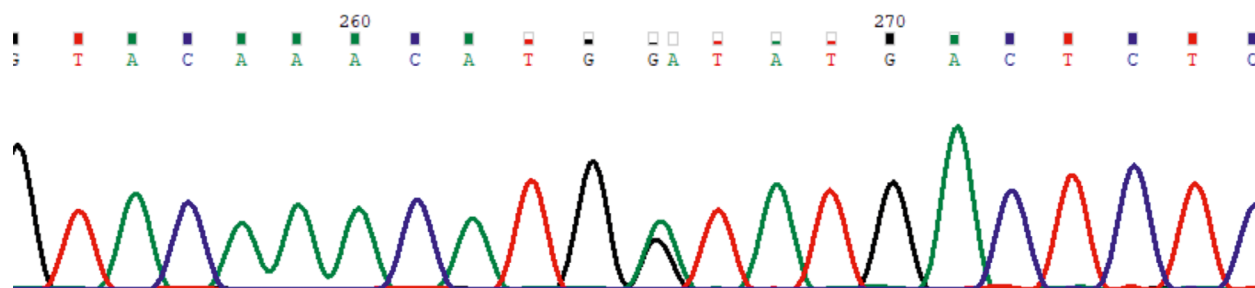
В 2016 г. (4 года) потребность в панкреатине на начало года — 250 000 ЕД в сутки (15 000 ЕД/кг), в конце года — 300 000 ЕД (18 000 ЕД/кг), что выше рекомендуемых доз в национальных и европейских консенсусах. При проведении УЗИ брюшной полости выявлены гепатомегалия, диффузные изменения поджелудочной железы.

В 2017 г. (5 лет) ОРИ отмечались 3 раза, 1 раз получала антибактериальную терапию.

По данным компьютерной томографии (КТ) легких в 2017 г. изменений не выявлено

С сентября 2018 г. (6 лет) до февраля 2019 пациентка болела ежемесячно ОРИ, получала 2 раза курс амоксициллина + клавулановая кислота. Микробиологическое исследование в 2018 г. показало рост *Staphylococcus aureus*, чувствительность к антибиотикам была сохранена. Отмечено снижение уровня 25(ОН)D до 19,34 нг/мл. Доза витамина D была увеличена до 3 000 ЕД в сутки.

В феврале 2019 г. госпитализирована в связи с клиническими проявлениями СДИО (копростаз). Проводилась консервативная терапия. За год ребенок в массе прибавил 1,6 кг, в росте — 8 см. При осмотре ребенка масса тела составила 22,6 кг (масса тела к возрасту: 46 перцентиль, -0,1 SD по Z-критерию), рост 122 см (58 перцентиль, 0,2 SD по Z-критерию), ИМТ = 14,8 кг/м<sup>2</sup>



**Рис. 1.** Хроматограмма результата секвенирования фрагмента экзона 8 гена CFTR. Замена гаунина (G) на аденина (A) в положении 1083 приводит к замене кодона TGG (триптофан) на TGA (стоп-кодон).

(N=15,4) (35 перцентиль, -0,4 SD по Z-критерию). Сатурация кислородом — 99%. На рентгенограмме грудной клетки изменений не отмечено. Получает панкреатин в суточной дозе 210 000 ЕД (10 000 ЕД/кг). Проводится муколитическая терапия — 6% NaCl 4 мл 2 раза в день, Пульмозим (Дорназа-альфа) 2,5 мл 1 раз в день через небулайзер Пари турбо бой. Также принимает витамины А и Е, витамин D3 — 3000 ЕД в сутки, урсосальк — 8 мл (400 мг — 20 мг/кг).

Таким образом, у ребенка при неонатальном скрининге отмечался высокий уровень ИРТ (ИРТ2 повышен в 3,5 раза), с рождения были проявления тяжелой панкреатической недостаточности (потребность в панкреатических ферментах > 10 000 ЕД/кг), с 6 лет — частые ОРИ, в 2019 г. — СДИО. На последнем осмотре в 2019 г. изменений со стороны бронхолегочной системы не отмечено. Ребенок продолжает наблюдаться в центре муковисцидоза.

