

© 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.

УДК 616.2-072.7 + 616-084/085

DOI: 10.20333/2500136-2019-2-60-69

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ АНИОННОГО КАНАЛА CFTR У ПАЦИЕНТОВ С УСТАНОВЛЕННЫМ И ПРЕДПОЛАГАЕМЫМ ДИАГНОЗОМ МУКОВИСЦИДОЗА

Е. И. Кондратьева^{1,2}, Ю. Л. Мельяновская¹, А. С. Ефремова¹, Н. В. Булатенко¹, Т. Б. Бухарова¹, Д. В. Гольдштейн¹, А. Э. Зодьбинова¹, В. С. Никонова^{1,3}, Е. К. Жекайте^{1,2}, Н. Ю. Каширская¹, Г. Г. Мелконян³, Н. Д. Одинаева², С. И. Куцев¹

¹Медико-генетический научный центр, Москва 115522, Российская Федерация

²Московский областной консультативно-диагностический центр для детей, Мытищи 141009, Российская Федерация

³Городская клиническая больница № 4 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва 115093, Российская Федерация

Цель исследования. Применить метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП) и метод кишечных органоидов (КО) для определения патогенетической роли редких или вновь обнаруженных генетических вариантов гена CFTR.

Материал и методы. Проанализированы данные ДНК диагностики пациентов РФ на основе регистра 2017 г, включая секвенирование. Из 3096 больных муковисцидозом РФ генетическое исследование проведено 92,4% больным. Всего выявлено 196 генетических варианта и 94 из них неоднократно. 44 генетических варианта не встречаются в базах CFTR 1 и 2 и требуют описания фенотипа и подтверждения клинической значимости с помощью тестов, характеризующих работу CFTR канала, как метод ОРКП, а так же метод кишечных органоидов.

Результаты. Получено несколько культур кишечных органоидов от здоровых людей, от пациента с подозрением на муковисцидоз и больного с генотипом F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]). Параллельно использовали метод ОРКП. Оба метода показали одинаправленные результаты. Метод ОРКП показал разнонаправленные результаты теста для пациента с муковисцидозом (генотип F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]) и ребенка с подозрением на муковисцидоз. Результаты теста последнего совпадали с данными, полученными при использовании биоптата кишечника здоровых добровольцев. Морфология полученных культур КО отражает функцию CFTR. Для доказательства работы и надежности форсколинового теста использовали культуру F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]). Было показано, что совместное применение корректора VX-809 и потенциатора VX-770 белка CFTR восстанавливает его синтез и проводимость в эпителиальных клетках кишечных органоидов.

Заключение. Таким образом, первый опыт применения методов оценки функциональности анионного канала CFTR у пациентов с установленным и предполагаемым диагнозом муковисцидоза, показал их перспективность, как для диагностических целей, так и для персонализированного подбора модуляторов CFTR. Результаты, полученные при помощи ОРКП и КО, совпадают.

Ключевые слова: муковисцидоз, белок и канал CFTR, определение разности кишечных потенциалов (ОРКП), кишечные органоиды (КО), стимуляторы, форсколиновый тест, генотип F508del/ F508del, корректор VX-809, потенциатор VX-770, кальцеин.

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

Для цитирования: Кондратьева ЕИ, Мельяновская ЮЛ, Ефремова АС, Булатенко НВ, Бухарова ТБ, Гольдштейн ДВ, Зодьбинова АЭ, Никонова ВС, Жекайте ЕК, Каширская НЮ, Мелконян ГГ, Одинаева НД, Куцев СИ. Опыт применения методов оценки функциональности анионного канала CFTR у пациентов с установленным и предполагаемым диагнозом муковисцидоза. *Сибирское медицинское обозрение.* 2019;(2):60-69. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-60-69

EXPERIENCE OF EVALUATING FUNCTIONALITY OF ANIONIC CFTR CHANNEL METHODS APPLICATION IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS DIAGNOSED AND SUPPOSED

E. I. Kondratyeva^{1,2}, Yu. L. Melyanovskaya¹, A. S. Efremova¹, N. V. Bulatenko¹, T. B. Bukharova¹, D. V. Goldstein¹, A. E. Zodbina¹, V. S. Nikonov^{1,3}, E. K. Zhekaite^{1,2}, N. Yu. Kashirskaya¹, G. G. Melkonyan³, N. D. Odinaeva², C. I. Kutsev¹

¹Research Center for Medical Genetics, Moscow 115522, Russian Federation

²Moscow Regional Consultative and Diagnostic Center for Children, Mytishchi 141009, Russian Federation

³City Clinical Hospital № 4 of the Moscow Health Department, Moscow 115093, Russian Federation

The aim of the research is to apply method for determining intestinal potential differences (DIPD) and method of intestinal organelles (IO) to state pathogenetic role of rare or newly discovered genetic variants of CFTR gene.

Material and methods. DNA diagnostics data of patients from the Russian Federation were analysed on the basis of register for 2017, including sequencing. From 3096 patients from the Russian Federation with cystic fibrosis, genetic study has been performed on 92.4% of patients. In total 196 genetic variants were identified, while 94 of them were repeated. 44 genetic variants are not found in CFTR 1 and 2 bases and require phenotype description and confirmation of clinical significance with the help of tests, characterizing the work of CFTR channel, such as DIPD method, and intestinal organelles method as well.

Results. Several cultures of intestinal organelles were obtained from healthy people, from a patient with supposed cystic fibrosis and a patient with genotype F508del/F508del (c. [1521_1523delCTT]; [1521_1523delCTT]). At the same time DIPD method was used. Both methods were proved to show unidirectional results. DIPD method showed multidirectional test results in a patient with cystic fibrosis (genotype F508del/F508del (c. [1521-1515delCTT]; [1521-11523delCTT])) and in a child with supposed cystic fibrosis. Test results of the latter coincided with the data obtained using healthy bowel biopsy samples. MV cultures reflect CFTR function. To prove the work and reliability of forskolin test, F508del / F508del culture (c. [1521_1523delCTT]; [1521_1523delCTT]) was used. It was shown that combined use of VX-809 corrector and VX-770 CFTR protein potentiator restores its synthesis and conductivity in epithelial cells of intestinal organelles.

Conclusion. Thus, the first experience of using methods for assessing functionality of CFTR anion channel in patients with cystic fibrosis diagnosed and supposed showed their availability, both for diagnostic purposes and for personalized selection of CFTR modulators. The results were obtained with the help of DIPD and IO are the same.

