

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Использование метода ОРКП в клинической практике у пациента с вариантом с. 2900T>C в трансположении с с.1521_1523delCTT гена *CFTR*

Мельяновская Ю.Л., Кондратьева Е.И.

- ¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области», (ул. Коминтерна, 24А, с1, Мытищи, 115093, Московская область, Россия)
- ² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», (ул. Москворечье, 1, Москва, 115522, Россия)

Резюме

Муковисцидоз (МВ) заболевание, обусловленное патогенными вариантами в гене *CFTR*. Наибольшую трудность в настоящий момент представляет оценка вклада в развитие заболевания редких и ранее не идентифицированных генетических вариантов (мутаций), с неопределенным клиническим значением, а также определение связи генотип-фенотип. Необходимы дополнительные методы диагностики в связи с большим числом пациентов с пограничными значениями потовой пробы.

Цель исследования: изучить патогенность варианта с.2900T>C гена *CFTR* у пациента с вариантами с.1521_1523delCTT и с. 2900T>C в гетерозиготном состоянии на основе оценки функциональной активности эпителиальных ионных каналов (ENaC, *CFTR*, CaCCs).

Материалы и методы: клиническая информация о пациенте из истории болезни, метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП).

Результаты: у пациента отмечены пограничные результаты потовой пробы, нормальные показатели панкреатической эластазы кала, спирометрия в пределах возрастной нормы, что соответствует мягкому течению заболевания. Методом ОРКП была показана нормальная функции хлорного канала. Впервые в России описаны клинические особенности пациента с генетическим вариантом с. 2900T>C в транс-положении с вариантом с.1521_1523delCTT.

Заключение: результаты проведенного обследования, клиническое течение заболевания соответствуют мягкому течению заболевания или отсутствию его. Дополнительное применение метода ОРКП подтвердило нормальную функцию *CFTR* канала у пациента-носителя варианта с. 2900T>C гена *CFTR* в транс-положении с вариантом с.1521_1523delCTT.

Ключевые слова: муковисцидоз; метод определения разницы кишечных потенциалов; вариант *CFTR*

Для цитирования: Мельяновская Ю.Л., Кондратьева Е.И. Использование метода ОРКП в клинической практике у пациента с вариантом с. 2900T>C в трансположении с с.1521_1523delCTT гена *CFTR*. Архив педиатрии и детской хирургии. 2024; 2(4):11–15. doi: 10.31146/2949-4664-apps-2-4-11-15

Муковисцидоз (МВ) или кистозный фиброз – аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное патогенными вариантами в гене муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (*CFTR*) [1]. Продукт гена представляет собой белок, который формирует ионный канал, переносящий ионы хлора через клеточную мембрану [2].

База данных CFTR2 (одна из 3х генетических баз для гена *CFTR*) [3] в настоящее время насчитывает более

2000 вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR*, причем патогенность некоторых из них, особенно миссенс-мутаций, все еще остается недоказанной. Как известно Российская когорта пациентов является высоко гетерогенной по количеству мутаций *CFTR*, что делает молекулярную диагностику особенно сложной и вызывает диагностические проблемы, особенно в случаях обнаружения редких или ранее не описанных мутаций [4]. Патогенность новых мутаций сдвига рамки считывания,

Информация об авторах / Information about authors

Мельяновская Юлия Леонидовна, научный сотрудник; научный сотрудник научно-клинический отдел муковисцидоза

✉ Кондратьева Елена Ивановна, профессор, д.м.н., заместитель директора по научной работе; руководитель научно-клинического отдела муковисцидоза, Заведующая кафедрой Генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования; e-mail: elenafpk@mail.ru

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Yulia L. Melyanovskaya, researcher; researcher, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis; ORCID: 0000-0002-8814-5532

✉ Elena I. Kondratieva, professor, MD, Deputy Director for Research; Head of the Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Head of the Department of Genetics of Respiratory Diseases, Institute of Higher and Additional Professional Education; e-mail: elenafpk@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6395-0407

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest

ORIGINAL ARTICLES

Use of the ICM method in clinical practice in a patient with the c.2900T>C variant in trans with c.1521_1523delCTT of the *CFTR* gene

Yu.L. Melyanovskaya, E.I. Kondratyeva

¹ Research Clinical Institute of Childhood of the Ministry of Health of the Moscow Region, (24A, build. 1, Kominterna str., Mytishchi, 115093, Moscow region, Russia)

² Research Center for Medical Genetics, (1, Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russia)

Summary

Cystic fibrosis (CF) is a disease caused by pathogenic variants in the *CFTR* gene. The greatest difficulty at the moment is assessing the contribution to the development of the disease of rare and previously unidentified genetic variants (mutations), mutations of uncertain clinical significance, as well as determining the genotype-phenotype relationship. Additional diagnostic methods are needed due to the large number of patients with borderline sweat test values.

