

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭНДОКРИНОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Гронская Софья Александровна

**ЭНДОКРИННЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ, СЕКРЕТИРУЮЩИХ
ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 23, ИХ ТРАНСКРИПТОМНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ**

3.1.19. Эндокринология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук

Белая Жанна Евгеньевна

Москва — 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1.1 Введение	13
1.2 Клинические и лабораторные проявления заболевания	16
1.3 Диагностические возможности инструментальных методов	21
1.4 Лечение	22
1.5 Транскриптомные и генетические характеристики ФРФ-23- продуцирующих опухолей	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
2.1 Условия проведения	26
2.2 Критерии соответствия	27
2.3 Клиническое обследование пациентов	33
2.4 Лабораторные методы исследования	35
2.5 Инструментальные методы исследования	37
2.6 Морфологическое исследование	37
2.7 Высокопроизводительное параллельное секвенирование и биоинформатический анализ	38
2.8 Методы лечения	39
2.9 Статистический анализ данных	40
2.10 Источник финансирования	41
2.11 Этическая экспертиза	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	42
3.1 Клинико-лабораторные характеристики пациентов с ФРФ-23- продуцирующей опухолью	42
3.1.1 Характеристики пациентов	42
3.1.2 Лабораторные проявления паранеопластического синдрома у пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями	48
3.1.3 Исходы хирургического и консервативного лечения пациентов с ФРФ- 23-секретирующими опухолями	49

3.1.4 Реабилитация пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями	52
3.2 Диагностическая визуализация ФРФ-23-продуцирующих опухолей	55
3.2.1 Топографо-анатомические характеристики ФРФ-23-секретирующих опухолей.....	55
3.2.2 Диагностические возможности методов визуализации ФРФ-23- продуцирующих опухолей	55
3.2.3 Практическое внедрение: клинические примеры использования сцинтиграфии с ОФЭКТ/КТ с ^{99m}Tc -тектротидом для локализации ФРФ-23- опухолей.....	59
3.3 Диагностические возможности маркера ФРФ-23, измеренного различными тест-системами, как метода диагностики гиперпродукции ФРФ-23 вследствие опухоли. Содержание альтернативных белков в крови пациентов с нарушениями фосфорного обмена	63
3.3.1 Верификация диагностических возможностей ФРФ-23, измеренного различными тест-системами. Содержание альтернативных белков в крови пациентов с нарушениями фосфорного обмена.....	63
3.3.2 Информативность маркера иФРФ-23 для дифференциальной диагностики ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии	65
3.3.3 Клинические примеры диагностических возможностей иФРФ-23	71
3.4 Транскриптомные характеристики ФРФ-23-секретирующих опухолей...	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	86
4.1 Клинические характеристики пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями	86
4.2 Предоперационная диагностика ФРФ-23-секретирующих опухолей	89
4.3 Дифференциальная диагностика ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии...	90
4.4 Транскриптомное исследование ФРФ-23-секретирующих опухолей	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ.....	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное) Анкета EQ5D	118
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное) Анкета ВАШ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Опухоль — индуцированная остеомалиция (или фосфопеническая остеомалиция, онкогенная остеомалиция) — это заболевание, причиной которого являются новообразования, секретирующие фактор роста фибробластов 23 (ФРФ-23).

ФРФ-23 — неклассический гормон костной ткани, в норме удаляет избыток фосфора с мочой и уменьшает образование кальцитриола. Для осуществления вышеописанных эффектов требуется взаимодействие ФРФ-23 с рецепторами на органах-мишенях, наиболее изученными из которых являются: почки, мозг, околощитовидные железы [1]. При патологическом избытке ФРФ-23 наблюдаются нарушения костного обмена и минерализации за счет снижения концентрации фосфатов в организме.

Хроническая гипофосфатемия может длительно оставаться невыявленной, т.к. процесс развивается постепенно, а фосфор редко определяют рутинно. Фосфор является необходимым элементом в организме человека. Он играет ключевую роль в минерализации скелета, входит в состав билипидного слоя клеточных мембран, участвует в энергетическом обмене, входит в состав молекул аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), регулирует функции ферментов [2–5]. Нарушения обмена фосфора приводят к развитию серьезных заболеваний, а несвоевременная постановка диагноза — к осложнениям. Причины гипофосфатемии можно подразделить на три основных механизма: снижение абсорбции фосфатов, перераспределение фосфатов из внеклеточного пространства внутрь клеток или кости, избыточное выведение фосфатов через почки. Основными гормонами, регулирующими обмен фосфора, являются: фактор роста фибробластов 23 (ФРФ-23), 1,25-дигидроксивитамин D3 (1,25(OH)₂D₃), паратиреоидный

гормон (ПТГ), описано влияние избытка ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста 1) при акромегалии на уровень фосфора. Однако главным фосфатурическим гормоном считается ФРФ-23.

Новообразования, секретирующие ФРФ-23, обычно представляют собой особый тип редких, доброкачественных мезенхимальных опухолей, их также называют фосфатурическими [6]. Опухоль-индуцированная остеомалиция из-за редкости случаев изучена недостаточно. По данным Дании и Германии, заболеваемость составила около 0,13 случаев на 100 000 человек в год, а распространенность — 0,7 случаев на 100 000 человек [7, 8]. В мире описано около 2000 клинических случаев [9]. Клинические проявления включают значительные поражения опорно-двигательного аппарата, что без лечения может привести к полной иммобилизации. Тем не менее при своевременном удалении новообразования возможно полное выздоровление.

Для успешного хирургического лечения крайне важным является диагностика. ФРФ-23-опухоли трудно найти из-за малых размеров образования, разнообразной локализации и отсутствия специфических лучевых признаков. На поверхности опухолей обнаруживаются рецепторы соматостатина 2А типа (SSTR2A), поэтому методы функциональной визуализации могут значительно усовершенствовать диагностику. С другой стороны, до 27% опухолей остаются нелокализованными [39]. С клинической точки зрения тяжесть симптомов обусловлена секреторной активностью опухоли, а ее медленный рост имеет меньшее значение. Поиск новых мишеней для визуализации и изучение механизма секреции ФРФ-23 остаются актуальными задачами. Современные методы транскриптомного анализа позволяют определить специфические таргеты для лечения и диагностики.

Цель исследования

Изучить клинико-лабораторные, эндокринные и транскриптомные характеристики опухолей, секретирующих фактор роста фибробластов 23, оптимизировать методы диагностики и варианты лечения.

Задачи исследования

1. Изучить клинические проявления опухолевой секреции ФРФ-23.
2. Оценить исходы хирургического иссечения и консервативного лечения (метаболитами активной формы витамина D, солями фосфора калия дигидрофосфата и натрия двухосновного фосфата) пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями.
3. Оценить диагностические возможности радионуклидных технологий (сцинтиграфия с применением радиофармпрепарата (РФП) на основе октреотида с однофотонной эмиссионной компьютерной томографией ОФЭКТ/КТ), компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ) для визуализации ФРФ-23-продуцирующих опухолей.
4. Оценить диагностическую значимость тест-систем для измерения гиперпродукции уровня ФРФ-23 вследствие опухоли в сыворотке крови среди пациентов с нарушениями фосфорного обмена.
5. Оценить уровни секреторных белков костной ткани (липокалин-2, склеростин) в условиях нарушения обмена фосфора при избыточной секреции ФРФ-23 и ИРФ-1, вследствие опухоль-индуцированной остеомалиции и акромегалии.
6. Изучить транскриптомные характеристики опухолей, секретирующих ФРФ-23.

Научная новизна

Впервые в России изучены клинические, биохимические, гормональные, диагностические проявления и методы лечения взрослых пациентов с нарушениями фосфорного обмена при опухолевой секреции ФРФ-23.

Впервые в мире проведен анализ РНК единичных клеток фосфатурических мезенхимальных опухолей, что в совокупности с анализом тотальной РНК выявило характерный транскриптомный профиль ФРФ-23-секретирующих образований, в том числе гиперэкспрессию генов, осуществляющих везикулярный экзоцитоз.

Практическая значимость работы

Впервые в России изучены диагностические возможности измерения ФРФ-23 в сыворотке крови и предложен оптимальный тест для диагностики ФРФ-23-секретирующих опухолей.

Впервые в России внедрен метод соматостатин-рецепторной сцинтиграфии в режиме однофотонной эмиссионной компьютерной томографии для топической диагностики опухолей, секретирующих ФРФ-23, и ассоциированной онкогенной остеомалации у пациентов взрослого возраста.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Эндокринными проявлениями опухолей, секретирующих ФРФ-23, являются нарушение обмена фосфора (гипофосфатемия и снижение индекса реабсорбции фосфатов) и вероятность развития вторичного гиперпаратиреоза, что клинически проявляется сочетанием патологических переломов, болевого синдрома, сниженной мобильности пациентов.

2. Диагностика фосфатурических мезенхимальных опухолей может быть оптимизирована с внедрением исследования интактного ФРФ-23 в сыворотке крови и соматостатин-рецепторной сцинтиграфии всего тела в режиме ОФЭКТ.

3. Транскриптомные характеристики ФРФ-23-секретирующих опухолей соответствуют активно секретирующим предшественникам остеоцитов, утративших отрицательную обратную связь на гипофосфатемию, с гиперэкспрессией генов SNARE-комплекса, осуществляющих слияние внутриклеточных секреторных гранул с клеточной мембраной.

Внедрение в практику

Метод соматостатин-рецепторной сцинтиграфии в режиме ОФЭКТ для топической диагностики опухолей, секретирующих фактор роста фибробластов 23, и ассоциированной онкогенной остеомалиции у пациентов взрослого возраста признан эффективным и одобрен для включения в клинические рекомендации Министерством здравоохранения Российской Федерации по результатам клинической апробации.

Научные положения и практические рекомендации, изложенные в диссертации, внедрены в повседневную работу отделения остеопороза и остеопатий НИИ Клинической эндокринологии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России; ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России; ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова».

Апробация полученных результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 17.09.2024 г. на расширенной межотделенческой научной конференции ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Результаты работы представлены в виде устных докладов на международных конгрессах: Международный Конгресс по изучению скелета «ISS» (Монреаль, Канада, 2024 г.), 44-й Международный Конгресс ортопедов «SICOT» (Белград, Сербия, 2024 г.), 7-й Международный Конгресс ортопедов (Лиссабон, Португалия, 2023 г.).

Результаты работы представлены в виде постерных докладов на международных конгрессах: Международные конгрессы ежегодное собрание Американского общества по изучению костного метаболизма «ASBMR Annual Meeting» (Торонто, Канада, 2024 г.), (Ванкувер, Канада, 2023 г.), (Вашингтон, США, 2021 г.); Международном Конгрессе остеопороза и остеоартрита «WCO IOF-ESCEO» (Лондон, Великобритания, 2021 г.), (Барселона, Испания, 2023 г.); 26-й Европейский конгресс эндокринологов (Стокгольм, Швеция, 2024 г.); Конгресс общества эндокринологов «ENDO» (Чикаго, 2023 г.).

Результаты работы удостоены награды Young Investigator Award на международном конгрессе American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting (Vancouver, Canada, 2023).

Результаты работы представлены в виде устных докладов на всероссийских конгрессах: Всероссийская образовательная онлайн-конференция, посвященная 90-летию ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России «Актуальные проблемы клинической эндокринологии» (online, 2020); VIII Российский конгресс по остеопорозу, остеоартриту и другим метаболическим заболеваниям скелета с международным участием (online, 2022), Всероссийской научно-образовательной онлайн-конференции «Остеопороз как междисциплинарная проблема XXI века» (online, 2022); Всероссийской научно-образовательной онлайн-конференции «Актуальные вопросы современной эндокринологии: от инноваций до реальной клинической практики» (online, 2022); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Школа по патологии костей и мягких тканей: Вопросы диагностики, современные подходы к лечению, факторы прогноза» (НИИ онкологии Томского НИМЦ, 2023); Всероссийская научно-образовательная онлайн-конференция «Актуальные вопросы современной эндокринологии: от инноваций до реальной клинической практики» (Москва, 2023); Остеопороз в мегаполисе: фокус на старшее

поколение и вторичные причины повышенной хрупкости скелета (2023, online); X (XXIX) Национальный конгресс эндокринологов с международным участием ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (Москва, 2023) (удостоена премии «Лучший доклад на секции «Научное заседание российского общества молодых эндокринологов»); Всероссийская онлайн-конференция «Актуальные вопросы современной эндокринологии: от инноваций до реальной клинической практики» (2023); IX Российском конгрессе по остеопорозу, остеоартриту и другим метаболическим заболеваниям скелета с международным участием (2024); V (XXX) Национального конгресса эндокринологов «Инновационные технологии в эндокринологии» с международным участием (ИТЭ-2024); XVIII Всероссийский национальный конгресс лучевых диагностов и терапевтов «Радиология-2024»; Юбилейная конференция Восточно-Европейской группы по изучению сарком, посвященная 15-летию EESG (Санкт-Петербург, 2024); IX Конгрессе «Проблема остеопороза в травматологии и ортопедии», «Акцент на пациента: путь от теории к практике», посвященный 100-летию Зацепина Сергея Тимофеевича (Москва, 2024).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 21 печатная работа, в том числе 6 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки медицинских журналах, опубликованные за рубежом тезисы — 12 и опубликованные в сборниках Российских конференций тезисы — 3.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на русском языке в объеме 119 страниц машинописного текста и состоит из введения и обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных

исследований, обсуждения результатов и заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 30 рисунками. Список использованной литературы включает 104 источника: 6 отечественных и 98 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Введение

Опухоль-индуцированная остеомалиция является орфанным заболеванием, вызываемым фосфатурическими мезенхимальными опухолями (ФМО), секретирующими фактор роста фибробластов 23 (ФРФ-23) [6]. Секреция опухолью гормона ФРФ-23 приводит к развитию паранеопластического синдрома, ведущее звено которого — тяжелое течение фосфопенической остеомалиции. Опухоли, являющиеся причиной этого состояния, в большинстве случаев представляют собой высокодифференцированные доброкачественные новообразования с медленным темпом роста.

Этиология фосфатурической мезенхимальной опухоли, как и большинства других новообразований, пока остается неизвестной. На сегодняшний день не найдено ни генетических, ни этнических, ни географических различий в распространенности и этиологии, и нет убедительных доказательств влияния внешних факторов на развитие заболевания. В организме человека ФРФ-23 синтезируют и секретируют остециты — клетки костной ткани. Остециты и их предшественники являются производными мезенхимальных стволовых клеток. Главным стимулом для секреции ФРФ-23 является высокий уровень фосфора в крови. Гиперсекреция ФРФ-23 документирована у разнообразных доброкачественных опухолей, таких как гемангиоперицитома, липома, опухоль околоушной железы и др. [1]. В 1987 году N. Weidner предложил концепцию объединения опухолей под термином «фосфатурические мезенхимальные опухоли». Описаны случаи злокачественной трансформации мезенхимальной фосфатурической опухоли. Время от начала заболевания до трансформации варьируется от момента первого проявления до более чем 20 лет спустя, предикторов не выявлено, за исключением распространенности

процесса и быстрого роста опухоли [39]. В мировой литературе менее 5% случаев связаны с злокачественными опухолями: раком простаты [11, 12], раком легких [13], раком яичников [14], гемобластомами [15] и другими. Также в литературе имеются данные о наличии «ФРФ-23-негативных» опухолей, которые вырабатывают другие фосфатрегулирующие соединения, такие как фризл-связанный белок 4, фактор роста фибробластов 7 и матриксный внеклеточный фосфогликопротеин [6, 16, 17]. Симптомы, связанные с фосфопенической остеомалацией опухолевого происхождения, у пациентов с онкологическими заболеваниями могут быть замаскированы общими проявлениями основного онкологического процесса, что осложняет дифференциальную диагностику.