Пациентке было проведено обследование методом ОРКП для оценки функциональной активности ионных каналов.

Методом ОРКП были зарегистрированы следующие ответы на введение стимуляторов (**рис. 2 и табл. 1**):

- при добавлении амилорида наблюдается снижение тока короткого замыкания ( $\Delta$ ISC). Амилорид блокирует натриевые каналы (ENaC), которые экспресси-

руются на клетках эпителия в ответ на снижение ионов хлора в околоклеточном пространстве, тем самым вызывая снижение  $\Delta$ ISC [31];

- при внесении в камеру с биопатом стимулятора форсколин/IBMX ответа нет. Форсколин/IBMX — активатор цАМФ-зависимых хлорных каналов (CFTR);

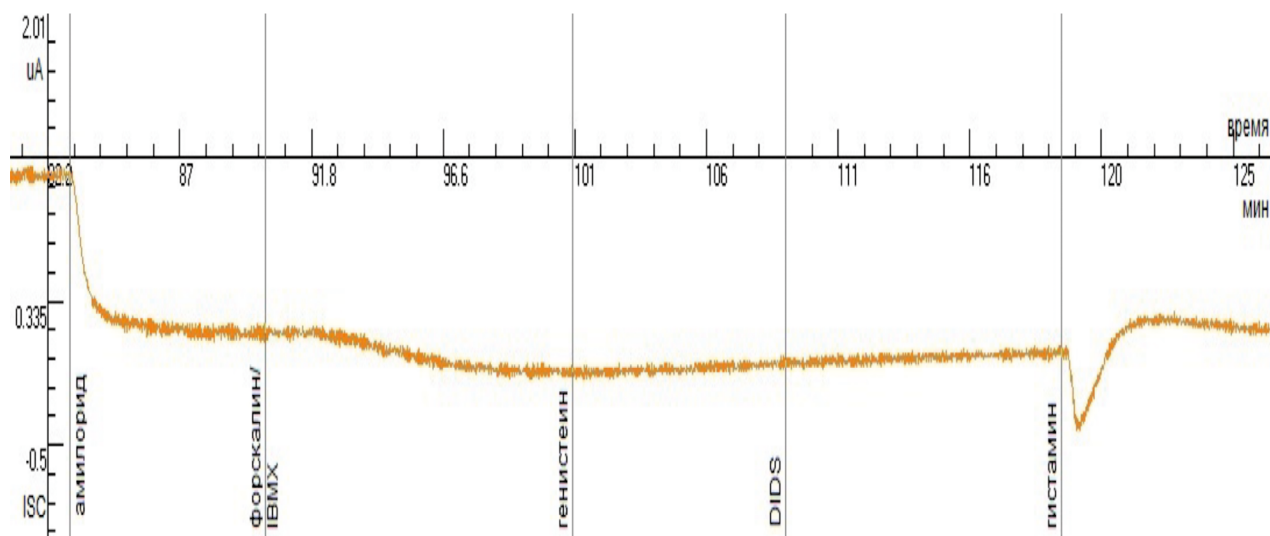
- на введение гистамина ток короткого замыкания изменяется в отрицательную сторону, что отражает отток ионов калия из клеток большого МВ [32];

- ответа на генистеин и DIDS не зарегистрировано.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии функции хлорных каналов эпителия пациента с генотипом с.[1521\_1523delCTT]; [1083G> A] (p.[Phe508del]; [Trp361\*]), показатели  $\Delta$ ISC при добавлении форсколина были ниже, чем данные пациентов с нуклеотидными последовательностями гена *CFTR* 1 и 2 классов с панкреатической недостаточностью [27].