Key words: cystic fibrosis, protein and CFTR channel, determination of intestinal potential difference (DIPD), intestinal organelles (IO), stimulants, forskolin test, genotype F508del / F508del, corrector VX-809, potentiator VX-770, calcein.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Kondratyeva EI, Melyanovskaya YuL, Efremova AS, Bulatenko NV, Bukharova TB, Goldstein DV, Zodbina AE, Nikonov VS, Zhekaite EK, Kashirskaya NYu, Melkonyan GG, Odinaeva ND, Kutsev CI. Experience of evaluating functionality of anionic CFTR channel methods application in patients with cystic fibrosis diagnosed and supposed. *Siberian Medical Review*.2019;(2):60-69. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-60-69

Введение

Муковисцидоз (МВ, кистозный фиброз) является наследственным мультисистемным заболеванием, обусловленным дисфункцией гена *CFTR*, кодирующего белок муковисцидозного регулятора трансмембранной проводимости. Активность белка *CFTR*, встроенного в апикальную мембрану эпителиальных клеток, отвечает за секрецию электролитов и жидкостей в организме [1].

Начиная с 50-ых годов «золотым стандартом» в диагностике МВ является потовая проба. Аномально высокие концентрации хлорида и натрия (натрий – выше 70 ммоль/л, а хлорид – выше 60 ммоль/л) в сочетании с клиническими признаками (снижение дыхательной функции, легочные аномалии, включая хронические инфекции, аберрантное нейтрофильное воспаление и застои слизи, обструктивное воспаление легких, прогрессирующие бронхоэктазы, дисфункция поджелудочной железы, нутритивный дефицит, кишечные расстройства, хронические панкреатиты) могут свидетельствовать о недостаточности функции белка *CFTR* [2].

Значительные достижения в развитии методов и технологий молекулярно-генетического тестирования позволяют в большинстве случаев успешно осуществлять молекулярно-генетическую диагностику МВ. Наибольшую трудность представляет оценка вклада в развитие заболевания редких и ранее не идентифицированных нуклеотидных последовательностей, а также определение связи генотип-фенотип и влияния генов-модификаторов на тяжесть заболевания. В настоящее время описано более 2000 вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR* (ранее называемые мутациями). По состоянию на 31 августа 2018 года на веб-сайте международного проекта CFTR2 [3], представлено 336 клинически значимых (патогенных) вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR*. Они приводят к нарушению синтеза белка *CFTR*, транспорта его к апикальной мембране клетки или нарушают его функцию в качестве канала анионов хлора.

В соответствии с предполагаемыми клиническими последствиями все мутации в гене *CFTR* разделяют на четыре группы [3]: А. варианты нуклеотидной последовательности, приводящие к МВ; Б. варианты нуклеотидной последовательности, приводящие к заболеваниям, ассоциированным с геном *CFTR*; В. варианты нуклеотидной последовательности, не имеющие клинического проявления; Г. варианты нуклеотидной последовательности с не доказанным или неясным клиническим проявлением (многие миссенс-мутации). Растет количество вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR* с неизвестным клиническим значением.

Так 44 мутации в регистре больных муковисцидозом РФ 2017 года не описаны в базах CFTR1 и CFTR2 [3], требуют дальнейшего описания и исследования, в том числе, с помощью метода ОРКП, КО и форсколинового теста [3].

В дополнение к потовой пробе в последние 30 лет разрабатывались новые функциональные тесты: определения разности назальных потенциалов (Nasal Potential Difference, ОРПН) [4], [5] и разности кишечных потенциалов (Intestinal Current Measurement, ОРКП) [6]. Данные методы являются биоанализаторами функции *CFTR*. Оба теста были стандартизированы и доказали свою эффективность в подтверждении или исключении дисфункции *CFTR* [4, 7, 8]. Согласно последним рекомендациям по диагностике МВ, измерение разности назальных и кишечных потенциалов занимает ведущее место в диагностике МВ при пограничных значениях потовых проб и при наличии редких мутаций с неясной клинической значимостью [9]. При этом, методу кишечных потенциалов отдается предпочтение в связи с тем, что его можно использовать с рождения и он является более точным. Метод обладает необходимой чувствительностью (94,8–100%), специфичностью (96,5–100%) и позволяет проводить дифференциальный диагноз между «тяжелыми» (I, II, III классы) мутациями и «мягкими», относящимися к IV и V классам [6, 10, 11, 12].

Метод ОРКП стандартизирован в Европе и используется для диагностики МВ при редких мутациях, пограничных значениях потового теста, при оценке эффективности таргетной терапии. В основе лежит использование режима короткого замыкания в рециркуляционной камере (micro-Ussing chamber) с последующим воздействием веществ – стимуляторов CFTR канала и других каналов на мембране эпителиальных клеток. Ответы на карбахол, цАМФ/форсколин и гистамин, полученные как изменение тока короткого замыкания (Δ ISC), служат дифференцирующим признаком для МВ. В связи с этим использование метода при диагностике заболевания является перспективным.

Проблема индивидуального подхода при терапии МВ обусловлена разнообразием мутаций *CFTR*, высокой частотой редких или единичных мутаций и, следовательно, разной степенью тяжести заболевания [13]. Развитие современных технологий культивирования стволовых клеток и знание о внутриклеточных сигнальных каскадах, позволяют создать условия и получать *in vitro* пересеваемые (постоянные) культуры кишечных органоидов (КО) из ректальных биоптатов у пациентов с МВ или подозрением на болезнь [14]. КО представляют собой замкнутые структуры с внутренней полостью (люменом), сходные по составу клеток и строению со слизистой кишечника. Создание метода КО сделало возможным подбор персонализированной терапии МВ и оценку работы канала CFTR [15,16]. По внешнему виду КО можно отличить «тяжелые» мутации от «мягких», т.к. отсутствие функционального белка CFTR приводит к значительной редукции люмена [17]. Форсколиновый тест на КО был разработан специально для индивидуальной оценки эффективности препаратов нового поколения (таргетных препаратов/ модуляторов CFTR) у больных МВ [16].

В статье представлены результаты исследования двух пациентов: 1) – с доказанным диагнозом и частым генотипом при МВ – F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]) и 2) – сложный клинический случай в плане установления диагноза. Исследования показали эффективность метода ОРКП в качестве диагностического при наличии заболевания и при его отсутствии. Метод КО является первым шагом в РФ на пути создания криобанка культур КО с распространенными, редкими и уникальными мутациями гена *CFTR*. Разработка метода КО и форсколинового теста позволит идентифицировать пациентов с положительным ответом на лекарственную терапию, а в будущем – проводить персонализированные доклинические испытания новых таргетных препаратов [18].

Материал и методы

В исследование были включены два пациента после подписания информированного добровольного согласия. Исследование и форма информированного добровольного согласия были одобрены

Комитетом по Этике ФГБНУ «МГНЦ» Минобрнауки России 15 октября 2018 года (председатель Этического комитета – проф. Л.Ф. Курило).

Первый пациент, 11 лет, наблюдался с диагнозом: Хронический гнойный обструктивный бронхит. (J.42), Распространенные бронхоэктазы обоих легких на фоне синдрома Симпсона-Голаби-Бемель. Существовала необходимость подтверждения или исключения у этого пациента диагноза МВ.

Второй пациент, 16 лет, был с установленным диагнозом – Муковисцидоз, смешанная форма (E84.8) и наиболее часто встречающимся генотипом: гомозигота F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]). Данный патогенный вариант нуклеотидной последовательности является «тяжелым» и относится ко II классу мутаций.