Заболевание обнаруживают у лиц преимущественно после четвертой декады жизни. В литературе есть описания ФМО в любом, даже очень раннем возрасте [18–21]. Однако у детей преобладают именно врожденные формы гиперсекреции ФРФ-23. В первую очередь необходимо исключать рахитические заболевания, такие как синдром Х-сцепленного гипофосфатемического рахита, синдром Мак-Кьюна Олбрайта, аутосомно-доминантный гипофосфатемический рахит, а для дифференциальной диагностики предлагают исследовать следующие гены: *DMP1*, *ENPP1*, *FAM20C*, *FGF23*, *FGFR1*, *GNAS*, *NF1*, *PHEX*, *PTHRI*, *RAS/HRAS/NRAS*, *SLC34A1*, *SLC34A3* [22, 23]. На опухолевую природу могут указывать такие данные как отсутствие семейного анамнеза, нормальное развитие в детском и юношеском возрасте, резкое начало симптомов во взрослом возрасте.

Ввиду редкости и неспецифичности клинической картины заболевание часто остается недиагностированным. Течение крайне тяжелое с развитием инвалидизации и сокращением качества и продолжительности жизни, что определяет его клиническую значимость. На текущий момент в мире описано приблизительно 1700 клинических случаев [9]. В 2022 году был проведен мета-анализ, включающий клинические данные случаев остеомалации,

зафиксированных по всему миру [9]. По результатам этого анализа заболевание отмечалось у мужчин чаще. В Японии в 2015 году проведена оценка заболеваемости опухоль-индуцированной остеомалацией, и она составила 0,04 случая на 100 000 человек в год [24]. Этот показатель существенно ниже, чем у аналогичного клинического состояния — X-сцепленного гипофосфатемического рахита (XLH) [25, 26, 27]. Согласно данным национального регистра Дании, заболеваемость составила менее 0,13–0,10 случая на 100 000 человек, за период с 2008 по 2018 год. Распространенность ФРФ-23-опухолей не превышает 0,7 случая на 100 000 человек среди всего населения. В течение 2018 года было зарегистрировано не более девяти новых случаев. Классификация по МКБ-10 неоднозначна. В практике используется код E83.3 «Нарушения обмена фосфора и фосфатаз». Учитывая, что заболевание развивается и усугубляется на фоне длительно существующей малосимптомной хронической гипофосфатемии, можно предположить, что распространенность выше, но остается малоизученной. Другими состояниями, при которых наблюдается избыток ФРФ-23 могут быть фиброзная дисплазия [28], внутривенное введение препаратов железа. Дефицит железа стимулирует выработку ФРФ-23, который впоследствии расщепляется на неактивные фрагменты. Некоторые внутривенные препараты железа, например карбоксимальтоза железа, по-видимому, предотвращают это расщепление, что приводит к повышению концентрации ФРФ-23 и экскреции фосфатов через почки [29]. ФРФ-23-опухоль внесена в классификацию опухолей ВОЗ (WHO Classification of tumors) как «Фосфатурическая мезенхимальная опухоль». Располагаться новообразование может по всему телу, но общей чертой является мезенхимальное происхождение и способность секретировать фосфатурические соединения, а самым известным из которых является ФРФ-23 [30–32].

1.2 Клинические и лабораторные проявления заболевания

Несмотря на доброкачественное происхождение опухоли, заболевание протекает тяжело за счет избыточной секреции ФРФ-23, что приводит к разнообразным нарушениям, однако ведущим клиническим проявлением является хроническая гипофосфатемия [6, 30, 31]. ФРФ-23 воздействует на почки, а именно снижает активность натрий-зависимых фосфатных транспортеров NaPi2a и NaPi2c (*SLC34A1* и *SLC34A3*), и тем самым стимулирует экскрецию фосфатов из организма. Кроме того, ФРФ-23 подавляет синтез и усиливает катаболизм 1,25(OH)₂D₃, что препятствует всасыванию фосфора в ЖКТ [1]. Фосфор — жизненно необходимый элемент в организме человека. Он играет ключевую роль в минерализации скелета, является составной частью билипидного слоя клеточных мембран, молекул АТФ, РНК и ДНК, участвует в энергетическом гомеостазе, регулирует функции ферментов [2–5].

В организме человека подавляющая часть фосфора содержится в костях (около 85%, ~600 г). Оставшаяся меньшая часть располагается преимущественно внутриклеточно, и лишь 1% — во внеклеточной жидкости, т.е. в крови, где он доступен для лабораторного определения [2]. Концентрация фосфатов в сыворотке крови, которую измеряют при биохимическом анализе, отражает всасывание фосфатов в ЖКТ, перераспределение в организме и потери в почках. Понимание гормональной регуляции обмена фосфора позволяет верно интерпретировать лабораторные данные и определить причину нарушения обмена фосфора [33].

Основными гормонами, регулирующими обмен фосфора, являются: фактор роста фибробластов 23 (ФРФ-23), 1,25-дигидроксивитамин D₃ (1,25(OH)₂D₃), паратиреоидный гормон (ПТГ), описано влияние избытка ИФР-1 при акромегалии на уровень фосфора. Однако наиболее мощным фосфатурическим действием обладает ФРФ-23. Причины гипофосфатемии можно подразделить на три основных механизма:

1. Нарушение поступления или всасывания фосфора. Это может быть обусловлено низким потреблением фосфатов с пищей, анорексией, парентеральным питанием с недостаточным содержанием фосфатов, хронической диареей, воспалительными заболеваниями кишечника, приемом антацидов, севеламера и др. лекарств, влияющих на обмен фосфора, дефицитом витамина D, злоупотреблением алкоголем.
2. Перераспределение фосфора внутри клеток или в кости. Это может наблюдаться при остром респираторном алкалозе, декомпенсированном диабете с кетоацидозом, рефининг-синдроме, синдроме голодных костей, приеме лекарственных средств.
3. Избыточные потери фосфатов в почках ввиду:
 - 1) ФРФ-23-зависимых нарушений. Такими являются: ФРФ-23-секретирующее опухоль, генетические заболевания (X-сцепленный гипофосфатемический рахит, аутосомно-доминантный гипофосфатемический рахит, синдром МакКьюна-Олбрайта-Брайцева), инъекции препаратов железа.
 - 2) ПТГ-зависимых нарушений.
 - 3) Патологии почек с нарушением канальцевой реабсорбции. Это наблюдается при генетических заболеваниях (наследственный рецессивный гипофосфатемический рахит с гиперкальциурией, X-сцепленный рецессивный гипофосфатемический рахит с гиперкальциурией), отравлении тяжелыми металлами, синдроме Фанкони.

Хроническая гипофосфатемия может длительно оставаться недиагностированной, т.к. снижение уровня фосфора происходит постепенно и его редко определяют рутинно. Клинические проявления неспецифичны и

зависят от степени тяжести и длительности гипофосфатемии. Легкая гипофосфатемия может протекать незаметно. Симптомы возникают при тяжелой хронической гипофосфатемии и связаны в основном со снижением уровня внутриклеточного фосфата и доступности АТФ, уменьшением содержания 2,3-дифосфоглицериновой кислоты в эритроцитах, что снижает доставку кислорода к тканям. Дефицит фосфора в крови и, следовательно, в костной ткани приводит к накоплению неминерализованного остеоида, не способного выдерживать осевую нагрузку [30, 31, 34, 35]. Характерны скелетные и мышечные проявления, такие как остеомалация, боль, переломы и псевдопереломы, низкий рост, костные деформации, разрушение зубов. Поэтому уровень фосфатов в сыворотке крови рекомендуется измерять у всех пациентов с необъяснимыми симптомами со стороны опорно-двигательного аппарата [33]. Нервно-мышечные проявления включают слабость, парестезии, рабдомиолиз, энцефалопатию и судороги. Симптомы со стороны сердечно-сосудистой и кроветворной систем включают гемолиз, снижение функции левого желудочка и дыхательную недостаточность. Выраженные проявления более характерны для резко возникшей гипофосфатемии, развивающейся на фоне острых состояний, сопровождающихся перераспределением фосфатов (например, при декомпенсации сахарного диабета, рефидинг-синдроме, злоупотреблении алкоголем).

Необходимо подчеркнуть, что онкогенная остеомалация иногда может быть неверно диагностирована как остеопороз или метастатическое поражение скелета [36], а задержка в диагностике может привести к формированию деформаций скелета [37]. В 95% случаев пациенты длительно наблюдаются с другими диагнозами: остеопороз, гиперпаратиреоз, стеноз позвоночного канала, остеонекроз головки бедренной кости, фибромиалгия, костные метастазы, анкилозирующий спондилит, дефицит витамина D, артрит [16, 38, 39].

По данным литературы, заболевание диагностируется в среднем спустя 4-8 лет от момента обращения за медицинской помощью [16]. Это связано с редким исследованием фосфора сыворотки, неосведомленностью о ФМО, неспецифичностью симптомов, недоступностью измерения ФРФ-23 во многих странах мира [16, 39].

Лабораторные проявления ФРФ-23-опухоли характеризуются гипофосфатемией, увеличением активности щелочной фосфатазы и низкими концентрациями активного метаболита 1,25(ОН)2D3. Эти изменения могут сопровождаться увеличением уровня ПТГ и при длительном отсутствии лечения изменениями уровня кальция крови [6, 40]. По данным литературы, наблюдаются высокие концентрации интактного ФРФ-23 (иФРФ-23) в крови. Ретроспективный анализ 144 случаев показал, что медиана концентраций иФРФ-23 при доброкачественных образованиях составила 302,9 пг/мл (мин. 42,6, макс. 706,5) [16, 41].

Кроме того, наблюдается потеря фосфатов с мочой. Чтобы оценить этот параметр, рассчитывается показатель тубулярного индекса реабсорбции фосфора (TRP, %). В норме данный индекс должен колебаться в пределах 85-95% [6]. В случае наличия ФРФ-23-опухоли активная экскреция фосфора с мочой приводит к снижению TRP, % до уровня менее 85%. Формула для расчета данного индекса представлена ниже:

$$TRP, \% = \left[1 - \left(\left(\frac{UPh}{UCr*} \right) \times \left(\frac{PCr*}{PPh} \right) \right) \right] \times 100, \quad (1)$$

где TRP, % — тубулярный индекс реабсорбции фосфора, UPh — фосфор разовой мочи (ммоль/л), UCr — креатинин разовой мочи (ммоль/л), PCr — креатинин плазмы либо сыворотки (ммоль/л), PPh — фосфор плазмы либо сыворотки (ммоль/л).

Если показатель креатинина представлен в единицах измерения мкмоль/л, то их следует перевести в ммоль/л. Для этого мкмоль/л необходимо разделить на 1000 и получить ммоль/л. Пример: Креатинин 76,2 мкмоль/л = 0,0762 ммоль/л.

При наличии хронической болезни почек стоит рассчитать индекс максимальной реабсорбции фосфатов с поправкой на скорость клубочковой фильтрации (СКФ) (TmP/GRF). Расчет TmP/GRF производится по одной из двух формул, в зависимости от уровня TRP:

Если $TRP \leq 0,86$ (86%), тогда используют формулу:

$$TmP/GRF = PPh \times TRP * , \quad (2)$$

где TmP/GRF — индекс максимальной реабсорбции фосфатов с поправкой на СКФ, PPh — фосфор плазмы либо сыворотки (ммоль/л), TRP — тубулярный индекс реабсорбции фосфора (в долях).

* Показатель TRP для расчета по формуле необходимо перевести в доли. Для этого TRP, % следует разделить на 100. Пример: $TRP 41\% = 0,41$.

Кроме того, идут поиски маркеров изменений костного метаболизма при нарушенном обмене фосфора. Исследуются молекулы, обладающие эндокринными и паракринными эффектами. Липокалин-2 — это белок, экспрессируемый различными клетками, в том числе в костном мозге, и секретируемый в кровь. Он участвует в транспорте и воздействии на органы-мишени биологически-активных молекул (стероидов, простагландинов, гормонов). Кроме того, он является маркером поражения почек и его уровень изменяется при заболеваниях с нарушением обмена глюкозы и инсулинорезистентностью (сахарный диабет, ожирение). Склеростин — это белок, экспрессируемый преимущественно в костной ткани и являющийся ключевым ингибитором костеобразования. Экспрессия склеростина может меняться в зависимости от метаболических изменений, в том числе при приеме глюкокортикоидов, влияния гипергликемии, избытка паратиреоидного и половых гормонов и физической нагрузки.

Таким образом, при подозрении на остеомалацию в анализе крови определяют повышение щелочной фосфатазы (ЩФ), что отражает нарушения минерального обмена, а также показатели кальция, фосфора, ПТГ, витамина 25(OH)D. При обнаружении гипофосфатемии проводят дифференциальную

диагностику между нарушением всасывания, перераспределением и избыточным выведением фосфора. Нарушение всасывания часто сопровождается дополнительными дефицитами других макроэлементов и особенностями анамнеза. Перераспределение фосфора в межклеточном пространстве характерно для острых состояний, декомпенсации хронических заболеваний, что можно предположить благодаря сбору анамнеза и биохимическим нарушениям. Избыточную потерю фосфатов с мочой подтверждает снижение индекса тубулярной реабсорбции фосфора (TRP, %), ниже нормы 85-95%. Потери фосфора в моче могут быть обусловлены избыточным действием ФРФ-23, ПТГ или первичной патологией почек. При подозрении на ФРФ-23-опухоль проводят поиск новообразования.

1.3 Диагностические возможности инструментальных методов

Визуализация опухолей до сих пор сложна из-за их малых размеров, мезенхимальной природы, разнообразной локализации и отсутствия специфических лучевых признаков. Чаще поражаются конечности, голова и суставы. Обычно опухоли не инкапсулированы, могут врастать в окружающие ткани и визуально быть неотличимы от них [1]. Поэтому рутинными методами МСКТ и МРТ выявить опухоли затруднительно. В ФРФ-23-опухолях были обнаружены соматостатиновые рецепторы 2А типа (SSTR2A). Предлагаются методы функциональной визуализации (сцинтиграфия и позитронно-эмиссионная томография), основанные на сродстве диагностических РФП к опухолевым рецепторам (соматостатиновые 2А типа SSTR2A) [6]. Для проведения сцинтиграфии используют РФП ^{99m}Tc -тектротид, ^{111}In -октреотид. Для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ, ПЭТ/КТ) используют соли галия: Ga DOTA-TATE/NOC. Известный препарат для поиска новообразований ^{18}F -фтордезоксиглюкоза (^{18}F -ФДГ) не продемонстрировал удовлетворительных результатов в диагностике ФРФ-23-образований. Применение ^{18}F -ФДГ характеризуется сниженной

чувствительностью по сравнению со сцинтиграфией, и предпочтение отдается ПЭТ/КТ с Ga DOTA-TATE [23, 42].

Кроме того, около 30% опухолей не удастся найти, поскольку у них отсутствует экспрессия SSTR2A. В мире было предложено применение селективного забора крови из вен с определением ФРФ-23 в сомнительных случаях, и этот метод уже показал свою эффективность [43, 44].