Анализ результатов ОРКП пациентки при сравнении с данными многоцентрового исследования пациентов с генетическими вариантами с сохранной функцией поджелудочной железы [27] показал, что у неё имеет место мутация без сохранной функции поджелудочной железы.

С использованием форсколинового теста на кишечных органоидах, полученных из ректальных биоптатов пациентки, было показано полное отсутствие



**Рис. 2.** Метод ОРКП. Клинический случай 1 (с.[1521\_1523delCTT]; [1083G> A] (p.[Phe508del]; [Trp361\*])). При введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания ( $\Delta$ ISC), ответа на форсколин/IBMX нет, а при добавлении гистамина отмечено изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.



остаточной функции канала CFTR. Обработка органоидов форсколином в высокой концентрации 5 мкМ в течение 1,5 ч не приводила к увеличению объема органоидов, что является доказательством полного нарушения функциональной активности CFTR при генотипе p.[Phe508del];[Trp361\*] (рис. 3). В рамках данной работы было изучено влияние таргетных препаратов (корректора VX-809 и потенциатора VX-770) на функцию белка CFTR. Было показано, что инкубация кишечных органоидов с VX-809 приводит к их умеренному набуханию — на  $38 \pm 5,2\%$  по сравнению с действием одного только форсколина. Потенциатор VX-770 незначительно (на 10%) усиливал действие корректора, но самостоятельно не оказывал положительного эффекта

**Клинический случай 2.** Ребенок, мальчик 2011 года рождения, с диагнозом: *Муковисцидоз, смешан-*

*ная форма, среднетяжелое течение (E 84.8). Генотип c.[1521\_1523delCTT]; [1083G> A] (p.[Phe508del]; [Trp361\*]). Хронический бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность Микробиологический диагноз: хроническая стафилококковая инфекция.*

Ребенок родился от 1 беременности, протекавшей без особенностей, 1-х срочных физиологических самостоятельных родов. Вес при рождении 3100 г, рост 53 см. Период новорожденности протекал на фоне транзиторной гипербилирубинемии за счет холестаза.

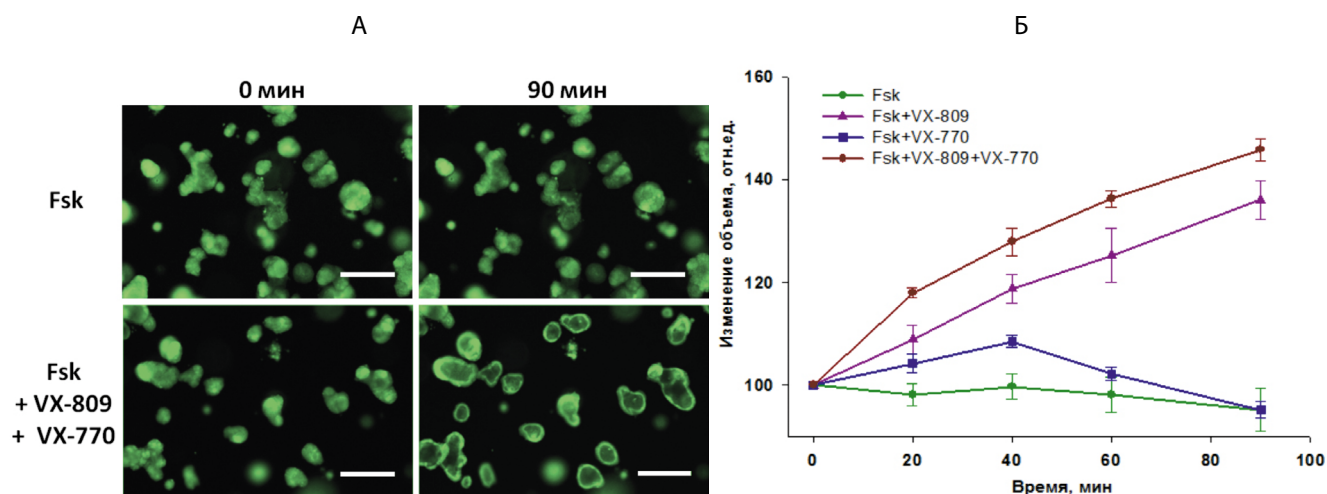
Диагноз установлен в 2 месяца на основании данных неонатального скрининга (ИРТ1 = 169 нг/мл и ИРТ2 = 97,5 нг/мл), положительного результата портовой пробы на аппарате «Нанодакт» (проводимость пота эквивалентна 89 ммоль/л NaCl при норме до 50 ммоль/л), уровня хлоридов пота в системе «Макро-