Purpose of the study: to study the pathogenicity of the c.2900T>C variant of the *CFTR* gene in a patient with the c.1521_1523delCTT and c.2900T>C variants in a heterozygous state based on an assessment of the functional activity of epithelial ion channels (ENaC, *CFTR*, CaCCs).

Materials and methods: clinical information about the patient from the medical history, intestinal current measurement (ICM) method.

Results: the patient had borderline sweat test results, normal pancreatic fecal elastase levels, spirometry within the age norm, which corresponds to a mild course of the disease. The ICM method showed normal chloride channel function. For the first time in Russia, clinical features of a patient with the genetic variant c.2900T>C in trans -position with the variant c.1521_1523delCTT are described.

Conclusion: the results of the examination, the clinical course of the disease correspond to a mild course of the disease or its absence. Additional use of the ICM method confirmed the normal function of the *CFTR* channel in a patient carrying the c.2900T>C variant of the *CFTR* gene in trans -position with the c.1521_1523delCTT variant.

Key words: cystic fibrosis; method for intestinal current measurement; *CFTR* variant

For citation: Melyanovskaya Yu.L., Kondratyeva E.I. Use of the ICM method in clinical practice in a patient with the c.2900T>C variant in trans with c.1521_1523delCTT of the *CFTR* gene. *Archives of Pediatrics and Pediatric Surgery*. 2024; 2(4):11–15. doi: 10.31146/2949-4664-apps-2-4-11-15

небольших вставок / делеций и нонсенс вариантов объясняется ожидаемыми молекулярными повреждениями на уровне белка. Однако ситуация осложняется редкими миссенс вариантами. Носители данных вариантов часто имеют пограничные значения потовой пробы и стертую клиническую картину.

В качестве дополнительного метода диагностики в сложных клинических случаях рассматривают применение метода «Определения разницы кишечных потенциалов» (ОРКП) [5, 6]. Ранние описания пациентов с МВ основаны на клинических фенотипах и результатах потового теста и не включают диагностические данные ОРКП

Материалы и методы

Материалом исследования явились данные амбулаторной карты пациентки, результаты ДНК диагностики и кишечный биоптат пациентки: 2011 г.р. с диагнозом – муковисцидоз (E84.8), генотип c.1521_1523delCTT;2900T>C. Диагноз устанавливали согласно клиническим рекомендациям [7]. Пациентка наблюдается в ГБУЗ Московской области «НИКИ детства Минздрава Московской области».

Забор ректальных биоптатов проводился на оборудовании Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-23OU).

по определению функциональной активности эпителиальных ионных каналов, прежде всего хлорного *CFTR* канала. Дополнительный анализ дисфункции *CFTR* канала с помощью ОРКП в сочетании методов, характеризующих функцию *CFTR*, представляется необходимым диагностическим исследованием больных с легким течением болезни или моносимптомным фенотипом [5, 6].

Целью исследования было изучить патогенность варианта гена *CFTR* (NM_000492.4): c.2900T>C p.(Leu967Ser) у российского пациента с генотипом c.1521_1523delCTT;2900T>C на основе оценки функциональной активности эпителиальных ионных каналов (ENaC, *CFTR*, CaCCs).

Метод Определения разницы кишечных потенциалов проводился согласно европейским стандартным операционным процедурам V2.7_26.10.11 [8].

Исследование и форма информированного согласия одобрены Этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова» Минобрнауки России 15.10.18 (председатель – профессор Л.Ф. Курило).

Таблица 1.

Показатели плотности тока короткого замыкания (ΔI_{SC} , $\mu A/cm^2$) при введении стимуляторов у пациента носителя гетерозиготных вариантов с.1521_1523delCTT и с. 2900T>C гена *CFTR*.