Исследование по методу ОРКП проводилось согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 (СОПам) [19] по следующему алгоритму:

– На первом этапе проводится калибровка каждой рециркуляционной камеры в отдельности на приборе VCC MC 8B421 Physiologic Instrument, San Diego, USA. 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 биоптатов проводился в отделении хирургии ГБУЗ ГДКБ №13 им. Н.Ф. Филатова ДЗМ с использованием оборудования Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-23OU), согласно инструкции. Размер биоптата около 3-5 мм. Биопсийный материал помещают в специальный слайдер, который далее вставляют в камеру. Камеры заполняли раствором буфера Meyler. Буфер готовится перед исследованием, в него входят: 105 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂·6H₂O, 20.2 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄·H₂O, 0.3 mM Na₂HPO₄, 1.0 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM HEPES и 10 mM D-glucose, а также 0.01 mM индометацина. Регистрация исследования начиналась с записи базального тока короткого замыкания (стадия пре-амилорид).

– На третьем этапе добавляли стимуляторы в следующей последовательности: амилорид, форсколин/ IBMX, генистеин, карбахол, DIDS и в конце – гистамин. Исследование заканчивали после записи базального тока короткого замыкания.

Стимуляторы (фирмы Sigma-Aldrich (Merck), Германия): амилорид – ингибирует ENaC (натриевые каналы), форсколин/IBMX (3-изобутил-1-метилксантин) – активирует цАМФ зависимые Cl⁻ каналы (CFTR), генистеин – активирует открытие CFTR канала, карбахол – инициирует открытие Ca²⁺ (кальциевого канала),

4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновой кислоты (DIDS) – ингибитор анионного транспорта через биологические мембраны, гистамин – реактивирует Ca^{2+} -зависимый секреторный путь.

Для отработки метода и настройки оборудования по ОРКП, проверки качества полнокомпонентной среды для выращивания КО, отработки протоколов выделения крипт и пассирования КО использовались ректальные (кишечные) биоптаты, полученные от взрослых здоровых добровольцев (с функциональным каналом CFTR), не имеющие каких-либо заболеваний со стороны желудочно-кишечного тракта, подписавших информированное согласие в ГБУЗ ГКБ № 4 ДЗМ.

При получении культур КО и выполнении форсколинового теста за основу были взяты протоколы и статьи, разработанные и написанные под руководством Д. Бекмана (J.M. Beekman, Molecular cystic fibrosis laboratory of the University Medical Center Utrecht, Нидерланды) и с его разрешения [20]. Все этапы культивирования проводили при 37°C и 5 % CO_2 .

Линия L-фибробластов мыши, трансфицированная Wnt-3A-экспрессирующим вектором, и линия клеток НЕК293, трансфицированная Noggin-экспрессирующим вектором, были любезно предоставлены Д. Бекманом для получения кондиционированных сред с факторами роста [20]. Обе линии клеток наращивали в среде DMEM+GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (PAA Laboratories, Австрия), пенициллин/ стрептомицин (25 000 ед и 25 мг на 500 мл среды, соответственно; ПанЭко, Россия). Для стимуляции роста трансфицированных НЕК293 и L-клеток в среду дополнительно вносили селективные антибиотики зеоцин (концентрация 125 мкг/мл; Thermo Fisher Scientific, США) или G418 (концентрация 500 мкг/мл; Thermo Fisher Scientific, США), соответственно. Для получения кондиционированных сред проводили 8-9 дневное культивирование в среде без селективных антибиотиков. Кондиционированную среду центрифугировали 5 мин при 650 g для осаждения клеточного дебриса. Среда для культивирования КО содержит Wnt-3A- и Noggin- кондиционированные среды (50 % и 10 %, соответственно), Advanced DMEM/ F12 (40 %; Thermo Fisher Scientific, США), mEGF (50 нг/мл; Prospec), hR-Spondin-3 (300 нг/мл; Reprotech), B27 (2 %; Life Technologies: Gibco, США), N-ацетилцистеин (1.25 мМ; Sigma-Aldrich, США), никотинамид (10 мМ; Sigma-Aldrich, США), A83-01 (5 мкМ; Tocris, Великобритания), SB 202190 (10 мкМ; Sigma-Aldrich, США), примоцин (100 мкг/мл; InvivoGen, США).

Для выделения достаточного количества КО необходимо 2-4 ректальных биоптата. Транспортировку биоптатов осуществляли при +4°C в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS; ПанЭко, Россия). Изоляции крипт из биоптатов предшествует серия промывок средой Advanced DMEM/ F12 и раствором PBS.

Затем биоптаты нарезали на мелкие фрагменты и инкубировали с раствором 10 мМ ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, США) в PBS в течение 1.5–2 ч на качалке при температуре +4°C. По завершению инкубации заменяли раствор на свежий PBS и проводили ресуспендирование с целью высвобождения отдельных крипт из массива ткани. Затем осаждали полученную суспензию крипт в центрифуге с режимом охлаждения в течение 5 мин при 130 g и +4°C. Обязательным условием получения органоидов характерной трехмерной структуры является выращивание их в толще 3D-матрикса, чаще всего используют «Матригель» (Corning, США). Все работы с «Матригелем» проводят на льду для предотвращения его преждевременной полимеризации. Осадок крипт смешивали с «Матригелем», затем высевали в культуральные планшеты. На 30 мин помещали планшеты в CO_2 -инкубатор (37°C) для полимеризации «Матригеля» с заключенными в нем криптами. Затем в каждую лунку добавляли ростовую среду. Органоиды необходимо пересевать примерно раз в неделю. Для этого удаляли ростовую среду из всех лунок, механически разрушали капли «Матригеля», а затем интенсивным ресуспендированием механически дробили КО на фрагменты меньшего размера. После разбивки полученную суспензию осаждали в течение 5 мин при 130 g и +4°C. Осадок КО смешивали с «Матригелем» и высевали на планшеты. Замену среды криптам и КО проводили один раз в 2-3 дня.

Форсколиновый тест для тестирования модуляторов CFTR проводили на культуре F508del/F508del (с. [1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]) 4-го пассажа. За день до форсколинового теста КО высевали в каплях «Матригеля» в 96-луночные планшеты, на этом этапе в соответствующие лунки добавляли корректор VX-809 (5 мкМ; Selleckchem, США). Обработке форсколином (5 мкМ; Sigma-Aldrich, США) предшествовала стадия 1-часового окрашивания кальцеином (0,85 мкМ; Biotium). Потенциатор VX-770 (5 мкМ; Selleckchem, США) добавляли одновременно с форсколином. КО с целевыми препаратами в присутствии форсколина инкубировали в течение 1,5 ч и параллельно на определенных временных точках (0, 20, 40, 60 и 90 мин) осуществляли съемку «фиксированных» полей с использованием флуоресцентного микроскопа Observer. D1 (Zeiss, Германия) для регистрации ответа КО на стимуляцию. Количественный анализ набухания органоидов проводили при помощи программы Image J и Microsoft Excel 2007, статистическую обработку полученных данных - с помощью программы Sigma Plot 12.5.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы были получены стабильные культуры КО от здоровых людей (рис. 1). Органоиды характеризуются наличием тонких стенок и очень большим размером люмена, что согласуется с литературными данными [17] и свидетельствует

о наличии рабочего белка CFTR. Первичные результаты по получению культур КО от здоровых людей также показали, что подобранные условия культивирования КО являются оптимальными.