1.4 Лечение

Лучшим методом лечения на сегодняшний день считается хирургическое удаление опухоли, при радикальном иссечении возможно полное выздоровление [22, 23, 45–47]. Наиболее доступным показателем эффективности лечения считается концентрация фосфора в сыворотке крови, которая восстанавливается уже на 5-14 сутки после радикальной операции, а ремиссия в большинстве случаев сохраняется длительно. При нерадикальной операции возможны метастазирование и рецидивы. В 2022 году вышли международные клинические рекомендации по диагностике и лечению опухоль-индуцированной остеомалации [23]. В данном документе отдельный абзац посвящен рецидивам заболевания после хирургического лечения. Отмечено, что, согласно немногочисленным исследованиям, рецидивы преимущественно встречались у пациентов, перенесших предоперационную биопсию [23, 48]. В связи с чем обсуждается возможность подтверждения диагноза путем селективного забора крови с определением концентраций ФРФ-23. К другим факторам риска рецидива относят женский пол, опухоли позвоночника, злокачественные новообразования [45].

Консервативная терапия назначается на предоперационном этапе и в случае неоперабельных образований. Целью является возмещение дефицита фосфора (назначаются активные и нативные формы витамина D, а по показаниям — соли фосфора) [49]. Разработан и зарегистрирован для лечения ФМО в США, Японии и некоторых странах Евросоюза препарат «Буросумаб»,

который является человеческим моноклональным антителом к ФРФ-23. В России препарат не зарегистрирован.

В литературе описаны альтернативные, но с недоказанной эффективностью методы лечения: препараты октреотида, цинакальцет, попытки абляции опухолевых очагов [22]. Касательно химиотерапии злокачественных опухолей, секретирующих ФРФ-23, определенных рекомендаций нет. Seijas R и соавт. [50] сообщали, что шесть циклов приема адриамицина остановили метастазирование на два года. Sidell D. и соавт. [51] использовали доксирубицин, доцетаксел и гемцитабин для химиотерапии злокачественной опухоли гортани. Morimoto T. и соавт. [41] предложили комбинированную химиотерапию, состоящую из адриамицина, ифосфамида, гемцитабина и доцетаксела. Однако из 5 пациентов, получавших химиотерапию по поводу злокачественных ФРФ-23 опухолей, выжил только один пациент с опухолью гортани. Значимой взаимосвязи между лечением и результатами обнаружено не было [10, 12]. Морфологические характеристики разнообразны. В 2004 году Folpe A. с соавторами описали гистологические признаки: веретенообразные мелкие клетки, внутриопухолевые грубодисперсные кальцинаты, остеокластоподобные гигантские клетки, зрелый жир, отсутствие капсулы, опухоль может инфильтрировать кость между трабекулами и вращать в соседние ткани. Злокачественные признаки (высокая клеточная и митотическая активность, некроз) нехарактерны. Иммуногистохимически (ИГХ) может определяться экспрессия ФРФ-23, рецептора соматостатина 2A, FGFR1 [37].

1.5 Транскриптомные и генетические характеристики ФРФ-23-продуцирующих опухолей

Фосфатурические мезенхимальные опухоли носят спорадический характер и не описаны в рамках наследственных синдромов. Работ по изучению молекулярно-генетических характеристик опухоли выполнено

немного, и на данный момент механизмы туморогенеза и секреции остаются не полностью изучены. Ключевую роль ФРФ-23 и его экспрессию в ФМО показал в 2001 году Т. Shimada и соавт. [52]. В 2002 году De Veur с коллегами показала, что ФМО экспрессируют гены, связанные с минеральным обменом [44]. Далее было продемонстрировано, что в опухолях активен рецептор ФРФ типа 1, передающий в ткань опухоли сигналы через пути (ERK1)/ERK2 и (mTOR), стимулирующие туморогенез и секрецию ФРФ-23 [53]. Есть ряд работ, которые выявили вероятные причины активации FGFR1. Первое объяснение — это наличие в ткани опухоли химерных генов (продукт слияния двух генов), затрагивающих и активирующих FGFR1. Так, J.C. Lee с коллегами в 2015-2016 гг. сделали серию экспериментов, демонстрирующих наличие в 40-42% ФМО химерных генов *FN1-FGFR1*, реже *FN1-FGF1* (*FN1* - фибронектин) [54, 55]. В 2023 году Х. Liu с соавт. описали крупную серию 76 случаев ФМО, где подробно изучили варианты химерных генов, в том числе *FN1*, *FGFR1*, *FGF1*, *FGFR2* [56]. Для других опухолей, в которых отсутствуют химерные гены, была показана экспрессия белка Klotho (*KL*), который является активирующим ко-фактором к рецептору FGFR1, и далее были найдены хромосомные перестройки, приводящие к активации экспрессии *KL* в опухоли [57, 58]. Тем не менее остаются ФРФ-23-секретирующие опухоли, в которых не обнаружены ни химерные гены, ни экспрессия Klotho, и механизм секреции неясен. Известны попытки блокирования экспрессии ФРФ-23 путем ингибирования рецептора FGFR1, однако они находятся в стадии разработки. Одним из ограничений пан-ингибиторов рецепторов к ФРФ, например BGJ398/infigratinib (pan-FGFR tyrosine kinase), являются побочные эффекты. Ведутся разработки селективных ингибиторов рецепторов ФРФ [1].

Таким образом, ФМО — это орфанное заболевание, которое поздно диагностируется. Все еще существует значительный процент опухолей, которые не удастся обнаружить. Развитие хирургических методов не стоит на месте, и опухоли, которые раньше были «неоперабельны» становятся

доступны для резекции. В настоящее время консервативная терапия улучшает качество жизни, состояние костной и мышечной массы благодаря возмещению дефицита фосфора и витамина D. Однако отсутствует патогенетическая терапия заболевания. Учитывая сложность диагностики, крайне малочисленные описания клинических случаев в России, ограничение возможностей визуализирующих тестов, отсутствие патогенетической терапии у пациентов с гипофосфатемической остеомалацией, необходимы новые исследования. Изучение эндокринных, клинико-лабораторных проявлений заболевания, оценка методов лечения и диагностических возможностей визуализирующих тестов, а также исследование транскриптного профиля ФРФ-23-продуцирующих опухолей представляются актуальными задачами настоящей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Условия проведения

Исследование проводилось на базе Государственного научного центра Российской Федерации ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России (ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, директор — член-корреспондент РАН Н.Г. Мокрышева). Сбор пациентов осуществлялся в отделении «Остеопороза и остеопатий» (зав. отделением — д.м.н. Ж.Е. Белая). Оперативное лечение проводилось на базе ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, а также ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова». Лабораторные исследования проводились в клинко-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. лабораторией — к.м.н. Л.В. Никанкина). МРТ, МСКТ выполнялись в отделении компьютерной и магнитно-резонансной томографии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (руководитель — к.м.н. Н.В. Тарбаева). Радионуклидные методы исследования (сцинтиграфия всего тела с ^{99m}Tc -тектротид, совмещенная с ОФЭКТ/КТ) проводились в отделении радионуклидной диагностики ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (руководитель — М.В. Дегтярев). Морфологические исследования осуществлялись в отделе фундаментальной патоморфологии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. отделом — д.м.н., проф. А.Ю. Абросимов). Генетические исследования проводились в лаборатории общей, молекулярной и популяционной генетики на базе ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. лабораторией — д.б.н. С.В. Попов). Биоинформатический анализ осуществлялся Девятияровым Русланом Мансуровичем и Гусевым Олегом Александровичем. Исследование

проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией и утвержденным протоколом Комитета по этике ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (Москва, Россия; протокол № 1 от 25.01.2017). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в процедурах, использование их биологического материала, обработку персональных данных до того, как они приняли участие в исследовании. Тема исследования утверждена Ученым советом ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

2.2 Критерии соответствия

Согласно поставленным цели и задачам в исследовании выделено 4 части, а дизайн представлен на рисунке 1. Всего в работу включено 180 человек, из них с нарушением обмена фосфора $n = 101$ (в том числе с гипофосфатемией, обусловленной ФРФ-23-опухолью, $n = 44$; гипофосфатемией, обусловленной иными заболеваниями, $n = 33$; гиперфосфатемией, ассоциированной с акромегалией, $n = 24$) и группа сравнения (здоровые добровольцы, подобранные по полу и возрасту (критерий подбора по возрасту ± 2 года, из числа сотрудников и обучающихся ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России), $n = 79$). Характеристики включенных выборок сведены в таблице 1. В исследовании участвовали пациенты, находящиеся на стационарном и амбулаторном лечении в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России в период с 2016 по 2024 год. Источниками информации являлись данные обследования и анкетирования пациентов, а также медицинская документация (истории болезней и амбулаторные карты).

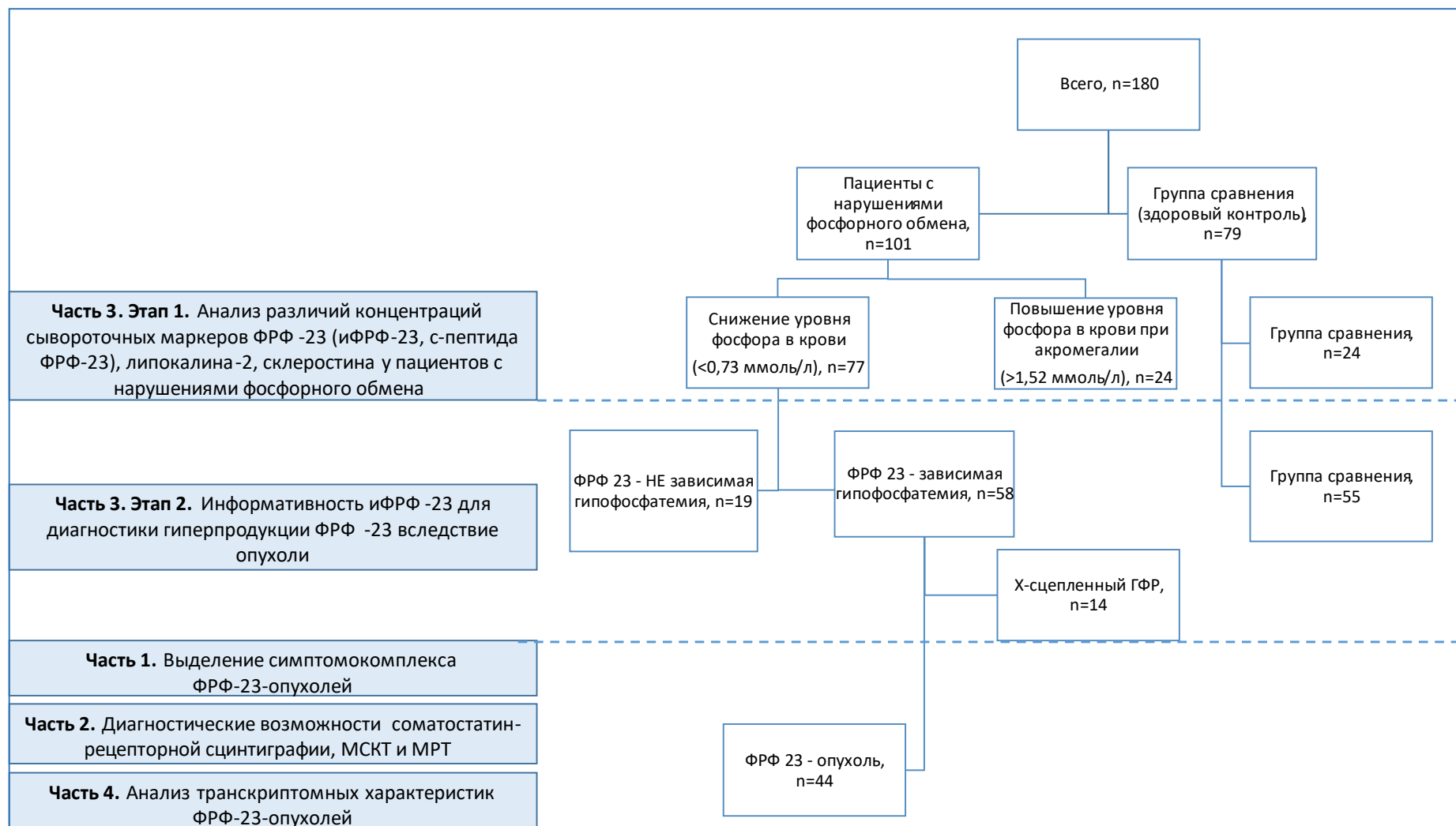


Рисунок 1 — Формирование групп исследования. Всего в работу включено 180 человек, из них пациенты с нарушениями обмена фосфора $n = 101$ и группы сравнения $n = 79$

Таблица 1 — Характеристика исследования

Часть исследования	Выборка и способ формирования	Методы и число обследованных пациентов	Критерии включения	Критерии исключения	Тип исследования
Часть 1. Выделение симптомокомплекса опухолевой секреции ФРФ-23	Пациенты с ФРФ-23-опухолью, n = 44; сплошной набор	Клиническое обследование, n = 44; Лабораторные методы, n = 44; Морфологическое исследование, n = 33 (исследованы удаленные опухоли) Методы лечения, n = 44	Пол: мужчины и женщины. Возраст старше 18 лет. Диагноз: «Фосфопеническая форма остеомалиции опухолевого генеза» (E83.3 Нарушения обмена фосфора и фосфатаз в соответствии с МКБ-10). Диагноз устанавливался на основании стойкого снижения уровня фосфора в сочетании со сниженным уровнем индекса тубулярной реабсорбции фосфатов при условии исключения всех иных причин гипофосфатемии (S. M. Jan de Veur с соавт., 2022)	Беременность и период грудного вскармливания. Тяжелые, угрожающие жизни состояния, в том числе алкалоз, ацидоз, передозировка инсулина, декомпенсированный сахарный диабет, синдром «голодных костей», рефидинг-синдром, цирроз, острая почечная и печеночная недостаточность, острые инфекции; заболевания крови. Гипофосфатемическая остеомалиция, вызванная нарушениями абсорбции фосфора в ЖКТ: алкоголизм, мальабсорбция, прием антацидов, дефицит питания. Гипофосфатемическая остеомалиция, вызванная потерями фосфора с мочой: синдром Фанкони, первичный гиперпаратиреоз; наличие подтвержденных генетических заболеваний, приводящих к нарушению уровня ФРФ-23 и фосфора. Лекарственная гипофосфатемия, в том числе вызванная внутривенным введением препаратов железа	Активное, проспективное (до операции и через 12 месяцев), несравнительное исследование

Продолжение таблицы 1

Часть 2. Диагностические возможности сцинтиграфии с применением РФП на основе октреотида ^{99m} Tc-Tektrotyd и ОФЭКТ/КТ, МСКТ и МРТ, относительно референса заключительного диагноза гистологической верификацией	1) См. часть 1, n = 44; 2) Пациенты с подозрением на ФРФ-23-опухоль, n = 4, у которых позже была подтверждена генетическая причина избытка ФРФ-23 (X-сцепленный гипофосфатемический рахит), сплошной набор	Инструментальные методы, n = 48	1) См. часть 1 2) Пол: мужчины и женщины. Возраст старше 18 лет. Синдром гипофосфатемии и генетически подтвержденный диагноз «X-связанный гипофосфатемический рахит».	1) См. часть 1 2) Беременность и период грудного вскармливания. Тяжелые, угрожающие жизни состояния, острая почечная и печеночная недостаточность, острые инфекции	Активное, одномоментное
Часть 3. Этап 1. Анализ различий белков, обладающих эндокринной и паракринной функцией в сыворотке крови у пациентов с различными нарушениями обмена фосфора	Произвольная подгруппа выборки части 1, n = 24	Лабораторное исследование концентраций сывороточных маркеров ФРФ-23, липокалин-2, склеростин, n = 72. Анализ выполнен пациентам, соответствующим по полу и возрасту между тремя группами	См. часть 1	См. часть 1	Одномоментное, сравнительное