Примечание:

PS-CF – пациенты носители «мягких» генотипов и с сохранной функцией поджелудочной железы

ΔI_{SC} , $\mu A/cm^2$	Амилорид	Форсколин/ ИВМХ	Карбахол	Гистамин
Биоптат № 1	-1.5	8.5	62	47.5
Биоптат № 2	-6	27.5	51	69
Биоптат № 3	-3.5	28.5	44	63
M \pm m большого	-3.67 \pm 1.59	21.5 \pm 7.97	52.33 \pm 6.42	59.83 \pm 7.84
Группа PS-CF	-17,73 \pm 4,35	14,25 \pm 1,78	–	47,52 \pm 32,52
F508del/ F508del	-15,7 \pm 3,51	3,33 \pm 0,63	16,55 \pm 1,44	17,83 \pm 3,57
Контрольная группа	-7,67 \pm 1,76	26,72 \pm 2,66	117,44 \pm 4,32	109,76 \pm 8,18

Результаты

Обследована пациентка 2011 года рождения, 11 лет с диагнозом: Муковисцидоз, неуточненный E84.9 Первичная цилиарная дискинезия? Бронхиальная астма, атопическая, тяжелое персистирующее течение, частично контролируемая. Поствоспалительная кардиомиопатия. ХСН II ФК. БЭН, средней степени. Генетический диагноз: носитель гетерозиготных вариантов с.1521_1523delCTT и с. 2900T>C гена *CFTR*.

Ребенок от 1 беременности, срочных родов. Масса при рождении-3580 г, рост – 53 см. Физиологической желтухи не было. До 1 года прибавки веса в норме. Неонатальный скрининг на муковисцидоз, со слов матери положительный, но данных не представлено. Ретест проведен на 21 день жизни, результат не знают.

С рождения частые obstructивные бронхиты, расстройство стула (жирный стул с раннего детства), повторные рвоты, частые отиты, снижения слуха нет.

В 2 года госпитализирована по поводу воспалительной кардиомиопатии, АВ блокада 1 ст., удлинение QT вторичное нарушение адаптации ЧСС. С 2014 года наблюдается по поводу тяжелой бронхиальной астмы, постоянно получает флутиказон. Частые респираторные заболевания. Дефицит массы тела. Стул 1 раз в день, неустойчивый, с раннего детства жирный.

Наследственность отягощена: у бабушки (со стороны мамы) – хронический гнойный бронхит, бронхоэктазы (резекция части легкого), гнойная мокрота при откашливании. Проживают в одном доме. Аллергический анамнез – не отягощен.

Проведено обследование.

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости, почек в 9 лет – гепатоспленомегалия, реактивные изменения печени, поджелудочной железы. Утолщение паренхимы почек, правосторонний нефроптоз. При повторном исследовании чрез год патологии не выявлено.

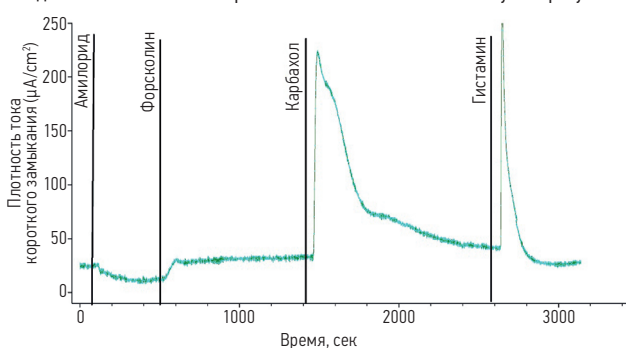
Компьютерная томография околоносовых пазух в возрасте 10 лет – КТ-картина субтотального заполнения левой верхнечелюстной пазухи с распространением патологического содержимого в средний носовой ход, на этом фоне медиальная стенка пазухи истончена, фрагментирована.

Рисунок 1.

Метод ОРКП. Пациент носитель гетерозиготных вариантов с.1521_1523delCTT и с. 2900T>C гена *CFTR*

Примечание.

При введении амилорида происходило снижение тока короткого замыкания (ΔI_{SC}), ответ на форсколин/ИВМХ нормальный, а на добавление карбахола и гистамина наблюдалось изменение тока короткого замыкания в положительную сторону.



Так же в возрасте 10 лет проведена компьютерная томография органов грудной клетки – КТ-картина единичного очагового уплотнения в S3 правого легкого, единичного кальцината в S4 левого легкого. Кальцинаты в бронхопульмональных лимфоузлах с обеих сторон до 3,5мм.

Потовая проба проведена на аппарате Нанодакт – результат 64 ммоль/л – пограничный (отрицательный результат до 50 ммоль/л, пограничный результат 50–79 ммоль/л, положительный результат более 80 ммоль/л).

Бактериологический посев отделяемое с задней стенки глотки – рост *S. aureus* 10⁴.