После отработки всех методов с использованием биоптатов, полученных от взрослых добровольцев, исследования были проведены на биоптатах толстого кишечника двух пациентов. Один пациент имел доказанный диагноз муковисцидоза, а другой нуждался в его исключении или подтверждении.

Клинический пример 1.

Первый пациент, ребенок 11 лет, наблюдается с диагнозом: Хронический гнойный обструктивный бронхит (J42). Распространенные бронхоэктазы обоих легких. (J42). ДН 2 ст. Сопутствующий диагноз: синдром Симпсона-Голаби-Бемель.

Ребенок от нормально протекавшей беременности. Роды, осложненные с применением акушерских щипцов. Оценка по Апгар 1 балл. Сразу переведен на ИВЛ. На 1-м году жизни перенес 2 правосторонние пневмонии. После года постоянный кашель. В 2011 г. на КТ легких – ателектаз средней доли правого легкого, участок консолидации S5 левого легкого, множественные перибронхиальные уплотнения базальных отделов легких. С января 2013 г состояние ухудшилось после перенесенной ОРВИ в виде постоянного кашля, рвоты. Получил 3 курса внутривенной антибактериальной терапии (цефтазидим, амикацин). В июне 2013 г диагностирован ГЭР, получал терапию без положительного эффекта. В декабре 2013 г госпитализирован с обструктивным гнойным бронхитом. В 2015 г госпитализирован с диагнозом: Двухсторонняя пневмония. Деструктивная пневмония справа.

В 2016 г по данным ДНК-диагностики установлен синдром Симпсона-Голаби-Бемель. Синдром Симпсона-Голаби-Бемеля – X-сцепленное рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся значительным клиническим полиморфизмом. Основными признаками синдрома являются гигантизм (и укрупнение многих внутренних органов), дисплазия почек, пороки сердца, черепно-лицевые аномалии, полидактилия и др. (изредка – умственная отсталость), а также высокий риск развития опухолей эмбриональных тканей. Заболевание часто ошибочно диагностируется как синдром Беквита-Видеманна, его локус SGBS находится на участке q26 X-хромосомы [21].

Посев на нетуберкулезные микобактерии и аспергиллез – отрицательный. Антибактериальная терапия ежемесячно в связи с лихорадкой до 38,5 (получал цефотаксим). В посевах мокроты патологически значимая флора не определялась. В период обострения сатурация кислорода снижалась до 88 %.



Рисунок 1. Стабильная культура кишечных органоидов с нативным каналом CFTR (от здоровых людей). Масштабная шкала – 200 мкм.

Figure 1. Stable culture of intestinal organoids with native CFTR channel (taken from healthy people). Scale – 200 microns.

Панкреатическая эластаза 1 была более 500 мкг/г и свидетельствовала о сохраненной функции поджелудочной железы. Нутритивный статус хороший (рост 156 см, вес 56 кг, ИМТ 23,0 кг/м²), физическое развитие выше среднего. На КТ придаточных пазух носа изменений не выявлено.

Клиническими признаками МВ и основанием для проведения исследований функции CFTR являлись заболевания легких – перенесенные пневмонии; распространенные бронхоэктазы обоих легких. При этом при проведении секвенирования патогенные варианты нуклеотидной последовательности в гене CFTR не обнаружены, а результаты двух потовых проб были отрицательные (34 и 34 ммоль/л, консультирован в немецкой клинике, где и проводились потовые пробы). В связи с этим пациенту был поставлен диагноз – хронический гнойный обструктивный бронхит (J42). Бронхоэктазы (J47).

Для исключения диагноза МВ было проведено измерение разности кишечных потенциалов и получены КО. При проведении исследования функции хлорного канала с помощью метода ОРКП (рис. 2) было установлено, что при блокировании натриевого канала (амилорид) происходит небольшое изменение тока короткого замыкания (Δ ISC); при добавлении форсколина/IBMX отмечалось выраженное увеличение тока короткого замыкания (Δ ISC) в положительную сторону; при стимуляции Ca²⁺-каналов (карбахол, гистамин) также происходит изменение тока короткого замыкания (Δ ISC) в положительную сторону.

Полученные данные свидетельствуют о нормальной работе канала CFTR и совпадают, как с результатами, полученными на здоровых добровольцах, так и с данными СОП [5]

КО данного пациента имели морфологические особенности, характерные для органоидов с рабочим каналом CFTR (тонкие стенки и большой объем люмена), что указывает на отсутствие мутаций гена CFTR или наличия «мягких» мутаций IV-VI классов (сравнение рис. 1 и рис. 3). Следует заметить, что неравномерное разрастание за счет деления стволовых клеток приводит к формированию «почек» на поверхности КО, это особенно заметно на культурах с нативным CFTR после 5-7 дней культивирования (рис. 1 и 3).

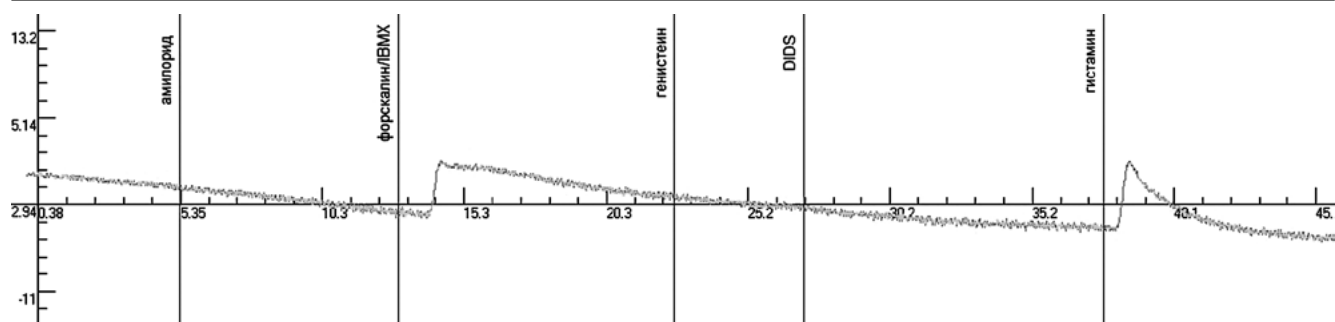


Рисунок 2. Метод ОРКП. Клинический случай 1 (диагноз муковисцидоза не подтвержден). При блокировании натриевого канала (амилорид) происходит небольшое изменение тока короткого замыкания (ΔISC); при добавлении форсколина/ИВМХ отмечалось выраженное увеличение тока короткого замыкания (ΔISC) в положительную сторону; при стимуляции Ca^{2+} -каналов (карбахол, гистамин) также происходит изменение тока короткого замыкания (ΔISC) в положительную сторону.