Продолжение таблицы 1

	Пациенты с гиперфосфатемией, ассоциированной с акромегалией, n = 24; подбор по полу и возрасту. Критерий подбора по возрасту \pm 2 года		Пол: мужчины и женщины. Возраст старше 18 лет. Повышение уровня фосфора крови $> 1,5$ ммоль/л. Подтвержденный диагноз «Акромегалия» (код E22.0 в соответствии с МКБ-10), активная стадия заболевания. Диагноз устанавливался на основании повышения ИФР-1 (согласно возрастному диапазону) и отсутствия подавления секреции СТГ менее 1,0 нг/мл в ходе перорального глюкозотолератного теста (И.И. Дедов, 2013)	Беременность и период грудного вскармливания. Тяжелые, угрожающие жизни состояния, острая почечная и печеночная недостаточность, острые инфекции	
	Группа сравнения, n = 24; подбор по полу и возрасту, критерий подбора \pm 2 года. Источник – сотрудники и обучающиеся ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ.		Пол: мужчины и женщины; Возраст старше 18 лет		
Часть 3. Этап 2. Диагностические возможности ФРФ-23 для выявления опухоли	См. часть 1	Исследование концентраций сывороточного маркера ФРФ-23, n = 132	См. часть 1	См. часть 1	Одномоментное, сравнительное

Продолжение таблицы 1

	Пациенты с гипофосфатемией, без ФРФ-23-опухоли, n = 33; сплошной набор		Пол: мужчины и женщины. Возраст старше 18 лет. Подтвержденный генетически диагноз «Х-связанный гипофосфатемический рахит». Синдром гипофосфатемии, вызванный нарушениями поступления и абсорбцией фосфора в ЖКТ; первичным гиперпаратиреозом; потерями фосфора с мочой из-за синдрома Фанкони, лекарственная гипофосфатемия	Беременность и период грудного вскармливания. Тяжелые, угрожающие жизни состояния, острая почечная и печеночная недостаточность, острые инфекции. Диагноз «Фосфопеническая форма остеомалиции опухолевого генеза»	
	Группа сравнения, n = 55; подбор по полу, возрасту. Критерий подбора по возрасту \pm 2 года. Источник – сотрудники и обучающиеся ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ.		Пол: мужчины и женщины; Возраст старше 18 лет	Беременность и период грудного вскармливания. Тяжелые, угрожающие жизни состояния, острая почечная и печеночная недостаточность, острые инфекции	
Часть 4. Анализ транскриптомных характеристик ФРФ-23-опухолей	Подгруппа выборки части 1, n = 8, анализ выполнен пациентам, согласившимся на исследование	Высокопроизводительное параллельное секвенирование, n = 8.	См. часть 1	См. часть 1	Одномоментное, несравнительное

2.3 Клиническое обследование пациентов

Всем пациентам с диагностированной ФРФ-23-секретирующей опухолью проводилось обследование.

Анализируемые показатели:

1. Общие характеристики пациентов. Возраст, пол, время от появления симптомов заболевания до установления диагноза (в годах) поздней диагностикой считалось более 2-х лет от момента появления симптомов, рост, вес, ИМТ.

2. Качество жизни. Проводилось анкетирование пациентов. Использовался Европейский опросник оценки качества жизни (European Quality of Life Questionnaire) (EQ-5D) (см. Приложение А), где 3 балла означали «выраженные нарушения», 2 балла — «умеренные нарушения», 1 балл — «нет нарушений». EQ5D — общий опросник здоровья и использовался для оценки КЖ. Опросник состоит из 5 разделов и описывает проблемы, связанные с D1 — перемещением индивидуума в пространстве, D2 — уходом за собой, D3 — привычной повседневной деятельностью, D4 — определением наличия боли или дискомфорта, D5 — наличием депрессии. Каждый раздел оценивался в зависимости от степени выраженности проблемы: 1 — нет нарушений, 2 — есть умеренные нарушения, 3 — есть выраженные нарушения. В результате каждый пациент получал свой профиль качества жизни, например: 22331. Теоретически было возможно получение 245 вариантов состояний здоровья. Определялся индивидуальный EQ-5D-индекс, согласно таблице, составленной по результатам опроса репрезентативной выборки европейской и азиатской популяции. EQ-5D-индекс определяется от состояния полного здоровья, принятого за «1», до состояния смерти, принятого за «0». Однако некоторые состояния здоровья оценивались респондентами «хуже смерти», поэтому имели отрицательные значения [59]. Оценку КЖ проводили исходно и через 12 месяцев в случае радикального хирургического лечения с ремиссией. Интерпретация эффективности лечения по индексу EQ-5D проводилась в соответствии с его градацией: минимальное клинически значимое изменение индекса EQ-5D соответствовало разнице

показателей до и после лечения, равной 0,1. $\Delta EQ-5D < 0,1$ означало отсутствие эффекта; $0,1 \leq \Delta EQ-5D \leq 0,24$ — минимальный эффект; $0,24 \leq \Delta EQ-5D < 0,31$ — удовлетворительный эффект; $\Delta EQ-5D \geq 0,31$ — выраженный эффект.

3. Оценивалась визуальная аналоговая 10-балльная шкала боли (ВАШ) (см. Приложение А). Выраженным болевым синдромом считалось 8 баллов и выше.

4. Оценка локализация опухоли и наличия симптомов, связанных с локализацией опухоли (прорастание в окружающие ткани).

5. Оценка состояния мышечной ткани:

- физикальный осмотр: фиксация участков гипо-/гипертрофий;
- диагностику саркопении выполняли с помощью методики, рекомендованной Европейской рабочей группой по изучению саркопении EWGSOP [32]. Оценивали мышечную массу, силу и работоспособность. Снижение только мышечной силы скелетной мускулатуры свидетельствовало о высокой вероятности наличия у пациента саркопении (probable sarcopenia — предполагаемая саркопения). Для подтверждения диагноза необходимо было сочетание снижения мышечной силы скелетной мускулатуры и ИАСМ – индекса аппендикулярной скелетной мускулатуры. Одновременное снижение ИАСМ, мышечной силы и работоспособности скелетной мускулатуры свидетельствовало о наличии тяжелой саркопении;

- *анализ силы мышц*: силу мышц определяли с помощью кистевого динамометра с ручным захватом (Kern&Sohn, Германия). Измерения выполнены на обеих руках. За результат принимали среднее значение трех последовательных измерений. Нормальной величиной мышечной силы считали: для мужчин — более 27 кг, для женщин — более 16 кг;

- *анализ функции мышц*: работоспособность оценивалась с помощью теста с ходьбой на короткое расстояние (4 м). Под нормальной работоспособностью мышц понимали скорость ходьбы не менее 0,8 м/с как для мужчин, так и для женщин;

— *анализ массы мышц* — оценка индекса тощей массы (ИТМ) скелетных мышц с помощью денситометрии. Для оценки массы скелетных мышц использовали рентгеновскую денситометрию с оценкой индекса скелетных мышц (ASMI) в кг/м². Нормальной величиной считали: для мужчин — более 7,25 кг/м², для женщин — более 5,45 кг/м²;

— оценка субъективных симптомов, а именно слабость мышц (опросник по баллам) Mean Fatigue score (General Fatigue, Strong Fatigue, Fatigue Severity, Fatigue Interference).

6. Оценка состояния костной ткани:

— физикальный осмотр (рост, деформация скелета);

— оценка субъективных симптомов, а именно боль (опросник ВАШ);

— оценка наличия переломов, количество, степень, локализация псевдопереломов и степени их заживления (рентгенологически), снижение в росте за жизнь (в см);

— оценка минерализации костей (минеральная плотность костной массы, T/Z-score, TBS) на аппарате GE iDXA.

7. Оценка консервативной терапии: прием препаратов активных метаболитов витамина D, нативный витамин D, соли фосфора и кальция, дозы, длительность приема.

8. В случае хирургического лечения оценивались: степень резекции (широкая, краевая, выскабливание), наличие местных рецидивов, отдаленных метастазов, повторные операции.

9. Биохимической ремиссией считалось отсутствие гипофосфатемии в течение 3 месяцев.

2.4 Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования проводились в клинико-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. лабораторией — к.м.н. Л.В. Никанкина).

Забор крови проводился из кубитальной вены натошак. Биохимические параметры крови натошак (неорганический фосфор сыворотки (референсный интервал (РИ) 0,74-1,52 ммоль/л), общий кальций в сыворотке крови (РИ 2,15-2,55 ммоль/л), альбумин (РИ 34-48 г/л), ЩФ (РИ 40-150 ед/л), креатинин (РИ 63-110 мкмоль/л)) определяли на автоматическом биохимическом анализаторе ARCHITECT с8000 (Abbott, США). Расчет кальция, скорректированного на альбумин, производился по формуле: измеренный уровень кальция плазмы (ммоль/л) + $0,02 \cdot (40 - \text{измеренный уровень альбумина плазмы (г/л)})$. Расчет показателя СКФ проводился с учетом возраста и показателя креатинина сыворотки по формуле СКД-EPI. Гормональный анализ крови с определением иПТГ (РИ 15-65 пг/мл), остеокальцина (РИ 14-46 нг/мл), С-концевого телопептида коллагена 1-го типа (Сtx) (РИ 0,1-0,85 нг/мл), инсулино-подобный фактор роста набором Mediagnost E20 (РИ 16-245 нг/мл) выполнен на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas 6000 (Roche, Германия). Исследовали показатели, которые не использовались для диагностики заболеваний: гормональный анализ с оценкой интактного ФРФ-23 выполнен с использованием набора Biomedica-20700 (Медиана (Ме) концентраций у здоровых индивидуумов в сыворотке крови 14,8 пг/мл), с-пептида ФРФ-23 набор Biomedica-20702 (Ме концентраций у здоровых индивидуумов в сыворотке крови 0,8 пмоль/л), склеростин набор Biomedica BI-20492 (Ме концентраций у здоровых индивидуумов в сыворотке крови 24,14 пмоль/л), липокалин-2 2-м набором Biovendor RD191102200R (Ме концентраций у здоровых индивидуумов в сыворотке крови зависит от возраста и пола в пределах 39-70 нг/мл) методом иммуноферментного анализа. Анализ 25-гидроксивитамина D (25(OH)D) выполнен с использованием LIAISON XL (DiaSorin). В моче концентрации фосфора, креатинина оценены с помощью анализатора Abbott ARCHITECT. Расчет индекса тубулярной реабсорбции фосфатов производился по формуле:

$$\left[1 - \left(\frac{\text{фосфор разовой мочи (ммоль/л)}}{\text{креатинин разовой мочи (ммоль/л)}} \right) \times \left(\frac{\text{креатинин плазмы либо сыворотки (ммоль/л)}}{\text{фосфор плазмы либо сыворотки (ммоль/л)}} \right) \right] \times 100, \quad (3)$$

2.5 Инструментальные методы исследования

Пациентам проводился поиск опухолей путем функциональной визуализации с помощью сцинтиграфии всего тела с мечеными технецием-99m аналогами соматостатина (99mTc — Тектротид — чувствительность к SSTR2a/b и SSTR5, в меньшей мере к SSTR3), дополненной ОФЭКТ/КТ зоны интереса в условиях ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России на базе отдела радионуклидной диагностики (заведующий отделением — Дегтярев Михаил Владимирович). Также выполнялись лучевые методы обследования: МРТ и МСКТ проводились пациентам в условиях ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России на базе отдела лучевой диагностики (заведующая отделением — к.м.н., Тарбаева Н.В.).

Количественная оценка состояния костной ткани оценивалась в поясничных позвонках (L1-L4), проксимальном отделе бедра (шейке бедра (Neck), в целом в бедре (Total Hip) с использованием двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA) на аппаратах GE iDXA (США). Минеральная плотность костей (МПК) оценивалось по T-score (у женщин в постменопаузе и мужчин старше 50 лет) или Z-score (у женщин в пременопаузе и у мужчин моложе 50 лет). Дополнительные инструментальные методы обследования проводились в зависимости от конкретной клинической ситуации.

2.6 Морфологическое исследование

Материал удаленных ФРФ-23-опухолей был пересмотрен в отделе фундаментальной патоморфологии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (заведующий отделом — д.м.н., профессор А.Ю. Абросимов).

Гистологический диагноз ФМО был установлен в соответствии с критериями классификации ВОЗ, диагноз «фосфатурическая мезенхимальная опухоль» был подтвержден пересмотром препаратов двумя опытными патологами. Операционный материал (срезы с парафиновых блоков, окрашенные гематоксилином и эозином) оценен при помощи микроскопии. При необходимости производились серийные срезы.

2.7 Высокопроизводительное параллельное секвенирование и биоинформатический анализ

Высокопроизводительное параллельное секвенирование проводилось в лаборатории общей, молекулярной и популяционной генетики на базе ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. лабораторией — к.б.н. С.В. Попов).

Проводилось секвенирование тотальной РНК, выделенной из опухолевой ткани и из окружающей костной ткани, а также проведено секвенирование РНК единичных клеток. Забор биоматериала в ходе хирургического вмешательства проводился в пробирки типа «вакутайнер». В качестве консерванта использовался раствор RNA later. Тотальную РНК выделяли с использованием коммерческих реагентов (TRIzol, Invitrogen). Качество РНК проверяли с помощью биоанализатора Agilent 2100 на RIN >7 и хранили в RNA later. Далее по 5 мкг для каждого образца, представленного для создания библиотек polyA PE RNAseq. Библиотеки были секвенированы на HiSeq2500 (Illumina) в режиме высокой производительности.

Анализ качества необработанных прочтений RNAseq осуществлялся с помощью FastQC версии 0.11.5. Прочтения далее были триммированы с помощью Trimmomatic-0.38 с использованием последовательностей адаптеров и рРНК. Очищенные прочтения были выравнены на первичные хромосомы сборки генома hg38 UCSC с помощью Hisat2 v2.1.0 и подсчитаны с помощью HTSeq v2.0.1 относительно базовой аннотации Gencode v43. Дальнейшую нормализацию FPKM,

ТММ и анализ дифференциальной экспрессии проводили в пакете edgeR v3.42.2 для R. Для анализа дифференциальной экспрессии использовали четыре контрольных образца (Control 1-4), которые сравнивали с пятью опухолевыми образцами PMT (PMT 1-5). Дифференциально экспрессированные гены (DE-гены: $FDR < 0,05$, $|\log FC| > 2$) использовались для поиска значимо измененных сигнальных путей с помощью пакета clusterProfiler v4.8.1 для R. Для анализа SNP de novo все отфильтрованные прочтения выравнены с помощью STAR-2.7.10b на эталонную сборку hg38v0. Дублированные прочтения удалены с помощью Picard (MarkDuplicates v3.0.0) и обработаны с помощью конвейера GATK v4.4.0.0 (BaseRecalibrator, ApplyBQSR, HaplotypeCaller). Предполагаемая регуляторная роль обнаруженных вариантов проверена с помощью ADAstra v5.1.2. Химерные гены идентифицированы с помощью FuSeq v1.1.4 с использованием параметров по умолчанию и моделей генов GRCh37.75 в качестве референса.