При молекулярно – генетическом исследовании методом секвенирования ДНК выделенной из крови пациента выявлены варианты – с.1521_1523delCTT и с. 2900T>C в гетерозиготном состоянии. Первый вариант является самым частым при муковисцидозе. Выпадение трех пар нуклеотидов в положении 1521_1523 приводит к нарушению созревания белка CFTR и его полному отсутствию на поверхности клеток. Второй вариант, описанный ранее как вариант вызывающий CFTR – ассоциированные заболевания (CM001652), в экзоне 17 гена *CFTR* (chr7:117282618T>C), приводящий к образованию миссенс-замены (p.(Leu967Ser), NM_000492.4), в гетерозиготном состоянии. Сегрегационный анализ не проводился.

При осмотре в возрасте 11 лет: рост 143 см (SDS –0,2) 45 перцентиль, вес 30,9 кг, перцентиль 16,0, ИМТ 14,2 кг/м2 (SDS –1,70).

Кашля при осмотре нет, заложенность носа справа умеренная. Состояние средней степени тяжести, самочувствие страдает за счет затрудненного дыхания. Кожа чистая, смуглая, умеренно влажная. Периоральный дерматит. Изменения пальцев по типу «барабанные палочки» и «часовые стекла» отсутствуют. Носовое дыхание умеренно затруднено больше справа. Искривление носовой перегородки. Тургор удовлетворительный, подкожно жировой слой развит слабо. В легких дыхание проводится во все отделы, хрипов нет, жесткое. ЧДД-22 в мин. Тоны сердца звучные, шум на верхушке. ЧСС- 96 в мин. Сатурация кислородом-96%. Живот не вздут, при пальпации мягкий, безболезненный. Печень по краю реберной дуги. Селезенка не пальпируется. Стул 1 раз

в сутки, периодически пенистый, кашицеобразный, со слов. Отеков нет, дизурию отрицают.

Спирометрия: форсированная жизненная ёмкость лёгких (ФЖЕЛ) 108% от должной, объём форсированного выдоха за первую секунду манёвра форсированного выдоха (ОФВ₁) 109% от должной, СОС 25–75% – 92% от должной, (нормальные показатели). Панкреатическая эластаза кала –1 двукратно – более 500мкг\г (норма).

Учитывая наличие в генотипе с.1521_1523delCTT;2900T>C второго варианта L967S с изменчивыми клиническими последствиями, пограничный результата потового теста, в возрасте 11 лет решено провести исследование методом определения разницы кишечных потенциалов.

Обсуждение

Генетический вариант L967S с.2900T>C p.Leu967Ser описанный ранее как вариант вызывающий CFTR ассоциированные заболевания в экзоне 17 гена *CFTR* (chr7:117282618T>C), приводящий к образованию миссенс-мутации (p.(Leu967Ser), NM_000492.4), в гетерозиготном состоянии с самым частым патогенным вариантом II класса при MB – F508del. В базе данных CFTR2 данный вариант числился как вариант с изменчивыми клиническими последствиями. Выявленный вариант нуклеотидной последовательности зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD (The Genome Aggregation Database) с частотой 0,0704%. Программы предсказания патогенности дают противоречивые результаты: DANN, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MVP, MutationTaster и SIFT расценивают вариант как патогенный, BayesDel_addAF, DEOGEN2, MutationAssessor и PrimateAI – как доброкачественный. Некоторые исследователи предполагают, что вариант нарушает активационный механизм WNK1-SPAK, что приводит к селективному нарушению функции CFTR, как бикарбонатного канала и может вызывать диабет [9]. с.1521_1523delCTT и с. 2900T>C.

Заключение

Описан анамнез и фенотип ребенка с генетическим вариантом с. 2900T>C в гетерозиготном состоянии с вариантом с.1521_1523delCTT. Результаты проведенных обследований (потова проба, панкреатическая эластаза кала I, функция дыхания), клиническое течение ставят под сомнение диагноз муковисцидоз. Дополнительное применение метода

Результаты ОРКП показали (табл. 1, рис. 1), что плотность тока короткого замыкания (ΔI_{sc}) в ответ на введение амилорида (стимуляция натриевых каналов) составила $-3.67 \pm 1.59 \mu A/cm^2$. Изменение ΔI_{sc} в ответ на введение форсколина (стимуляция хлорных каналов) составило $21.5 \pm 7.97 \mu A/cm^2$. В ответ на введение карбахола ΔI_{sc} изменяется в положительную сторону и составило $52.33 \pm 6.42 \mu A/cm^2$. В ответ на введение гистамина ΔI_{sc} изменяется в положительную сторону, что отражает отток ионов калия из клетки. При этом плотность тока составила $8.33 \pm 3.71 \mu A/cm^2$.