Таблица 1

Результаты проведения ОРКП ребенку, больному муковисцидозом (клинический случай 1).

$\Delta$ ISC, $\mu$ A/cm <sup>2</sup>	Амилорид	Форсколин/IBMX	Генистеин	DIDS	Гистамин
Биоптат больного № 1	- 45	2	0,5	0	22,5
Биоптат больного № 2	- 28	1	0,5	0,5	8,5
Биоптат больного № 3	- 40,5	1	0,5	0,5	33,5
M $\pm$ m больного	- 37,83 $\pm$ 6,23	1,33 $\pm$ 0,41	0,5	0,33 $\pm$ 0,2	21,5 $\pm$ 8,86
Контроль PI-CF*	-5,2 $\pm$ 2.9	6,1 $\pm$ 3.9	-	-	8,6 $\pm$ 6.0

**Примечание:**  $\Delta$ ISC - ток короткого замыкания, PI-CF - муковисцидоз с панкреатической недостаточностью, \* - данные многоцентрового исследования пациентов с нуклеотидными последовательностями гена *CFTR* 1 и 2 классов с панкреатической недостаточностью [27].



**Рис. 3.** Исследование остаточной активности канала CFTR при генотипе c.[1521\_1523delCTT]; [1083G> A] p.[Phe508del]; [Trp361\*] на кишечных органоидах с использованием форсколинового теста. А – характерные изображения кишечных органоидов до воздействия форсколина и таргетных препаратов (0 мин) и после завершения обработки (90 мин). Масштабная шкала - 200 мкм. Окраска Calcein AM. Б – результаты количественного анализа набухания органоидов при воздействии форсколина в сочетании с таргетными препаратами; Fsk – форсколин; 100% - площадь органоидов до стимуляции форсколином.

дакт» 112 ммоль/л. Диагноз верифицирован на основании постоянного непродуктивного кашля с рождения, проявлений панкреатической недостаточности, холестаза, результатов потовой пробы. В возрасте 4 мес. развился синдром псевдо-Барттера, потребовавший госпитализации для проведения инфузионной терапии. Панкреатическая эластаза I составила 33–88 мкг/г кала (норма 200–500 мкг/г кала), что соответствует тяжелой степени панкреатической недостаточности. На протяжении первых 5 лет (особенно в летний период) на лице, волосах, руках отмечались белые кристаллы соли.

Молекулярно-генетическая диагностика в 5 лет выявила одну мутацию гена *CFTR* (p.[Phe508del]) – F508del в гетерозиготном состоянии.

Заболевание протекало с обострениями преимущественно по бронхитическому типу 3–4 раза в год, за все время наблюдения (8 лет) пневмония была диагностирована 2 раза. В первые годы преобладала клиника риносинусита, трахеобронхита, которые не сопровождались выраженной дыхательной недостаточностью и интоксикацией, не требовали интенсивной терапии. Ребенок постоянно получает терапию: Дорназу-альфа, панкреатические ферменты (7000 ЕД/кг массы тела в сутки), урсодезоксихолевую кислоту (15 мг/кг в сутки), при присоединении бронхообструктивного синдрома – ипратропия бромид + фенотерол, будесонид, курсы внутривенной антибактериальной терапии 2–4 раза в год.