2.8 Методы лечения

В лечении ФРФ-23-секретирующих опухолей выделяют 2 основных метода: медикаментозный и хирургический [23]. Приоритетным методом в настоящее время является хирургическое удаление опухоли. В качестве консервативного лечения в данной работе изучалось применение афакальцидола — природный метаболит 1-альфа, 25-дигидроксивитамина D3 (кальцитриол) — активной формы витамина D; колекальциферола — витамин D3; препаратов солей фосфора калия дигидрофосфата, натрия двухосновной фосфата.

Все пациенты, включенные в исследование, получали альфакальцидол и колекальциферол в качестве первичного лечения. Доза препарата подбиралась индивидуально, под контролем уровня фосфора в сыворотке крови с кратностью 1 раз в месяц. Стартовая доза у пациентов нашего исследования составляла 0,5 мкг/сут., при необходимости интенсификации терапии повышение дозы проводилось на 0,5 мг еженедельно. Оптимальной считалась минимальная доза, на фоне приема которой нормализовывался уровень фосфора в крови и

регрессировали клинические симптомы, при условии хорошей переносимости. Некоторым пациентам потребовалось назначение калия дигидрофосфата, натрия двухосновного фосфата.

В случаях обнаружения опухоли и отсутствия противопоказаний пациентам проводилось хирургическое лечение. Оперативное вмешательство с целью удаления опухоли выполнялось в специализированном стационаре, в зависимости от расположения опухоли в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, в ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова».

2.9 Статистический анализ данных

Анализ данных производился в пакете статистических программ IBM SPSS Statistics Base (SPSS, США). Для анализа распределения использованы критерии Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Описательная статистика: количественные признаки представлены в виде медианы и 1-го, 3-го квартилей (Me [Q1; Q3]). Качественные параметры представлены в виде абсолютных (n) и относительных (%) частот. Для межгрупповых сравнений по количественным признакам для трех независимых выборок использованы непараметрические варианты однофакторного дисперсионного анализа: тест Краскела-Уоллиса и для выявления различий между двумя группами — критерий Манна-Уитни. Для межгрупповых сравнений по качественным признакам использован двухсторонний точный критерий Фишера. Для сравнения параметров в зависимых выборках использовался критерий Вилкоксона (W-тест). Имеющиеся пропуски в данных не заполнялись с целью избежать статистического смещения результатов. Для устранения эффекта множественных сравнений применялась поправка Бонферрони. При применении поправки на множественные сравнения значения p более чем порог статистической значимости, но менее 0,05 рассматривались как тенденция к статистической значимости. Для оценки диагностических

возможностей теста использовался ROC-анализ с оценкой AUC (площадь под ROC-кривой), диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР) и прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР). Отрезная точка выбиралась с помощью критерия Юдена (разность суммы ДЧ и ДС и единицы должна была быть максимальной для данной точки). Для выполнения ROC-анализа был использован пакет прикладных программ SPSS Statistics v. 17.0 (SPSS: An IBM Company, США). Доверительные интервалы частот рассчитывались с помощью онлайн-калькулятора JavaStat (<https://statpages.info/ctab2x2.html>). Различия считали значимыми при значениях p менее 0,05. Биоинформатический анализ и иллюстрации к нему подготовлены Девятияровым Русланом Мансуровичем и Гусевым Олегом Александровичем.

2.10 Источник финансирования

Государственное задание № НИОКТР 124020700097-8 (Новые технологии диагностики и дифференциальной диагностики первичного и вторичного остеопороза на фоне эндокринопатий и орфанных заболеваний скелета). Клиническая апробация метода соматостатин-рецепторной сцинтиграфии в режиме ОФЭКТ для топической диагностики опухолей, секретирующих ФРФ-23, и ассоциированной онкогенной остеомалации у пациентов взрослого возраста 2019-15-4.

2.11 Этическая экспертиза

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, выписка из протокола № 17 от 28.10.2020 г.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Клинико-лабораторные характеристики пациентов с ФРФ-23- продуцирующей опухолью

3.1.1 Характеристики пациентов

В период с 2016 по 2024 год в исследование включено 44 пациента с диагнозом фосфопеническая остеомалиция опухолевого генеза. Опухоль выявлена у 37 человек (84%), 33 (89%) из которых подверглись хирургическому лечению, 27 (82%) достигли ремиссии (рисунок 2).

Общие характеристики пациентов суммированы в таблице 2. Медиана (Ме [Q1;Q3]) возраста составила 46 [37; 62] лет, время от появления симптомов до установления диагноза составила 6 [2; 10] лет (мин. 2; макс. 24 года). Распределение по полу составило 1:1,3. Выборка репрезентативна и соответствует литературным данным [1,9].

В процессе оценки интенсивности болевого синдрома большинство испытуемых называли высокие дескрипторы боли: 42/44 (95%) указывали на интенсивность боли 5 баллов и выше, а 35/44 (80%) — 8 баллов и выше (рисунок 3). Без помощи средств опоры могли передвигаться только 6/44 (14%) (рисунок 4). Качество жизни (КЖ) пациентов оценивалось с помощью опросника и расчета индекса EQ-5D. Исходно, в группе обследованных до лечения медиана индекса EQ-5D составила -0,074. Это означает, что пациенты оценивали свое качество жизни как крайне изнуряющее, так как значения индекса могут варьироваться от 1 (полное здоровье) до 0 (смерть), а также могут принимать отрицательные значения («хуже смерти») [59].

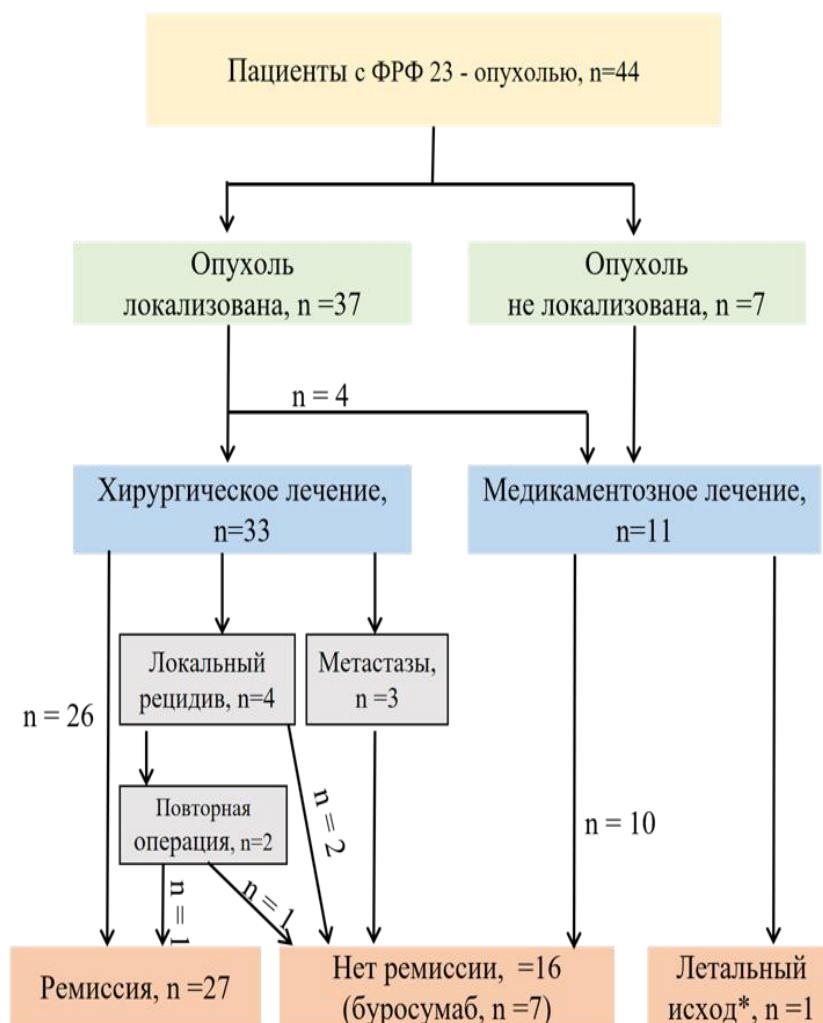


Рисунок 2 — Распределение пациентов в ходе исследования. Наблюдалось 44 пациента, 27 из них достигли стойкой ремиссии

Примечание: *летальный исход из-за дыхательной недостаточности, развившейся вследствие выраженных деформаций грудной клетки. Опухоль диагностирована в подколенной области. Подтверждено при вскрытии.

Таблица 2 — Характеристики пациентов, n = 44. Распределение показателей представлены в виде Me [Q1; Q3]

Показатель	Все пациенты (n = 44)
Возраст, года	46 [37; 62]
Пол Ж(%) : М(%)	57 : 43
Рост, см	158 [148; 166]
Вес, кг	76 [51; 85]
ИМТ	29 [22; 34]
Длительность заболевания, года	6 [3; 10]
Фосфор сыворотки, ммоль/л, РИ: 0,74-1,52	0,49 [0,40; 0,57]
Общий кальций сыворотки, ммоль/л, РИ: 2,15-2,55	2,31 [2,21; 2,45]
Креатинин сыворотки, мкмоль/л, РИ: 50-98	65 [58; 72]
25-гидроксивитамин D, нг/мл, РИ: > 30 нг/мл	28 [20; 36]
С-концевой телопептид, нг/мл	0,60 [0,42; 0,93]
Остеокальцин, нг/мл, РИ: 15-46	21 [15; 33]
ПТГ, пг/мл, РИ: 15-65	55 [40; 108]
Щелочная фосфатаза, Ед/л, РИ: 40-150	185 [120; 299]
Фосфор разовой мочи, ммоль/л, РИ: 12,9-43,9	21 [14; 33]
СКФ (ЕРІ), РИ: >60 мл/мин/1,73 м ²	102 [85; 112]
Индекс реабсорбции фосфатов, %, РИ: 85-95%	63 [52; 74]



Рисунок 3 — Интенсивность боли по ВАШ до операции (n = 44)

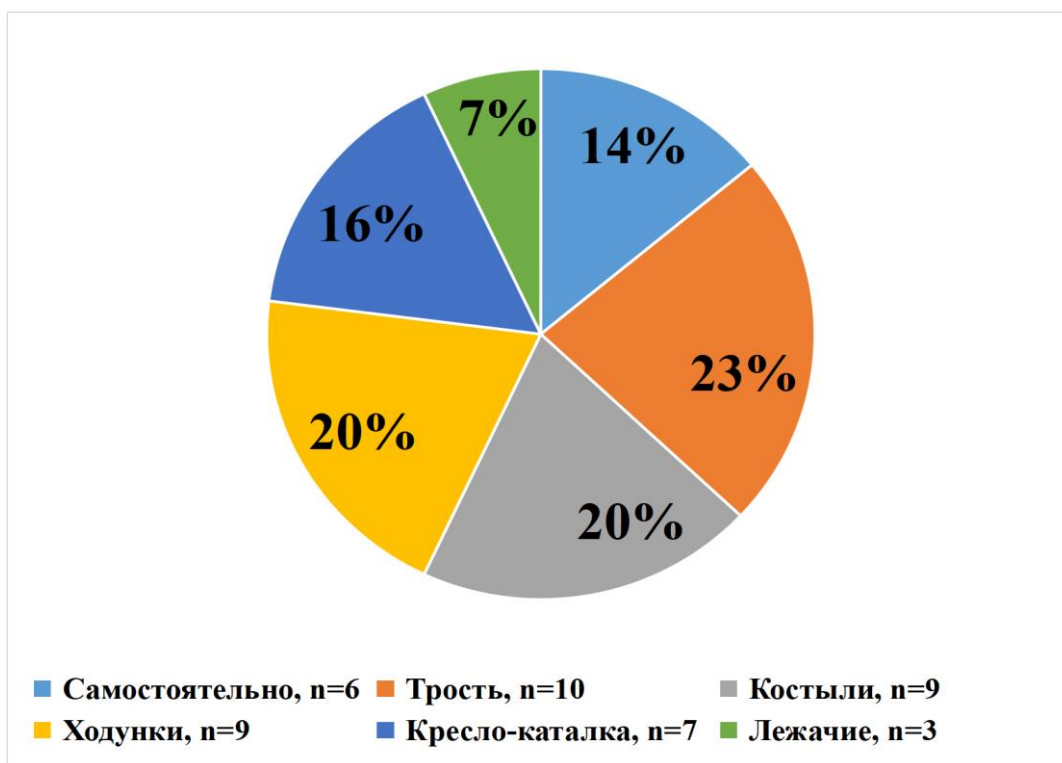


Рисунок 4 — Мобильность при передвижении до операции (n = 44)

У всех пациентов исходно были диагностированы переломы и снижение в росте. У 15 пациентов (34%) выявлены псевдопереломы. Медиана переломов на одного пациента составила 14 [10; 20]. Локализация и частота переломов представлены на рисунке 5, причем чаще всего фиксировались переломы позвонков, ребер, шейки бедренной кости и костей таза.

Согласно данным рентгеновской денситометрии, у пациентов старше 50 лет ($n = 16$) не наблюдалось выраженного снижения минеральной плотности костей: медиана по Т-критерию составила -0,9 в позвоночнике и -2,1 в шейке бедренной кости. Медиана трабекулярного костного индекса составляла 1,285 и была ниже нормы (1,310) (таблица 3).

Исходно низкая работоспособность скелетной мускулатуры, оцененная с использованием NIH Toolbox 4 Meter Walk Gait Speed Test, выявлена у 40/44 (91%) пациентов. Снижение мышечной силы, согласно данным кистевой динамометрии, т.е. предполагаемая саркопения, была выявлена у 10 пациентов. У одного, по данным рентгеновской денситометрии с расчетом индекса ASMI, выявлена саркопения.

Таким образом, по результатам работы выявлен комплекс характерных особенностей для пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями: возраст манифестации 46 [37; 62] лет, поздняя диагностика, наличие множественных переломов, выраженного болевого синдрома, необходимость использовать при передвижении средства опоры, низкое качество жизни (медиана балла EQ5D оценена ниже «0» -0,074). Выявление совокупности данных характеристик свидетельствует о высокой вероятности наличия патологии опорно-двигательного аппарата и требует проведения лабораторных тестов со скринингом уровня фосфора в крови для исключения ФРФ-23-секретирующей опухоли.