Тест свидетельствует о нормальной функции канала CFTR.

Учеными из Калифорнии вариант с. 2900T>C (в транс-положении с вариантами вызывающими муковисцидоз) был обнаружен у новорожденных с положительным скринингом, ни одного случая недостаточности поджелудочной железы и только один изолированный случай персистирующей *P. Aeruginosa*, результаты потовой пробы у данной группы новорождённых были менее 33 ммоль/л [10].

Методом ОРКП было показано, что вариант гена *CFTR* с. 2900T>C является непатогенным. Изменение тока короткого замыкания (ΔI_{sc}) на амилорид у пациента с вариантом с. 2900T>C соответствовало показателям контрольной группы и было менее выраженным, чем в группах с.1521_1523delCTT;1521_1523delCTT и PS-CF. Ответ (изменение ΔI_{sc}) на добавление форсколина (стимуляция хлорного канала) соответствовал показателям контрольной группы и был выше, чем в группах с.1521_1523delCTT;1521_1523delCTT и PS-CF, соответственно функция хлорного канала сохранена. Ответ на гистамин (стимуляция кальциевого канала) был ниже, чем в группах контроля, но выше, чем в группах сравнения.

ОРКП подтвердило нормальную функцию хлорного канала у пациента-носителя данных вариантов гена *CFTR*, что позволило исключить диагноз муковисцидоз в условиях сомнительного результата потового теста, неоднозначной клинической картины.

Литература | References

1. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020 May;109(5):893–899. doi: 10.1111/apa.15155.
2. Mall M.A., Galiotta L.J. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015 Sep;14(5):561–70. doi: 10.1016/j.jcf.2015.06.002.
3. The Clinical and Functional TRanslation of CFTR (CFTR2); available at: <http://cfr2.org>. (Accessed 05.11.2024.)
4. Petrova N.V., Marakhonov A.Y., Vasilyeva T.A. et al. Characteristics of the mutation spectrum identified by comprehensive investigation of the CFTR gene in the Russian patients. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(1):38–46. (in Russ.) doi: 10.18786/2072–0505–2019–47–004.
5. Graeber S.Y., Vitzthum C., Mall M.A. Potential of Intestinal Current Measurement for Personalized Treatment of Patients with Cystic Fibrosis. *J Pers Med.* 2021 May 8;11(5):384. doi: 10.3390/jpm11050384.
6. Minso R., Schulz A., Dopfer C. et al. Intestinal current measurement and nasal potential difference to make a diagnosis of cases with inconclusive CFTR genetics and sweat test. *BMJ Open Respir Res.* 2020 Oct;7(1): e000736. doi: 10.1136/bmjresp-2020–000736.
- Петрова Н.В., Марахонов А.Ю., Васильева Т.А. и др. Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена CFTR у российских больных муковисцидозом. Альманах клинической медицины. – 2019. – Т. 47. – № 1. – С. 38–46. doi: 10.18786/2072–0505–2019–47–004.

7. Union of Pediatricians of Russia, Association of Medical Geneticists, Russian Respiratory Society, Russian Transplant Society, Association of Pediatricians of the Moscow Region [Clinical guidelines "Cystic fibrosis"]. Moscow. 2021. (in Russ.)
Клинические рекомендации «Кистозный фиброз», 2021.
8. 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 Jul;65(7):594–9. doi: 10.1136/thx.2009.125088.
9. LaRusch J., Jung J., General I.J., Lewis M.D., Park H.W., Brand R.E., Gelrud A., Anderson M.A., Banks P.A., Conwell D., Lawrence C., Romagnuolo J., Baillie J., Alkaade S., Cote G., Gardner T.B., Amann S.T., Slivka A., Sandhu B., Aloe A., Kienholz M.L., Yadav D., Barmada M.M., Bahar I., Lee M.G., Whitcomb D.C.; North American Pancreatitis Study Group. Mechanisms of CFTR functional variants that impair regulated bicarbonate permeation and increase risk for pancreatitis but not for cystic fibrosis. *PLoS Genet*. 2014 Jul 17;10(7): e1004376. doi: 10.1371/journal.pgen.1004376.
10. Salinas D.B., Sosnay P.R., Azen C., Young S., Raraigh K.S., Keens T.G., Kharrazi M. Benign and Deleterious Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutations Identified by Sequencing in Positive Cystic Fibrosis Newborn Screen Children from California. *PLoS One*. 2016 May 23;11(5): e0155624. doi: 10.1371/journal.pone.0155624.

HPHVHB