Figure 2. DIPD method. Clinical case 1 (diagnosis of cystic fibrosis is not confirmed). When blocking sodium channel (amiloride) there is a small change in short-circuit current (ΔISC); when adding Forskolin / IBMX, an increase of short-circuit current (ΔISC) in positive direction was observed; when Ca^{2+} channels are stimulated (carbachol, histamine), a short-circuit current (ΔISC) also changes in a positive direction.



Рисунок 3. Стабильная культура кишечных органоидов. Клинический случай 1 (диагноз муковисцидоза не подтвержден). Масштабная шкала – 200 мкм.

Figure 3. Stable culture of intestinal organelles. Clinical case 1 (diagnosis of cystic fibrosis is not confirmed). Scale – 200 microns.

Таким образом, метод ОРКП является более точным для диагностики муковисцидоза или его исключения. Заключение, сделанное при использовании метода КО, не исключает наличия «мягких мутаций», однако при секвенировании гена *CFTR* у данного больного мутаций не было обнаружено. Кроме того, потовые пробы свидетельствуют также о сохранной функции белка и канала *CFTR*. В результате проведенных исследований диагноз муковисцидоз был исключен.

Клинический пример 2.

Вторым пациентом был ребенок 16 лет, с установленным диагнозом: Муковисцидоз, смешанная форма (E84.8), среднетяжелое течение. Хронический гнойный обструктивный бронхит. ДН 0 ст. Хроническая панкреатическая недостаточность тяжелой степени. Микробиологический диагноз: Хроническая стафилококковая инфекция. Генотип: гомозигота F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]). Осложнения: Белково-энергетическая недостаточность средней степени тяжести.

Диагноз МВ был установлен в 2,5 года по данным клинической картины, потового теста, ДНК-диагностики. С рождения до 3 месяцев ребенок

прибавлял в весе удовлетворительно, с 4-х месяцев – частые обструктивные бронхиты, отмечались недостаточные прибавки массы тела. Панкреатическая эластаза – менее 15 мкг/г, что свидетельствует о тяжелой степени панкреатической недостаточности. Проводимость пота составила 105 ммоль/л на аппарате «Нанодакт» и свидетельствовало о нарушении работы хлорного канала. Первичный высев *Pseudomonas*

aeruginosa был в возрасте 5-6 лет (эрадикационная терапия успешная), далее в 13 лет повторный высев с последующей эрадикацией. На фоне приема базисной терапии, активных занятий спортом, состояние ребенка стабильное, с редкими бронхо-легочными обострениями на фоне ОРВИ (2-3 раза в год). На момент проведения исследования: нутритивный статус соответствует возрастным нормам (рост – 166 см, вес 54 кг, ИМТ 19,6), сатурация O_2 98-99 %, данные спирометрии: ФЖЕЛ – 4,2 л (113 %), ОФВ₁ – 3,31 л (104 %).

Вариант нуклеотидной последовательности F508del (с.1521_1523delCTT) в гене *CFTR* - наиболее частый патологический вариант для европейских и российских популяций, относится к патогенным вариантам нуклеотидной последовательности II класса. Клиническая картина у пациентов, гомозиготных по F508del (с.1521_1523delCTT), характеризуется типичными тяжелыми проявлениями муковисцидоза с панкреатической недостаточностью и выраженным поражением легких (www.cftr2.org). Для нашего пациента были характерны типичные клинические проявления заболевания для данного генотипа.

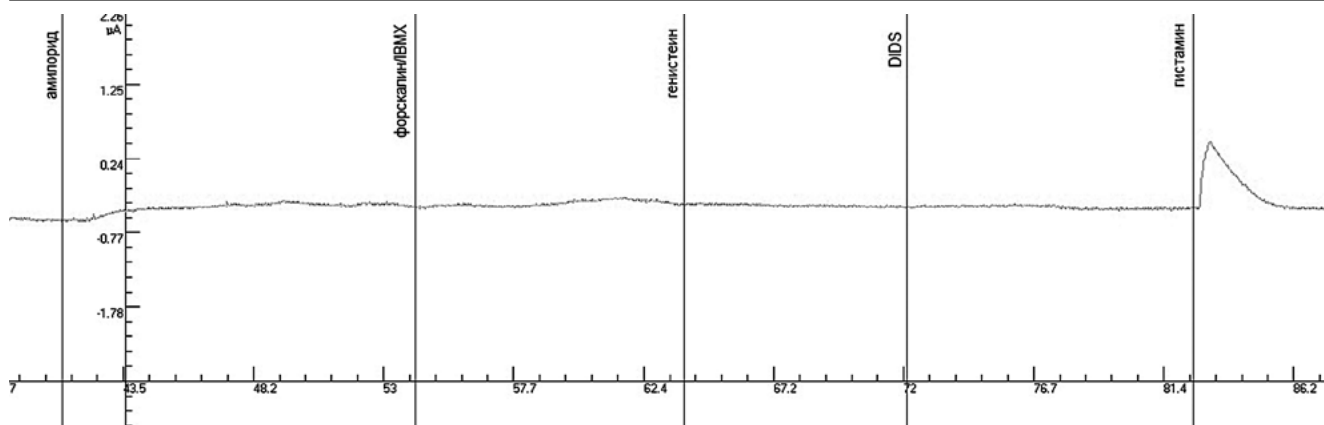


Рисунок 4. Метод ОРКП. Клинический случай 2 (пациент с муковисцидозом, генотип F508del/F508del). При введении амилорида происходило увеличение трансэпителиального потенциала/ тока короткого замыкания (Δ ISC), ответ на форсколин/ИВМХ - незначительное снижение трансэпителиального потенциала/ тока короткого замыкания (Δ ISC), а на добавление гистамина отмечено резкое, скачкообразное увеличение тока короткого замыкания в положительную сторону.

Figure 4. DIPD method. Clinical case 2 (patient with cystic fibrosis, genotype F508del / F508del). While injecting amiloride, there was an increase of transepithelial potential / short-circuit current (Δ ISC), slight decrease in transepithelial potential / short-circuit current (Δ ISC) occurred as a response to forskolin / IBMX, and a sharp, uneven increase of short-circuit current in a positive direction was observed in case of injecting histamine.