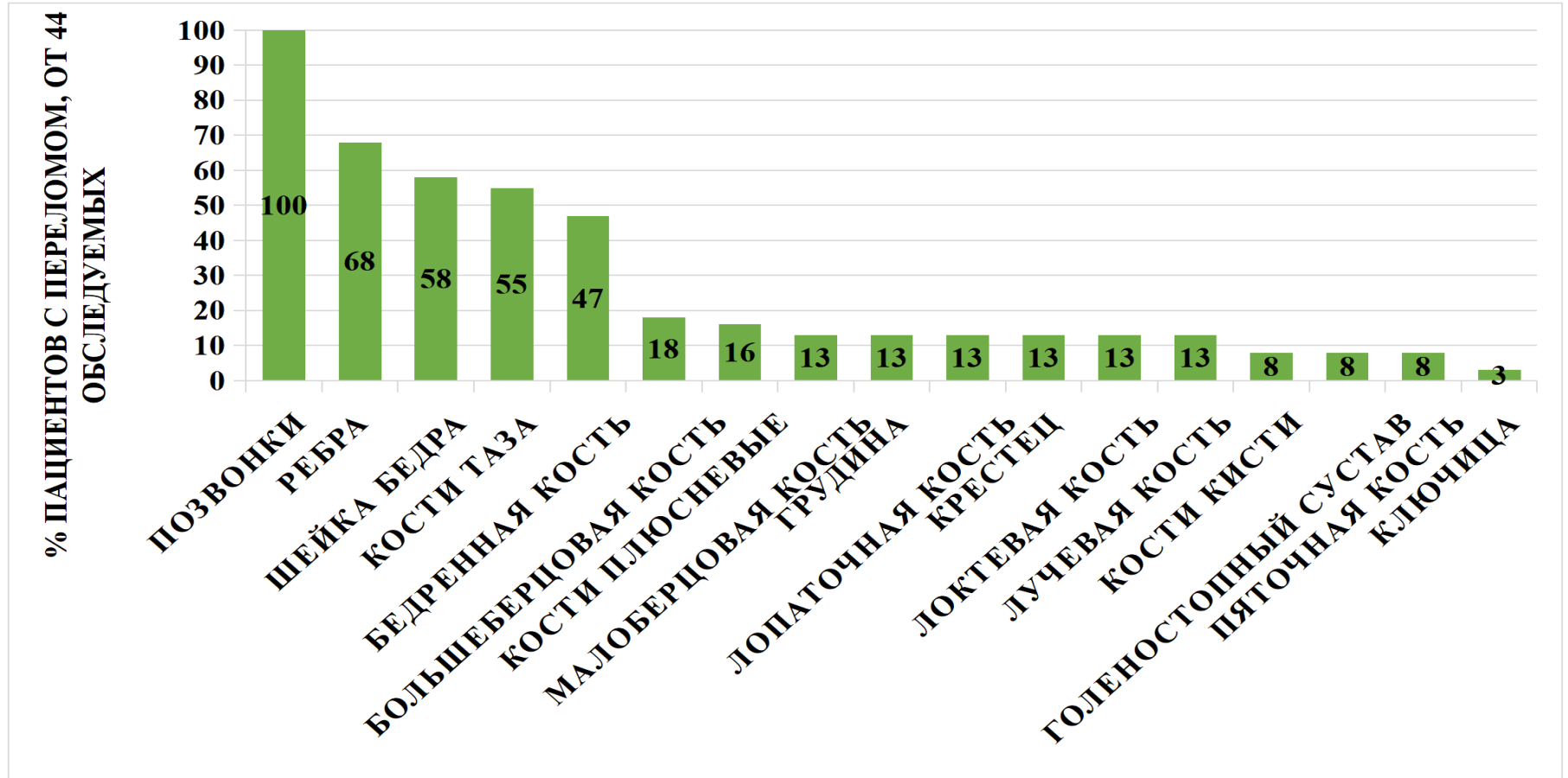


Рисунок 5 — Локализация переломов у пациентов с ФРФ-23-опухолью (n = 44)

Таблица 3 — Данные рентгеновской денситометрии у пациентов старше 50 лет, (n = 16)

Показатель	Исходно Me [Q1;Q3]
МПК L1-L4, T-score (n = 16)	-0,9 [-2,2; 0]
МПК Femur Neck, T-score (n = 16)	-2,1 [-3,4; -1,25]
Трабекулярный костный индекс, TBS (n = 16) > 1,31	1,285 [1,156; 1,405]

3.1.2 Лабораторные проявления паранеопластического синдрома у пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями

Лабораторные характеристики пациентов см. таблицу 2. Медиана уровней фосфора неорганического в сыворотке крови составила 0,49 [0,4;0,57], что означает гипофосфатемию; индекса реабсорбции фосфора — 63 % [52; 74], что демонстрирует выраженные потери фосфора с мочой. Не было выявлено отклонений от референсных значений уровня кальция, креатинина, остеокальцина, С-концевого телопептида (Сtx). Медиана концентрации ПТГ составила 55 [40; 108] пг/мл. Вторичный гиперпаратиреоз (ВГПТ) диагностирован у 13 пациентов (30% случаев), на фоне нормокальциемии — n = 7 (53,8%) и гиперкальциемии — n = 6 (46,2%).

Результаты анализа гормонально-биохимического обследования свидетельствуют, что у пациентов с ФРФ-23-секретирующей опухолью в крови наблюдаются гипофосфатемия, повышение щелочной фосфатазы, у 30% встречается повышение ПТГ, а индекс тубулярной реабсорбции фосфатов снижен. И все это на фоне нормокальциемии, нормального уровня креатинина крови и СКФ.

3.1.3 Исходы хирургического и консервативного лечения пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями

Хирургическое лечение проведено 33 пациентам, из них широкое иссечение в пределах здоровых тканей — у 29/33 (88%), резекция по краю опухоли — у 2/33 (6%), выскабливание — у 2/33 (6%).

Отсутствие ремиссии наблюдалось у 7/33 (21%), из них вследствие местного рецидива/остаточной опухолевой ткани — 4/7(57%) и отдаленных метастазов — 3/7(43%). Повторная операция проведена 4/7 (57%) с достижением ремиссии у 2/4(50%).

Таким образом, из 33 прооперированных пациентов биохимической ремиссии достигли 27 человек (82%) (рисунок 2).

В случае успешной операции наблюдалось восстановление уровня фосфора в течение 5-15 дней. В послеоперационном периоде отмечался возможный подъем уровня фосфора, который, вероятно, связан с активацией компенсаторных механизмов. В течение года показатели, как правило, стабилизировались и возвращались к референсным значениям.

После операции (n = 33) гистологический диагноз ФМО был установлен на основании рекомендаций Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (WHO Classification of tumors 2020 5th edition). Пример гистологических образцов в представлен на рисунке 6, опухоли характеризовались такими признаками, как мелкие, веретенообразные или звездчатые клетки 33/33 (100%), развитая капиллярная сеть 33/33 (100%), толстостенные сосуды 30/33 (91%), аморфный матрикс от гиалинизированного до нечеткого вида 30/33 (91%), гигантские клетки 29/33 (29%), реактивный остеогенез, новообразованные костные балки 18/33 (55%), грубодисперсные кальцинаты 15/33 (45%), структуры остеомалации, литические костные балки 15/33 (45%), очаги липоматоза 6/33 (18%), эпителиальные элементы 6/33 (18%), псевдокапсуда 3/33 (9%).

При анализе результатов в зависимости от объема хирургического вмешательства частота ремиссии среди тех, кому опухоль иссечена широко, в пределах здоровых тканей составила 26/29 (90%). Резекция по краю опухоли, проведенная двум пациентам, продемонстрировала неоднозначные результаты, так как только повторное вмешательство привело к ремиссии у одного пациента 1/2 (50%). Выскабливание, согласно нашим данным, к ремиссии не привело 0/2 (0%). Ремиссией считалось восстановление уровня фосфора в крови и отсутствие прогрессирования переломов.

Четверо пациентов 4/37 (11%) с выявленными опухолями не были прооперированы по следующим причинам: обнаружены метастазы ($n = 1$), операция была невозможна из-за локализации опухоли ($n = 2$), один пациент погиб до хирургического лечения ($n = 1$) от дыхательной недостаточности (из-за уменьшения объема грудной клетки и невозможности ее экскурсии).

Помимо хирургического лечения, за время исследования пациенты получали стандартную терапию препаратами альфакальцидола и колекальциферола 44/44 (100%), препаратами фосфора 29/44 (66%). Альфакальцидол пациенты получали в дозе 3,5 [3; 4] мкг/сут (мин. 1, макс. 8), а колекальциферол — 2000 [2000; 2000] МЕ/сут. Препараты фосфора в дозе 1,44 [1,44; 1,65] г/сут. (мин. 1,2, макс. 2,5). Эта терапия дала положительные результаты в виде уменьшения жалоб у большинства пациентов 40/44 (91%, 95% ДИ (83%;99%)), однако биохимическую ремиссию удалось достичь только у небольшой части пациентов 8/44 (18%, 95% ДИ (7%-30%)).

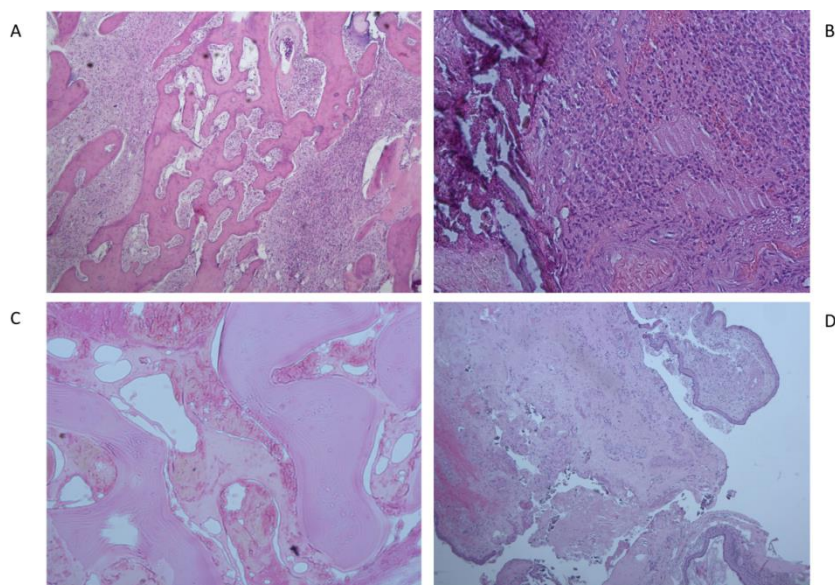


Рисунок 6 — Примеры гистологических препаратов ФМО

Примечания: (А). Фокусы новообразованной кости, напоминающие китайские иероглифы ($\times 200$). В межбалочных пространствах фиброзно-васкулярная строма с обилием мелких сосудов и фокусы опухоли, представленные пролиферацией мелких клеток, группами гигантских клеток, встречаются толстостенные сосуды. Патологическая атипия опухолевых клеток проявляется минимально. (В). В левой части препарата располагается фокус грубо дисперсного кальцината, а в правой части препарата структуры опухоли представлены мелкими клетками и толстостенными сосудами. (С). В отдельных случаях ФМО в структуре опухоли присутствует большое количество сосудов. В межбалочных пространствах миксоидная строма с расширенными сосудами. (D). Редкая локализация ФМО в височной кости. На препарате имеются фокусы эпителиальной выстилки. Опухолевая ткань без признаков цитологической атипии, представлена фиброзированной стромой с группами мелких и гигантских клеток.

3.1.4 Реабилитация пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями

Реабилитация пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями оценивалась спустя 12 месяцев ремиссии. Проводилась оценка болевого синдрома, мобильности, качества жизни, состояния костной и мышечной тканей.

Оценку болевого синдрома (с использованием шкалы ВАШ) и возможностей к передвижению проводили 27 пациентам. После достижения ремиссии у 27/27 (100%) обследуемых боль не превышала 5 баллов, а большинство говорили об отсутствии боли (1-2 балла) (рисунок 7). Передвижение без средств опоры стало возможным для 20/27 (74%) (рисунок 8).

Согласно шкале EQ-5D, был рассчитан индекс EQ-5D (таблица 4). Кроме того, была рассчитана медиана изменений (дельты Δ) индекса EQ-5D у пациентов до лечения и спустя 12 месяцев ремиссии, что составило 0,55 [0,48; 0,83] и означает выраженный эффект, согласно опроснику EQ-5D.

Состояние костной ткани изменялось. С достижением ремиссии у всех пациентов не произошло ни одного нового перелома. Отмечен прирост МПК: медиана прироста составила 1,9 в позвоночнике и 2,2 в шейке бедренной кости по T-score, у пациентов старше 50 лет (таблица 5).

Состояние мышечной ткани изменялось. После 12 месяцев ремиссии наблюдалось увеличение индекса ASMI: медиана уровня у мужчин изменялась с 9,24 [8,3; 9,74] до 11,48 [11,45; 11,51] кг/м², а у женщин — с 6,99 [6,96; 7,65] до 8,13 [7,5; 8,3] кг/м².

Таким образом, по результатам работы выявлен комплекс клинических проявлений опухолевой секреции ФРФ-23, включающие в себя сочетание наличия патологических (низкотравматичных) переломов 44/44 (100%, , 95% ДИ (93-100%)), болевого синдрома в костях 42/44 (95%, 95% ДИ (89%-100%)), низкая работоспособность скелетной мускулатуры и необходимость использовать средства опоры при передвижении 40/44 (91%, 95% ДИ (83%-99%)), что связано с гипофосфатемией 44/44 (100%, 95% ДИ (93%-100%)), низким индексом тубулярной реабсорбции фосфора 44/44 (100%, 95% ДИ (93%-100%)).

В работе показано, что хирургическое иссечение в пределах здоровых тканей ФРФ-23-секретирующих опухолей приводит к частоте ремиссии 26/29 (90%, ДИ 79%-100%). Консервативная терапия позволяет добиться уменьшения жалоб у большинства 40/44 (91%, 95% ДИ (83%-99%)), однако к биохимической ремиссии приводит у небольшой части пациентов 8/44 (18%, 95% ДИ (7%-30%)).

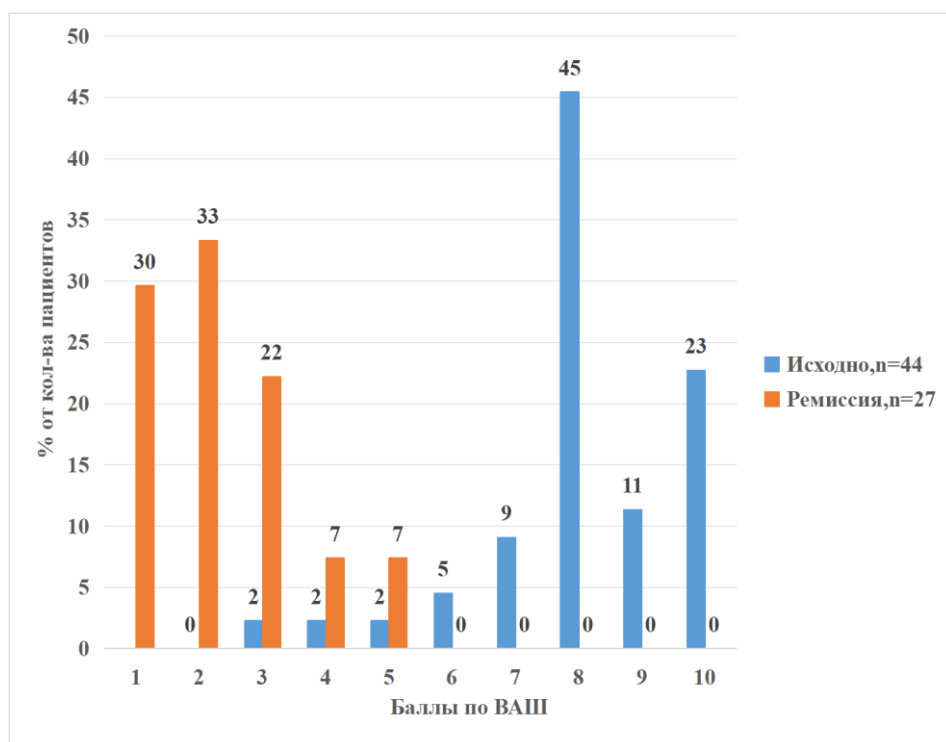


Рисунок 7 — Интенсивность боли по ВАШ до операции (n = 44) и в ремиссию (n = 27)