Осмотр (возраст 8 лет): масса тела 31 кг (масса тела к возрасту: 90 перцентиль, 1,3 SD по Z-критерию), рост 139 см (98 перцентиль, 2,1 SD по Z-критерию), ИМТ = 16,3 кг/м<sup>2</sup> (N=15,7) (57 перцентиль, 0,2 SD по Z-критерию). Сатурация кислородом 99%, спирометрия: FVC = 95%, FEV1 = 94%, FEV1\ FVC = 99%, FEV25–75 = 74%. Посев мокроты на флору и чувствительность к антибиотикам выявил рост MSSA, чувствительность ко всем антибиотикам была сохранена. На КТ брюшной полости – жировая дистрофия поджелудочной железы, диффузные изменения печени, умеренная гепатомегалия. КТ органов грудной клетки – признаки бронхиальной обструкции. Плевроппульмональные спайки S5, S10 справа, S10 слева. В биохимическом и общем анализе крови изменений не было. В копрограмме – нейтральный жир отсутствует.

Генетическое обследование методом секвенирования по Сэнгеру проведено в 9 лет, установлен генотип с.[1521\_1523delCTT]; [1083G>A] (p.[Phe508del]; [Trp361\*]). При микробиологическом исследовании было выявлено наличие хронической инфекции *Staphylococcus aureus*. Из осложнений заболевания был диагностирован полипозный риносинусит верхних дыхательных путей на основании КТ придаточных пазух носа.

Особенностью течения заболевания являются преимущественные проявления полипозного риносинусита и хронической панкреатической недостаточности, частые проявления хронического обструктивного бронхита, при этом регистрируется соответствие параметров физического развития и спирометрии возрасту.

## Обсуждение

Патогенный генетический вариант с.[1083G>A] (p.Trp361\*) относится к нонсенс-мутациям и представляет собой замену гуанина на аденин в положении 1083, что приводит к образованию преждевременного стоп-кодона в 8 экзоне (I класс). Учитывая, что данный генетический вариант находится в гетерозиготном состоянии с вариантом с.[1521\_1523delCTT] (p.Phe508del) II класса, можно ожидать тяжелое течение заболевания и нарушение работы канала *CFTR* за счёт нарушения синтеза белка *CFTR*.

В описываемом нами первом клиническом случае у ребенка наблюдается тяжелое течение МВ в виде хронической панкреатической недостаточности с рождения с развитием в 6 лет СДИО кишечника. В то же время показатели физического развития ребенка соответствуют возрастным. Показатели ИРТ и потового теста свидетельствуют о тяжелых нарушениях работы хлорного канала. Наряду с потовой пробой мы использовали метод ОРКП и форсколиновый тест на кишечных органоидах для изучения функциональной активности канала. Данные исследования подтверждают отсутствие функциональной активности канала *CFTR*. Результаты ОРКП соответствуют генетическому варианту с хронической панкреатической недостаточностью.

Усиление набухания органоидов при совместном действии форсколина и корректора VX-809 указывает на увеличение общего количества функциональных *CFTR*-каналов, однако наблюдаемый эффект можно считать умеренным. Обусловлен он наличием в генотипе варианта II класса с.[1521\_1523delCTT] (p.Phe508del), поскольку генотипы, сочетающие две мутации I класса, не поддаются коррекции таргетными препаратами [28]. Таким образом, можно утверждать, что вариант с.[1521\_1523delCTT] (p.Phe508del), в целом, несколько «смягчает» тяжесть генотипа с.[1521\_1523delCTT]; [1083G>A] (p.[Phe508del]; [Trp361\*]). Полученные на кишечных органоидах результаты коррелируют с литературными данными – в статьях J.F. Dekkers [28] и van Willigen с соавт. [33] похожие ответы на форсколин, VX-809 и VX-770 были характерны для органоидов, полученных из биоптатов пациентов, имеющих сочетание в генотипе варианта с.1521\_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) и варианта I класса.