Вначале на биотатах было проведено определение разницы кишечных потенциалов, а затем были получены кишечные органоиды и осуществлен форсколиновый тест. При проведении метода ОРКП (рис. 4) были получены следующие ответы на добавление стимуляторов: при введении амилорида происходило увеличение трансэпителиального потенциала, на форсколин/ИВМХ – снижение трансэпителиального потенциала, а на добавление гистамина отмечено резкое, скачкообразное увеличение трансэпителиального потенциала в положительную сторону. Ответ на цАМФ/форсколин является главным дифференцирующим признаком для МВ. Увеличение тока короткого замыкания (Δ ISC) на гистамин в положительную сторону может быть обусловлено остаточной активностью белка CFTR. В целом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии функционирующих хлорных каналов, что характерно для патогенного варианта нуклеотидной последовательности в гене CFTR.

Полученная культура КО (рис. 5) от данного больного с гомозиготным вариантом нуклеотидной последовательности F508del (с.1521_1523delCTT) характеризуется радикальными внешними отличиями по сравнению с ранее полученными культурами от первого пациента (рис. 1 и 3). Органоиды F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT]; [1521_1523delCTT]) практически полностью были лишены люмена, что указывает на отсутствие проводимости канала

CFTR. Наши результаты полностью соотносятся с литературными данными [15, 20].

Таким образом, метод КО можно рассматривать как полудиагностический, поскольку морфологические признаки органоидов зависят от проводимости канала CFTR. При наличии функционального канала CFTR КО характеризуются большим размером люмена, как у здоровых людей или в первом клиническом случае, а при «тяжелых» патогенных вариантах нуклеотидной последовательности гена CFTR I-III классов, приводящих к полной утрате функционального белка, люмен у органоидов либо отсутствует, либо небольшого размера по отношению к общему размеру [17], что наблюдалось при исследовании КО второго пациента.

Следует отметить, что в настоящее время для пациентов с генотипом F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]) разработана таргетная



Рисунок 5. Стабильная культура кишечных органоидов. Клинический случай 2 (пациент с муковисцидозом, генотип F508del/F508del). Масштабная шкала – 200 мкм.

Figure 5. Stable culture of intestinal organelles. Clinical case 2 (patient with cystic fibrosis, genotype F508del / F508del). Scale – 200 microns.

терапия в виде двух препаратов. Первым модулятором для таких пациентов стал препарат Оркамби (*Orkambi*). В состав препарата (таблетки) входят: люмакафтор (VX-809) – 200 мг и ивакафтор (VX-770) – 125 мг [22, 23]. Препарат Оркамби был разработан американской биотехнологической компанией Вертекс (Vertex Pharmaceuticals), одобрен FDA в июне 2015 г и применяется для лечения пациентов старше 6 лет. Вторым модулятором является Симдеко (*Symdeko*, таблетки по 100 мг тезакафтора и 150 мг ивакафтора) в сочетании с Ивакафтором (150 мг) для пациентов старше 12 лет [24]. Недавно было обнаружено, что корректор VX-809 (люмакафтор) имеет сильные побочные эффекты [23].

После принятия схемы лечения больных МВ с генотипом F508del/F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]) препаратом, включающим потенциатор VX-770 и корректор VX-809 (Оркамби) в работах J. Dekkers на КО F508del/ F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]) [15, 25] было показано, что каждый из модуляторов в отдельности незначительно увеличивает образование и функцию CFTR, а при совместном применении VX-809 и VX-770 происходит практически полное восстановление проводимости канала. Для доказательства работы и надежности форсколинового теста при оценке эффективности модуляторов канала CFTR, мы также использовали

культуру, полученную от больного с генотипом F508del/ F508del (с.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT]). В наших исследованиях, как и в ранее цитируемых работах [15, 25], наблюдалось частичное восстановление функции CFTR при стимуляции отдельно потенциатором и корректором и аддитивность ответа при их совместном воздействии (рис. 6 А и Б).

В будущем мы планируем использование этой культуры в качестве положительного контроля при исследовании влияния таргетных препаратов на КО с редкими, уникальными и новыми вариантами нуклеотидной последовательности гена *CFTR* и генотипами, а также при тестировании новых разрабатываемых модуляторов белка CFTR.

Заключение

Таким образом, первый опыт применения методов оценки функциональности анионного канала CFTR у пациентов с установленным и предполагаемым диагнозом муковисцидоза, показал их перспективность, как для диагностических целей, так и для персонализированного подбора модуляторов CFTR. Результаты, полученные при помощи ОРКП и КО, совпадают.

Работа выполнена в рамках Государственного задания для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» в части исследований на кишечных органоидах.

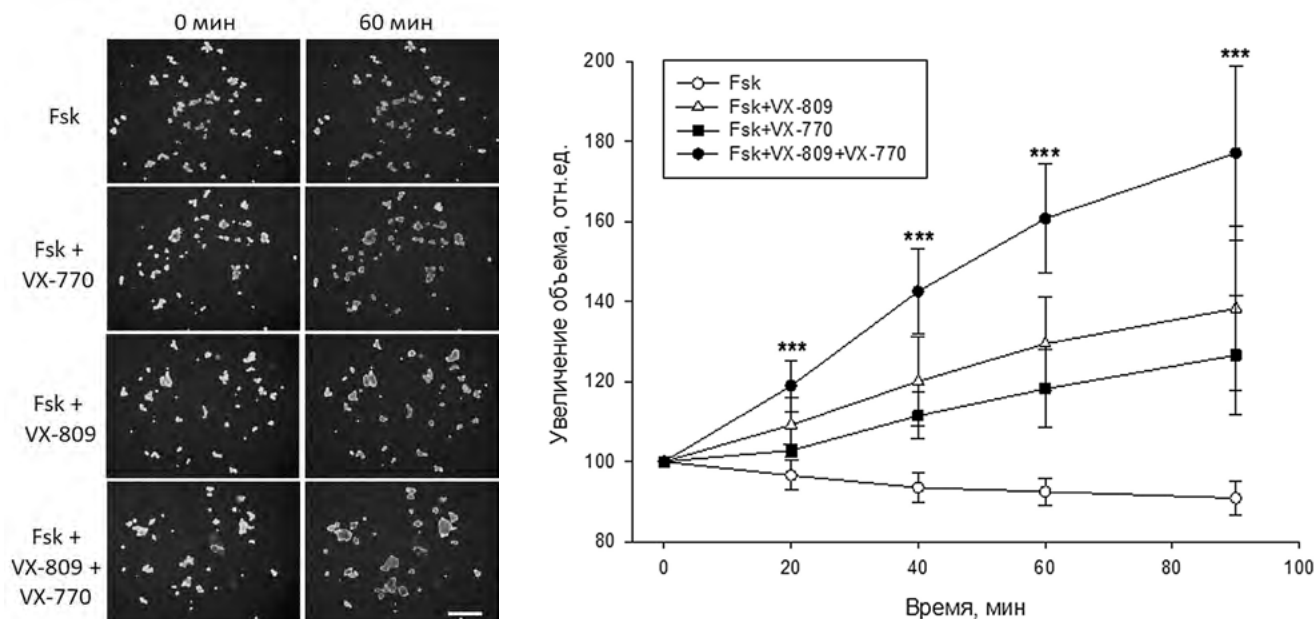


Рисунок 6. Корректор VX-809 и потенциатор VX-770 восстанавливают работу белка CFTR при гомозиготной мутации F508del. А – показательные фото кишечных органоидов, окрашенных кальцеином; все изображения получены при использовании объектива x5; масштабная шкала -500 мкм. Б – результаты количественного анализа набухания органоидов при воздействии форсколина в сочетании с таргетными препаратами; Fsk – форсколин; *** $p < 0.001$ по сравнению с Fsk.