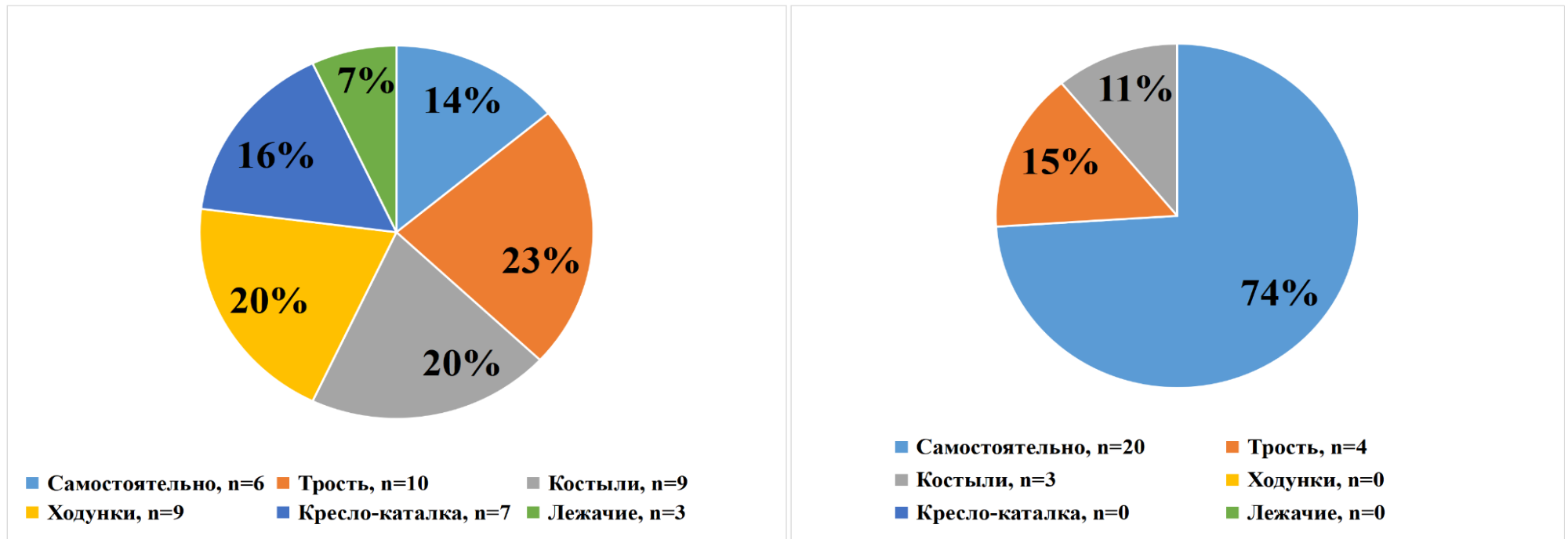


Рисунок 8 — Использование вспомогательных средств для передвижения до операции (n = 44) и в ремиссии (n = 27)

Таблица 4 — Значения опросника EQ-5D у пациентов с ФРФ-23-опухолью до лечения и в ремиссии

Группа больных	Число обследованных больных	EQ-5D-индекс, Me [Q1;Q3]
До лечения	44	-0,074 [-0,074;0,081]
Ремиссия 12 мес.	27	0,624 [0,48;0,779]

Таблица 5 — Данные рентгеновской денситометрии у пациентов старше 50 лет, n = 16

Показатель	Исходно Me [Q1;Q3]	Ремиссия Me [Q1;Q3]	P (кр. Вилкоксона)
МПК L1-L4, T-score (n = 16)	-0,9 [-2,2; 0]	1,0 [0,6; 1,7]	0,046
МПК Ferum Neck, T-score (n = 16)	-2,1 [-3,4; -1,25]	0,1 [-1,2; 1,3]	0,043
Трабекулярный костный индекс, TBS (n = 16) > 1,31	1,285 [1,156; 1,405]	1,374 [1,283; 1,577]	0,225

Примечание: в сравнениях применялась поправка Бонферрони, и значение p менее 0,016 считалось статистически значимым.

3.2 Диагностическая визуализация ФРФ-23-продуцирующих опухолей

3.2.1 Топографо-анатомические характеристики ФРФ-23-секретирующих опухолей

По данным инструментальных методов исследования оценены размер и локализация опухолей. Среди всех пациентов, включенных в исследование, опухоль найдена у 37/44 (84%) (рисунок 9). Из них в мягких тканях располагалось 14/37 (38%) опухолей, а в костях — 23/37 (62%). Размер опухолей до 1 см обнаружен у 7/37 (19%), 1-2 см — у 20/37 (54%), а более 2 см — у 10/37 (27%) пациентов.



Рисунок 9 — Локализация ФРФ-23-образований

3.2.2 Диагностические возможности методов визуализации ФРФ-23 - продуцирующих опухолей

Различные методы визуализации применяются для поиска ФРФ-23-секретирующих опухолей. В ходе работы проведен поиск ФРФ-23-опухолей с помощью методов сцинтиграфии с ^{99m}Tc -тектротидом с ОФЭКТ/КТ, МРТ с контрастированием и МСКТ с контрастированием. Из 48 включенных пациентов у 37 обнаружена ФРФ-23-секретирующая опухоль. Среди 11 пациентов у 7 пациентов опухоль не найдена, а у 4 диагностирована генетическая причина избытка ФРФ-23 (X-сцепленный гипофосфатемический рахит) в процессе предоперационного обследования, однако их данные, полученные в результате топоческой диагностики, учитывались при расчете показателей диагностической точности методов визуализации. Все 11 пациентов продолжили наблюдаться на фоне консервативной терапии с положительным эффектом.

Метод сцинтиграфии с ^{99m}Tc -тектротидом с ОФЭКТ/КТ позволил локализовать опухоль в 37 случаях, при МРТ с контрастированием — в 23 случаях, а при МСКТ с контрастированием опухоль была выявлена в 17 случаях. При этом ложная локализация была установлена при сцинтиграфии с ^{99m}Tc -тектротидом с ОФЭКТ/КТ в 1 случае, при МРТ с контрастированием — в 2 случаях, а при МСКТ — в 2 случаях, все рассчитанные параметры представлены в таблицах 6 и 7. В ходе исследования продемонстрировано, что наибольшей диагностической чувствительностью 84% (95% ДИ (79%-86%)) для визуализации ФРФ-23-продуцирующей опухоли обладает метод сцинтиграфии с применением РФП на основе октреотида ^{99m}Tc -Tektrotyd и ОФЭКТ/КТ по сравнению с МРТ (чувствительность 54% (95% ДИ (47%-57%)) и МСКТ (чувствительность 40% (35%-43%)). Прогностическая ценность трёх методов сопоставима.

Таблица 6 — Матрицы относительно окончательного диагноза: «Фосфопеническая форма остеомалиции опухолевого генеза» (Е83.3 «Нарушения обмена фосфора и фосфатаз в соответствии с МКБ-10»)

	ФРФ-23-опухоль	Нет ФРФ-23-опухоли	Сумма
Сцинтиграфия с ОФЭКТ/КТ с ^{99m}Tc-тектротидом			
Выявлено	37	1	38
Не выявлено	7	3	10
Сумма	44	4	48
Магнитно-резонансная томография с контрастированием			
Выявлено	23	2	25
Не выявлено	20	3	23
Сумма	43	5	48
МСКТ с контрастированием			
Выявлено	17	2	19
Не выявлено	26	3	29
Сумма	43	5	48

Таблица 7 — Диагностические возможности методов топической диагностики в визуализации ФРФ-23-продуцирующих опухолей

	ДЧ (95% ДИ)	ДС (95% ДИ)	ПЦПР (95% ДИ)	ПЦОР (95% ДИ)
Сцинтиграфия с ОФЭКТ/КТ с ^{99m} Tc-тектротидом	84% (79%-86%)	75% (23%-99%)	97% (92%-99%)	30% (9%-40%)
Магнитно-резонансная томография с контрастированием	54% (47%-57%)	60% (18%-93%)	92% (84%-96%)	13% (4%-20%)
МСКТ с контрастированием	40% (35%-43%)	60% (18%-93%)	90% (78%-98%)	10% (3%-16%)

3.2.3 Практическое внедрение: клинические примеры использования сцинтиграфии с ОФЭКТ/КТ с ^{99m}Tc -тектротидом для локализации ФРФ-23-опухолей

Клинический случай № 1. Пациент И., 65 лет, обратился с жалобами на боли в костях, мышечную слабость, затруднения при передвижении, бессонницу, множественные переломы. По данным лабораторного обследования выявлены: гипофосфатемия — уровень фосфора в крови 0,46 ммоль/л, снижение индекса тубулярной реабсорбции фосфатов (TRP%) 57%. Семейный анамнез относительно заболеваний скелетно-мышечного аппарата не отягощен. Признаков гиперсекреции прочих гормонов не выявлено. Проведено МРТ всего тела с контрастом — выявлено очаговое гипervasкулярное изменение в нижней челюсти слева (рисунок 10). Проведено МСКТ всего тела с контрастом — выявлено очаговое образование в мягких тканях I пальца левой стопы, а также очаговое образование нижней челюсти слева (рисунок 11). Проведена сцинтиграфия с ОФЭКТ/КТ с ^{99m}Tc -тектротидом — выявлено в I пальце стопы мягкотканное образование с четкими неровными контурами, плотностью до 82 НУ, размерами 13x17x9 мм, интенсивно накапливающее ^{99m}Tc -тектротид. На остальном протяжении в зоне исследования, в т.ч. в нижней челюсти, очагов патологической гиперфиксации радиоиндикатора не определялось (рисунок 12). При пересмотре МРТ обнаружено мягкотканное образование в I пальце стопы (рисунок 13). Проведено хирургическое иссечение опухоли I пальца стопы с восстановлением уровня фосфора на 5-е сутки и ремиссией заболевания.

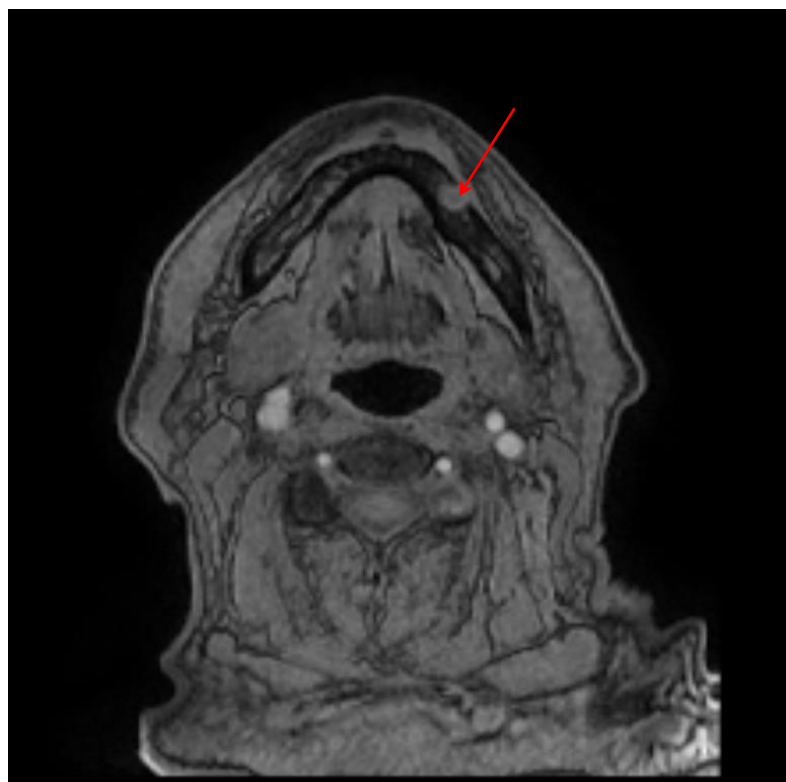


Рисунок 10 — МРТ-исследование, фронтальная плоскость. Очаговое гиперваскулярное изменение в нижней челюсти слева



а



б

Рисунок 11 — МСКТ-исследование, сагиттальная проекция. Фосфатурическая мезенхимальная опухоль мягких тканей левой стопы (стрелка):
а) нативная фаза, б) артериальная фаза

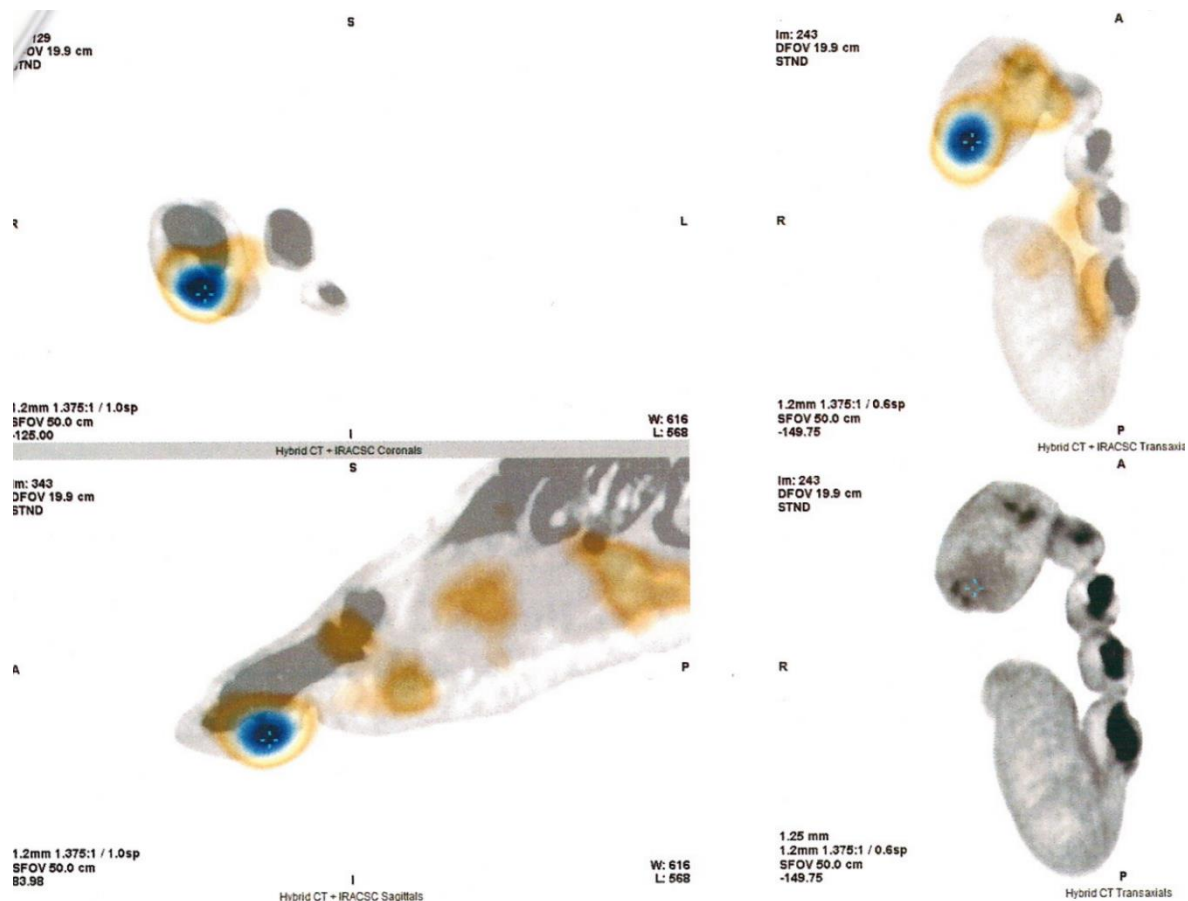


Рисунок 12 — Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -Тектротидом. Выявлено в I пальце стопы мягкотканное образование с четкими неровными контурами плотностью до 82 HU, размерами 13x17x9 мм, интенсивно накапливающее ^{99m}Tc -Тектротид. На остальном протяжении в зоне исследования, в т.ч. в нижней челюсти, очагов патологической гиперфиксации радиоиндикатора не определялось