При описании клинической картины заболевания у второго ребенка мы наблюдаем также панкреатическую недостаточность с рождения, но с меньшей потребностью в панкреатических ферментах, чем в первом случае. У больного регистрируются длительная гипербилирубинемия за счет холестаза в неонатальном периоде, раннее развитие синдрома потери соли и развитие осложнений в виде полипозного риносинусита, обострений хронического обструктивного гнойного бронхита.

### Заключение

Таким образом, нами впервые описана клиническая картина МВ у двух пациентов из неродственных семей, имеющих в своем генотипе патогенный вариант с.[1083G>A] (p.Trp361\*) в компаунде с вариантом с.[1521\_1523delCTT] (p.Phe508del). Результаты показали, что у обоих больных имеются признаки хронической панкреатической недостаточности (снижение панкреатической эластазы 1) с потребностью в панкреатических ферментах. Отмечено различие клинической картины заболевания: у одного ребенка развитие СДИО и высокая потребность в панкреатических ферментах, у второго — формирование полипозного риносинусита, развитие холестаза и синдрома потери соли в раннем возрасте, что может быть обусловлено как различием генетического фона, так и различием влияния внешней среды, в том числе и лечения (пациенты происходят из неродственных семей, наблюдаются и проходят лечение в разных центрах), но характеризуют тяжелое течение заболевания. Возможно, в тяжести течения первой пациентки отрицательную роль сыграла нерегулярность в терапии в первые годы жизни. Дополнительное применение метода ОРКП и форсколинового теста на кишечных органоидах подтвердило отсутствие функции хлорного канала у носителей варианта с.1083G>A (p.Trp361\*), относящегося к нонсенс-мутациям, и варианта II класса

### Список литературы:

- Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Муковисцидоз. М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2014, 672 с.
- Ивашенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. СПб.: Интермедика. 2002, 256 с.
- Loubieres Y., Grenet D., Simon-Bouy B. et al. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. CHEST 2002; 121(1): 73-80
- Mishra A., R. Greaves, J. Massie The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. Clin. Biochem. Rev 2005; 26:135-153
- Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» Координаторы: Е.И. Кондратьева, Н.Ю. Каширская, Н.И. Капранов, 2016 г
- Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. Clin Chest Med. 2007; 28(2): 279–88. doi: 10.1016/j.ccm.2007.02.011.
- Кондратьева Е.И., Петрова Н.В., Красовский С.А., Зинченко Р.А., Поляков А.В., Ивашенко Т.Э., Гинтер Е.К., Куцев С.И., Одинокоев О.Н., Назаренко Л.П., Каширская Н.Ю., Амелина Е.Л., Воронкова А.Ю., Адян Т.А., Павлов А.Е., Старинова М.А. Характеристика мутаций больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным регистра 2017 года и возможности таргетной терапии. Вопросы практической педиатрии 2018; 13 (6): 58–66. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-6-58-66
- <http://www.genet.sickkids.on.ca/MutationDetailPage.external?sp=2175>
- Петрова Н.В., Марахонов А.Ю., Васильева Т.А., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Жекайте Е.К., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д., Галкина В.А., Гинтер Е.К., Куцев С.И., Зинченко Р.А. Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена CFTR у российских больных муковисцидозом. Альманах клинической медицины 2019; 47 (1): 38–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-004
- Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2017 год. / Под редакцией Воронковой А.Ю., Амелиной Е.Л., Каширской Н.Ю., Кондратьевой Е.И., Красовского С.А., Стариновой М.А., Капранова Н.И. — М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2019, 68с
- <https://www.ecfs.eu/ecfspr>
- <http://seqdb.med-gen.ru/>
- <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
- <https://cftr2.org>
- <http://exac.broadinstitute.org/>
- <http://gnomad.broadinstitute.org>
- <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
- <http://browser.1000genomes.org/index.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar>
- <http://www.omim.org/>
- <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/in-dex.php>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clin-var/>
- <http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html>
- <https://decipher.san-ger.ac.uk>
- Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., Stolpe C., Zapf A. et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. Thorax 2010; 65: 594-599. doi:10.1136/thx.2009.125088
- Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A., Ernst S.E., Fan L., Hornick D.B. and al. Multicenter Intestinal Current Measurements in Rectal Biopsies from CF and Non-CF Subjects to Monitor CFTR Function. Plos One J. 2013; 8(9): e73905
- Dekkers J.F., Berkens G., Kruisselbrink E. et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. Sci Transl Med. 2016; 8(344): 344-384.
- Boj S.F., Vonk A.M., Stata M. et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: an in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. J Vis Exp. 2017; 120.
- Кондратьева Е.И., Мельяновская Ю.Л., Ефремова А.С., Булатенко Н.В., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В., Зодьбинова А.Э., Никонова В.С., Жекайте Е.К., Каширская Н.Ю., Мелконян Г.Г., Одинаева Н.Д., Куцев С.И. Опыт применения методов оценки функциональности анионного канала CFTR у пациентов с установленным и предполагаемым диагнозом муковис-