Figure 6. VX-809 corrector and VX-770 potentiator restore the function of CFTR protein in case of homozygous mutation F508del. А – indicative photos of intestinal organoids stained with calcein; all the images were obtained using x5 lens; scale -500 microns. Б – results of quantitative analysis of organoids swelling under the influence of forskolin combined with targeted drugs; Fsk – Forskolin; *** $p < 0.001$ compared with Fsk.

Литература/ References

- Капранов НИ, Каширская НЮ. Муковисцидоз. М: Медпрактика-М; 2014. 672 с. [Kapranov NI, Kashirskaya NU. Cystic fibrosis. Moscow: Medpraktika-M, 2014. 672 p. (In Russian)]
- Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959; (129):892-7.
- Кондратьева ЕИ, Петрова НВ, Красовский СА, Зинченко РА, Поляков АВ, Иващенко ТЭ, Гинтер ЕК, Одинокова ОН, Назаренко ЛП, Каширская НЮ, Амелина ЕЛ, Воронкова АЮ, Адян ТА, Павлов АЕ, Старина МА, Куцев СИ. Характеристика мутаций больных муковисцидозом Российской Федерации по данным регистра 2017 года и возможности таргетной терапии. *Вопросы практической педиатрии*. 2018;13(6):58-66. [Kondratyeva EI, Petrova NV, Krasovsky SA, Zinchenko RA, Polyakov AV, Ivashchenko TE, Ginter EC, Odinkova ON, Nazarenko LP, Kashirskaya NU, Amelina EL, Voronkova AY, Adyan TA, Pavlov AE, Starinova MA, Kutsev SI. Characterization of mutations in patients with cystic fibrosis of the Russian Federation according to the 2017 register and the possibility of targeted therapy. *Voprosy Prakticheskoy Peditrii*. 2018; 13(6):58-66. (In Russian)]
- Rowe SM, Clancy JP, Wilschanski M. Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity. *Methods In Molecular Medicine*. 2011; (741): 69-86. DOI: 10.1007/978-1-61779-117-8_6
- Кондратьева ЕИ, Мельяновская ЮЛ, Шерман ВД, De Jonge HR, Ефремова АС, Бухарова ТБ, Гольдштейн ДВ, Зодьбинова АЭ. Функциональные методы диагностики нарушений гена CFTR и его продукта (литературный обзор). *Вопросы практической педиатрии*. 2018; 13(4): 50–64 [Kondratyeva EI, Melyanovskaya YuL, Sherman VD, De Jonge HR, Efremova AS, Bukharova TB, Goldshtein DV, Zod'binova AE. Functional methods of diagnosing disorders of the CFTR gene and its product. *Voprosy Prakticheskoy Peditrii*. 2018; 13(4): 50–64. (In Russian)]
- Hug MJ, Derichs N, Bronsveld I, Clancy JP: Measurement of ion transport function in rectal biopsies. *Methods in Molecular Biology*. 2011; (741): 87-107. DOI: 10.1007/978-1-61779-117-8_7
- Derichs N, Pinders-Kessler L, Bronsveld I, Scheinert S, Rückes-Nilges C, de Jonge H, Nährlich L: Multicenter European Standardization and reference values for intestinal current measurement in rectal biopsies. *Pediatric Pulmonology*. 2013; 48 (36): 300 DOI: 10.1371/journal.pone.0073905
- Schüler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanskic M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A, Hug M, Leal T, Lebacqz J, Lebecque P, Lenoir G, Stanke F, Wallemacq P, Tümmler B, Knowles MR. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2004; 3(2): 151-155 DOI: 10.1016/j.jcf.2004.05.032
- Castellani C, Duff A, Bell S, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Barben J, Flume PA, Hodková P, Kashirskaya N, Kirszenbaum MN, Madge S, Oxley H, Plant B, Schwarzenberg SJ, Smyth AR, Taccetti G, Wagner TOF, Wolfe SP, Drevinek P. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018; (17): 153-178. DOI: 10.1016/j.jcf.2018.02.006
- Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, Felício V, Ribeiro MA, Uliyakina I, Marson FA, Kmit A, Cardoso SR, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Sousa L, Kunzelmann K, Ribeiro AF, Amaral MD. Measurements of CFTR-mediated Cl-secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for cystic fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS One*. 2012; (7): e47708. DOI: 10.1371/journal.pone.0047708
- Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, Gallati S, Ballmann M. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*. 2010; (65):594-599. DOI: 10.1136/thx.2009.125088
- Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, Brandis M, Eichler I, Rocha H, Lopes AI, Barreto C, Ramalho A, Amaral MD, Kunzelmann K, Mall M. CFTR Cl- channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2004; (127): 1085-1095. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.07.006
- Cutting GR Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(1):45-56. DOI: 10.1038/nrg3849
- Zomer-van OmmenDD, de Poel E, Kruisselbrink E, Oppelaar H, Vonk AM, Janssens HM, van der Ent CK, Hagemeyer MC, Beekman JM. Comparison of ex vivo and in vitro intestinal cystic fibrosis models to measure CFTR-dependent ion channel activity. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018;17(3):316-324. DOI: 10.1016/j.jcf.2018.02.007
- Dekkers JF, Berkens G, Kruisselbrink E, Vonk A1, de Jonge HR, Janssens HM, Bronsveld I, van de Graaf EA, Nieuwenhuis EE, Houwen RH, Vleggaar FP, Escher JC, de Rijke YB, Majoor CJ, Heijerman HG, de Winter-de Groot KM, Clevers H, van der Ent CK, Beekman JM. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Science Translational Medicine*. 2016;8(344):344-384. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad8278.
- Clancy JP, Cotton CU, Donaldson SH, Solomon GM, VanDevanter DR, Boyle MP, Gentsch M, Nick JA, Illek B, Wallenburg JC, Sorscher EJ, Amaral MD, Beekman JM, Naren AP, Bridges RJ, Thomas PJ, Cutting G, Rowe S, Durmowicz AG, Mense M, Boeck KD, Skach W, Penland C, Joseloff E, Bihler H, Mahoney J, Borowitz D, Tuggle KL. CFTR modulator therotyping: Current status, gaps and future directions. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018; pii: S1569-1993(18)30585-X.
- Noordhoek J, Gulmans V, van der Ent K, Beekman JM. Intestinal organoids and personalized

medicine in cystic fibrosis: a successful patient-oriented research collaboration. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2016;22(6):610-616 DOI: 10.1097/MCP.0000000000000315.