- цидоза. Сибирское медицинское обозрение. 2019;(2):60-69. DOI 10.20333/2500136-2019-2-60-69
31. van Barneveld A., Stanke F., Ballmann M., Naim H.Y., Tümmler B. Ex vivo biochemical analysis of CFTR in human rectal biopsies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762: 393–397. Doi 10.1016/j.bba-dis.2006.01.007
  32. Veeze H.J., Sinaasappel M., Bijman J., Bouquet J., de Jonge H.R. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 1991; 101: 398–403
  33. van Willigen M., Vonk A.M., Yeoh H.Y., Kruisselbrink E., Kleizen B., van der Ent C.K., Egmond M.R., de Jonge H.R., Braakman I., Beekman J.M., van der Sluijs P. Folding-function relationship of the most common cystic fibrosis-causing CFTR conductance mutants. *Life Sci Alliance* 2019;2(1).
- ## References
1. Kapranov N.I., Kashirskaya N.Yu. *Mucoviscidosis* [Cystic fibrosis.] «MEDPRAKTIKA-M», 2014, 672 p. (In Russ.)
  2. Ivaschenko T.E., Baranov V.S. *Biochimicheskie i molekulyarno-geneticheskie osnovy patogeneza mucoviscidoza* [Biochemical and molecular genetic principles of the pathogenesis of cystic fibrosis.] St. Petersburg: Intermedica. 2002, 256p. (In Russ.)
  3. LoubieresY., Grenet D., Simon-Bouy B. Et al. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. *CHEST* 2002; 121(1): 73–80
  4. Mishra A., R. Greaves, J. Massie The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin. Biochem. Rev* 2005; 26:135–153
  5. Nacionalnii consensus «Mucoviscidosis: opredelenie, diagnosticheskie kriterii, terapiya» [National Consensus «Cystic Fibrosis: Definition, Diagnostic Criteria, Therapy»] Coordinators: E.I. Kondratyev, N.Yu. Kashirskaya, N.I. Kapranov 2016 (In Russ.)
  6. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med.* 2007; 28(2): 279–88. doi: 10.1016/j.ccm.2007.02.011.
  7. Kondratyeva E.I., Petrova N.V., Krasovsky S.A., Zinchenko R.A., Polyakov A.V., Ivaschenko T.E., Ginter E.K., Kutsev S.I., Odinkova O.N., Nazarenko L.P., Kashirskaya N.Yu., Amelina E.L., Voronkova A.Yu., Adyan T.A., Pavlov A.E., Starinova M.A. Charakteristika mytatsii bolnih mukoviscidozom v Rossiiskoi Federacii po dannim registra 2017 goda i vozmozhnosti targetnoi terapii [Characterization of mutations of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation according to the register in 2017 and the possibility of targeted therapy]. *Voprosy prakticheskoy pediatrii* [Clinical Practice in Pediatrics] 2018; 13; 6: 58–66. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-6-58-66 (In Russ.)
  8. <http://www.genet.sickkids.on.ca/MutationDetailPage.external?sp=2175>
  9. Petrova N.V., Marakhonov A.Yu., Vasilieva T.A., Kashirskaya N.Yu., Kondratyeva E.I., Zhekaite E.K., Voronkova A.Yu., Sherman V.D., Galkina V.A., Ginter E.K., Kutsev S.I., Zinchenko R.A. Osobennosti spektra mytatsii, vyavlenih pri kompleksnom issledovanii gena CFTR y bolnih mukoviscidozom [Features of the spectrum of mutations identified in a comprehensive study of the CFTR gene in Russian patients with cystic fibrosis]. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny* [Almanac of clinical medicine]. 2019; 47 (1): 38–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-004 (In Russ.)
  10. Register of cystic fibrosis patients in the Russian Federation. 2017 year. / Edited by Voronkova A.Yu., Amelina E.L., Kashirskaya N.Yu., Kondratyeva E.I., Krasovsky S.A., Starinova M.A., Kapranova N.I. – M.: Publishing House MEDPRAKTIKA-M, 2019, 68 p. (In Russ.)
  11. <https://www.ecfs.eu/ecfspr>
  12. <http://seqdb.med-gen.ru/>
  13. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
  14. <https://cftr2.org>
  15. <http://exac.broadinstitute.org/>
  16. <http://gnomad.broadinstitute.org>
  17. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
  18. <http://browser.1000geno-mes.org/index.html>
  19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
  20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar>
  21. <http://www.omim.org/>
  22. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/in-dex.php>
  23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clin-var/>
  24. <http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html>
  25. <https://decipher.san-ger.ac.uk>
  26. Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., Stolpe C., Zapf A. et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax* 2010; 65: 594–599. doi:10.1136/thx.2009.125088
  27. Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A., Ernst S.E., Fan L., Hornick D.B. and al. Multicenter Intestinal Current Measurements in Rectal Biopsies from CF and Non-CF Subjects to Monitor CFTR Function. *Plos One J.* 2013; 8(9): e73905
  28. Dekkers J.F., Berkens G., Kruisselbrink E. et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med.* 2016; 8(344): 344–384.
  29. 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; 120.
  30. Kondratyeva E.I., Melyanovskaya Yu.L., Efremova A.S., Bulatenko N.V., Bukharova T.B., Goldstein D.V., Zodbina A.E., Nikonov V.S., Zhekaite E.K., Kashirskaya N.Yu., Melkonyan G.G., Odinaeva N.D., Kutsev C.I. Opyt primeneniya metodov otsenki funktsional'nosti anionnogo kanala CFTR u patsiyentov s ustanovlennym i predpolagayemym diagnozom mukoviscidoza [Experience of evaluating functionality of anionic CFTR channel methods application in patients with cystic fibrosis diagnosed and supposed]. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye* [Siberian Medical Review] 2019;(2):60-69. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-60-69 (In Russ.)
  31. van Barneveld A., Stanke F., Ballmann M., Naim H.Y., Tümmler B. Ex vivo biochemical analysis of CFTR in human rectal biopsies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762: 393–397. Doi 10.1016/j.bba-dis.2006.01.007
  32. Veeze H.J., Sinaasappel M., Bijman J., Bouquet J., de Jonge H.R. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 1991; 101: 398–403
  33. van Willigen M., Vonk A.M., Yeoh H.Y., Kruisselbrink E., Kleizen B., van der Ent C.K., Egmond M.R., de Jonge H.R., Braakman I., Beekman J.M., van der Sluijs P. Folding-function relationship of the most common cystic fibrosis-causing CFTR conductance mutants. *Life Sci Alliance* 2019;2(1).