18. Ефремова АС, Бухарова ТБ, Каширская НЮ, Гольдштейн ДВ Применение кишечных органоидов для персонализированной диагностики и терапии муковисцидоза. *Медицинская генетика*. 2018; (9): 3-12 [Efremova AS, Bukharova TB, Kashirskaya Y, Goldshtein DV Intestinal organoids and their application for personalized diagnostics and treatment of cystic fibrosis. *Medical Genetics*. 2018; (9): 3-12. (In Russian)] DOI: 10.25557/2073-7998.2018.09.3-12

19. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, Gallati S, Ballmann M. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*; (65): 594-599. DOI: 10.1136/thx.2009.125088

20. Boj SF, Vonk AM, Statia M. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: an in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;(120). DOI: 10.3791/55159

21. Семьячкина АН, Чухрова АЛ, Воинова ВЮ, Курбатов МБ, Харабадзе МН, Кузнецова СЮ, Новиков ПВ, Поляков АВ Синдром Симпсона-Голаби-Бемеля I типа у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2013; 58(4): 55-60. [Semyachkina AN, Chukhrova AL, Voinova VYu, Kurbatov MB, Kharabadze MN, Kuznetsova SYu, Novikov PV, Polyakov AV Simpson-Golabi-Behmel Syndrome Type I in children. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2013; 58(4): 55-60. (In Russian)]

22. Maiuri L, Raia V, Kroemer G. Strategies for the etiological therapy of cystic fibrosis. *Cell Death And Differentiation*. 2017;24(11): 1825-1844. DOI: 1038/cdd.2017.126.

23. De la Hoz D, Villamil Osorio M, Restrepo-Gualteros SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators: Present and future in cystic fibrosis treatment. A review. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 2019;117(2):e131-e136. DOI: 10.5546/aap.2019.eng.e131

24. Mospan C, Mospan G, Byland E, Whitaker WB, Xiong L, Dunlap J, Canupp K. Drug updates and approvals: 2018 in review. *Nurse Practice*. 2018;43(12):23-32. DOI: 10.1097/01.NPR.0000547548.63764.6b.

25. Dekkers JF, van der Ent CK, Beekman JM. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Diseases*. 2013;1(e27112) DOI: 4161/rdis.27112.

Сведения об авторах

Кондратьева Елена Ивановна, д.м.н., профессор, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; Московский областной консультативно-диагностический центр для детей; адрес: Российская Федерация, 141009, Московская область, Мытищи, ул. Коминтерна, 24А с1; тел.: +7(916)2553385; e-mail: elenafpk@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>

Мельяновская Юлия Леонидовна, научный сотрудник, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(916)9244225; e-mail: melcat@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>

Ефремова Анна Сергеевна, к.б.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(495)3242024; e-mail: anna.efremova.83@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>

Булатенко Наталья Вадимовна, лаборант-исследователь, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(495)3242024; e-mail: bnv695@gmail.com

Бухарова Татьяна Борисовна, к.б.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(495)3242024; e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>

Гольдштейн Дмитрий Вадимович, д.б.н., профессор, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(495)3242024; e-mail: dvgoldrm7@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>

Зодьбинова Айна Эдуардовна, научный сотрудник, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(965)3636905; e-mail: azodbinova@mail.ru

Никонова Виктория Сергеевна, к.м.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; Городская клиническая больница №4 Департамента здравоохранения города Москвы; адрес: Российская Федерация, 115093, Москва, ул. Павловская, д. 25; тел.: +7(495)1118580; e-mail: nikonovavs@mail.ru

Жекайте Елена Кястутисовна, научный сотрудник, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(495)1118580; e-mail: elena_zhekaite@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5013-3360>

Каширская Наталья Юрьевна, д.м.н., профессор, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(499)3241224; e-mail: kashirskayanj@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0503-6371>

Мелконян Георгий Геннадьевич, д.м.н., Городская клиническая больница №4 Департамента здравоохранения города Москвы; адрес: Российская Федерация, 115093, Москва, ул. Павловская, д. 25; тел: +7(495) 9540201; e-mail: gkb4@zdrav.mos.ru

Одинаева Нисо Джумаевна, д.м.н., профессор, Московский областной консультативно-диагностический центр для детей; адрес: Российская Федерация, 141009, Московская область, Мытищи, ул. Коминтерна, 24А с1; тел.: +7(499) 2370223; e-mail: info@mokdcd.ru

Куцев Сергей Иванович, д.м.н., член-корреспондент РАН, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(495)6120037; e-mail: mgnc@med-gen.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3133-8018>

Author information

Elena I. Kondratyeva, Dr.Med.Sci, Professor, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Moscow Regional Consultative and Diagnostic Center for Children; Address: 24A c1 Kominternna Str., Mytishchi, Moscow Region, Russian Federation 141009; Phone: +7(916)2553385; e-mail: elenafpk@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>

Yulia L. Melianovskaya, researcher, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(916)9244225; e-mail: melcat@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8814-5532>

Anna S. Efremova, Cand.Bio.Sci, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495)3242024; e-mail: anna.efremova.83@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5035-6396>

Natalia V. Bulatenko, laboratory technician, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495)3242024; e-mail: bnv695@gmail.com

Tatyana B. Bukharova, Cand.Bio.Sci, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495)3242024; e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>

Dmitry V. Goldshtein, Dr.Bio.Sci., Professor, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495)3242024; e-mail: dvgoldrm7@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>

Aisa E. Zodbinova, researcher, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(965)3636905; e-mail: azodbinova@mail.ru

Victoria S. Nikonova, Cand.Med.Sci, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; City Clinical Hospital №4 of the Moscow City Health Department; Address: 25 Pavlovskaya Str., Moscow, Russian Federation 115093; Phone: +7(495)1118580; e-mail: nikonovavs@mail.ru

Elena K. Zhekaite, researcher, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495)1118580; e-mail: elena_zhekaite@mail.ru <https://orcid.org/0000-0001-5013-3360>

Natalia Y. Kashirskaya, Dr.Med.Sci, Professor, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(499)3241224; e-mail: kashirskayanj@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0503-6371>

Georgy G. Melkonyan, Dr.Med.Sci, City Clinical Hospital №4 of the Moscow City Health Department; Address: 25 Pavlovskaya Str., Moscow, Russian Federation 115093; Phone: +7 (495)9540201; e-mail: gkb4@zdrav.mos.ru

Niso J. Odinaeva, Dr.Med.Sci, Professor, Moscow Regional Consultative and Diagnostic Center for Children; Address: 24A c1 Kominternna Str., Mytishchi, Moscow Region, Russian Federation 141009; Phone: +7(499)2370223; e-mail: info@mokdcd.ru

Sergei I. Kutsev, Dr.Med.Sci, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Research Center for Medical Genetics; Address: 1 Moskvorechye Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495)6120037; e-mail: mgnc@med-gen.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3133-8018>

Поступила 30.12.2018 г.

Принята к печати 13.02.2019 г.

Received 30 December 2018

Accepted for publication 13 February 2019