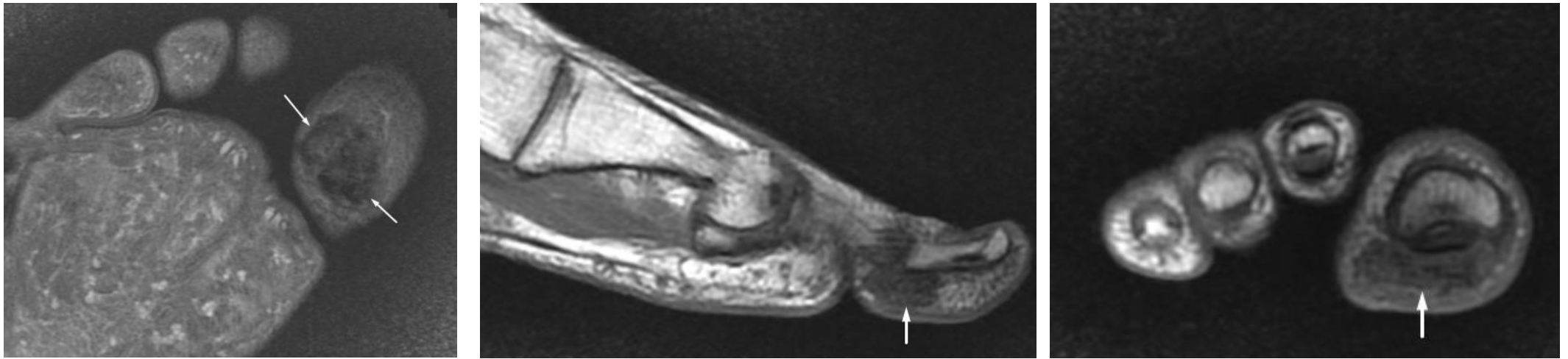


Рисунок 13 — МРТ стопы с контрастированием. Мягкотканое образование с четкими дольчатыми контурами, размерами 20x8x19 мм, с кальцинатами, при контрастном усилении гетерогенно накапливающее препарат. Сигнал от костного мозга на уровне образования однородный, признаков костной деструкции нет

3.3 Диагностические возможности маркера ФРФ-23, измеренного различными тест-системами, как метода диагностики гиперпродукции ФРФ-23 вследствие опухоли. Содержание альтернативных белков в крови пациентов с нарушениями фосфорного обмена

3.3.1 Верификация диагностических возможностей ФРФ-23, измеренного различными тест-системами. Содержание альтернативных белков в крови пациентов с нарушениями фосфорного обмена

В исследование были включены 72 человека, из них пациенты с ФРФ-23-опухолью и гипофосфатемией $n = 24$, с установленной активностью акромегалии и гиперфосфатемией $n = 24$, а также здоровые добровольцы, подобранные по возрасту и полу $n = 24$. Дизайн представлен на рисунке 1. Общие характеристики пациентов, включенных в исследование, см. в таблице 8. Референсом служил окончательный диагноз.

Сравнивались диагностические возможности определения ФРФ-23 в сыворотке крови тремя наборами для ИФА: iFGF-23 (Biomedica BI-20700) — определение интактного ФРФ-23 (иФРФ-23), iFGF-23 RayBiotech ELN-FGF23-1 — определение интактного ФРФ-23 (иФРФ-23), cFGF23 (C-terminal) Biomedica BI-20702 — определение С-концевого пептида ФРФ-23. При прямом сравнении всех площадей под кривыми операционных характеристик арифметически наибольшей площадью обладало исследование интактного ФРФ-23 в сыворотке крови набором iFGF-23 (Biomedica BI-20700) методом ИФА (рисунок 14).

Кроме того, проводился сравнительный анализ концентраций белков, обладающих эндокринной и паракринной функцией среди пациентов с нарушениями фосфорного обмена. Не были обнаружены статистически значимые различия в измеренных биомаркерах: липокалин-2 ($p = 0,16$), склеростин ($p = 0,12$) в пределах исследуемых групп (см. таблицы 8 и 9).

Таблица 8 — Характеристики исследуемых групп

Параметры	ФРФ-23-опухоль (n = 24)	Акромегалия (n = 24)	Группа сравнения (n = 24)	P-value
Возраст, года Me [Q1; Q3]	46 [42; 65]	45 [44; 59]	49 [42; 67]	0,250
Пол, М:Ж (%)	11(46%):13(54%)	12(50%):12(50%)	11(46%):13(54%)	0,945
ИМТ Me [Q1; Q3]	29 [23; 33]	28 [22; 32]	26 [24; 30]	0,400*
Фосфор сыворотки Me [Q1;Q3]	0,49 [0,46; 0,53]	1,6 [1,5; 1,8]	0,9 [0,78; 1,2]	<0,001*
ИФР-1 Me [Q1;Q3]	179 [99; 218]	780 [650; 816]	150 [53;188]	<0,001*

Примечание: Ж — женщины, М — мужчины. Тест хи-квадрат, *тест Краскел-Уоллиса; В сравнениях применялась поправка Бонферрони, и значение p менее 0,007 считалось статистически значимым. Средний уровень ИФР-1 у пациентов с акромегалией был значимо выше, нежели в других группах ($p < 0,001$). Уровни фосфора (Pi) в сыворотке крови у пациентов с ФРФ-23-опухолью были значительно ниже по сравнению с другими группами (медиана 0,49 [0,46;0,53] ($p < 0,001$ и $p < 0,001$) критерий Манна-Уитни). Пациенты с акромегалией имели более высокий уровень фосфора — 1,6 [1,5; 1,8] ($p < 0,001$) и ИФР-1 — 780 [650;810] ($p < 0,001$ и $p < 0,001$) критерий Манна-Уитни) по сравнению с группой сравнения.

Таблица 9 — Результаты

Параметры	ФРФ-23-опухоль (n = 24)	Акромегалия (n = 24)	Группа сравнения (n = 24)	P-value
Липокалин-2 Me [Q1;Q3]	57 [38; 67]	34 [18; 44]	37 [21;52]	0,160*
Склеростин Me [Q1;Q3]	25 [17; 38]	19 [14; 28]	21 [18; 25]	0,120*

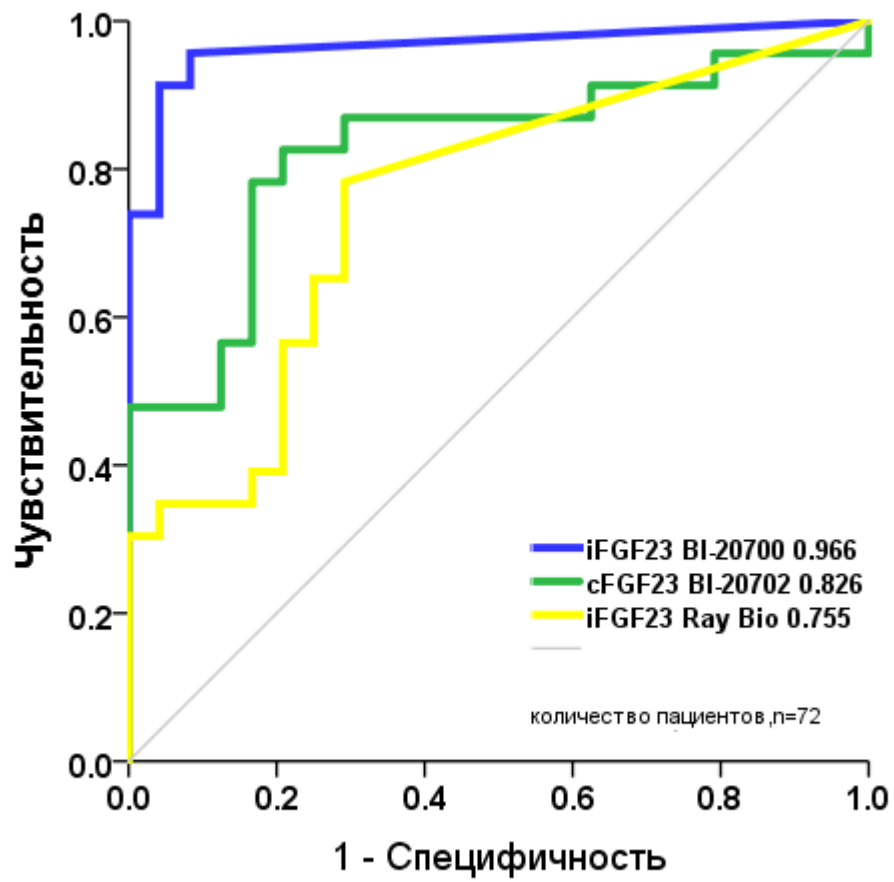


Рисунок 14 — Результаты ROC-анализа (ROC-графики) 3 методов измерения ФРФ-23 для диагностики ФРФ-23-опухоли

Примечание: iFGF23 BI-20700 (синяя кривая) AUC = 0,966 (95% ДИ 0,910-1,00). cFGF23 BI-20702 (зеленая кривая) AUC = 0,826 (95% ДИ 0,70-0,952). iFGF23 Ray Bio (желтая кривая) AUC = 0,755 (95% ДИ 0,614-0,895). Цифрами указаны значения AUC для каждого метода.

3.3.2 Информативность маркера иФРФ-23 для дифференциальной диагностики ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии

В исследование включено 77 пациентов с гипофосфатемией и 55 здоровых добровольцев. Производился забор крови для исследования уровня иФРФ-23, фосфора, а пациентам с гипофосфатемией исследовали показатели тубулярной реабсорбции фосфатов, концентрации кальция и щелочной фосфатазы в крови. Среди пациентов с гипофосфатемией были выделены 2 подгруппы: ФРФ-23-зависимой ($n = 58$) и ФРФ-23-независимой ($n = 19$) гипофосфатемии. В подгруппу

ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии вошли пациенты с ФРФ-23-опухолью ($n = 44$) и с х-связанным гипофосфатемическим рахитом ($n = 14$). Подгруппу ФРФ-23-независимой гипофосфатемии ($n = 19$), составили пациенты с ПГПТ ($n = 6$), а также с другими причинами, в том числе с мальабсорбцией $n = 3$, декомпенсацией сахарного диабета $n = 2$, синдромом Фанкони $n = 4$, лекарственной гипофосфатемией $n = 4$. Характеристики включенных групп представлены в таблице 10, а дизайн отображен на рисунке 1.

Для определения отрезной точки иФРФ-23 в сыворотке крови проводилось 4 варианта сравнений между группами:

- 1) ФРФ-23-опухоль против всех остальных групп;
- 2) ФРФ-23-зависимая гипофосфатемия против ФРФ-23-независимой гипофосфатемии;
- 3) ФРФ-23-зависимая гипофосфатемия против группы здоровых добровольцев;
- 4) ФРФ-23-зависимая гипофосфатемия против ФРФ-23-независимой гипофосфатемии + группа здоровых добровольцев.

В случае сравнения пациентов с ФРФ-23-опухолью против всех остальных групп оптимальная точка разделения — 37,45 пг/мл, рассчитанная на основании ROC-анализа и критерия Юдена, позволяет добиться чувствительности 93% (95% ДИ 81%-98%) и специфичности 84% (95% ДИ 79%-87%). Площадь под кривой $AUC = 0,931$ (95% ДИ 0,888-0,975), $ПЦПР = 0,725$ (95% ДИ 0,636-0,768), $ПЦОР = 0,961$ (95% ДИ 0,902-0,989) (рисунок 15). Медиана интактной формы ФРФ-23 (иФРФ-23) при опухоли составила 154 пг/мл [56; 310].

В случае сравнения пациентов с ФРФ-23-зависимой гипофосфатемией против пациентов с ФРФ-23-независимой гипофосфатемией оптимальная точка разделения — 24,23 пг/мл, чувствительность 86% (95% ДИ 80%-88%) и специфичность 93% (95% ДИ 70%-100%). Площадь под кривой $AUC = 0,957$ (95% ДИ 0,904-1), $ПЦПР = 0,980$ (95% ДИ 0,912-0,999), $ПЦОР = 0,636$ (95% ДИ 0,477-0,679) (рисунок 16).

В случае сравнения пациентов с ФРФ-23-зависимой гипофосфатемией против здоровых людей с нормальным уровнем фосфора крови оптимальная точка разделения — 28,23 пг/мл, чувствительность 85% (95% ДИ 76%-91%) и специфичность 72% (95% ДИ 61%-80%). Площадь под кривой AUC = 0,882 (95% ДИ 0,823-0,941), ПЦПР = 0,790 (95% ДИ 0,709-0,852), ПЦОР = 0,786 (95% ДИ 0,665-0,877) (рисунок 17).

В случае сравнения пациентов с ФРФ-23-зависимой гипофосфатемией против всех остальных исследуемых групп оптимальная точка разделения — 28,23 пг/мл, чувствительность 85% (95% ДИ 75%-92%) и специфичность 75% (95% ДИ 66%-82%). Площадь под кривой AUC = 0,897 (95% ДИ 0,846-0,948), ПЦПР = 0,766 (95% ДИ 0,683-0,827), ПЦОР = 0,833 (95% ДИ 0,735-0,906) (рисунок 18).

Для диагностики ФРФ-23-секретирующих опухолей может быть предложена точка разделения 37,45 пг/мл с чувствительностью 93% и специфичностью 84%. Для дифференциальной диагностики ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии среди всех групп может быть предложена точка разделения 28,23 пг/мл с чувствительностью 85% и специфичностью 75%. Для выявления ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии среди пациентов с синдромом гипофосфатемии предложена точка разделения 24,23 пг/мл с чувствительностью 86% и специфичностью 93%.

В ходе исследования продемонстрировано, что наибольшей диагностической значимостью для измерения гиперпродукции уровня ФРФ-23 вследствие опухоли обладает тест-система, определяющая интактную форму ФРФ-23 в сыворотке крови (AUC = 0,966) по сравнению с другими исследуемыми системами, с рекомендуемой точкой разделения 37,45 пг/мл (AUC = 0,931) (чувствительность 93%; специфичность 84%). Содержание белков, обладающих эндокринной и паракринной функцией (липокалин-2, склеростин), в сыворотке крови среди пациентов с нарушениями фосфорного обмена не отличаются.

Таблица 10 — Характеристики пациентов с ФРФ-23-зависимой и ФРФ-23-независимой гипофосфатемией

Параметр	Группа сравнения	Гипофосфатемия ФРФ-23-зависимая			p (Манна-Уитни)*	Гипофосфатемия ФРФ-23-независимая			p (Манна-Уитни)**
		Все	ФРФ-23-опухоль	Х-сцепленный ГФР		Все	ПГПТ	Другие причины	
Кол-во, n	55	58	44	14	-	19	6	13	-
Пол, М, n (%)	22 (40%)	24 (41%)	19 (43%)	5 (36%)	0,1170	5 (26%)	1 (17%)	4 (31%)	0,249
Возраст, года Me [Q1; Q3]	40 [30; 55]	41 [27; 55]	47 [39; 59]	22 [18; 39]	0,0001	45 [34; 59]	50 [28; 62]	45 [31; 57]	0,4560
Фосфор, мМ/л Me [Q1; Q3]	1,2 [0,8; 1,44]	0,51 [0,45; 0,61]	0,49 [0,41; 0,53]	0,61 [0,57; 0,69]	0,0001	0,64 [0,59; 0,71]	0,6 [0,41; 0,80]	0,67 [0,60; 0,71]	0,0040
TRP, % Me [Q1; Q3]	-	65 [57; 72]	62 [52; 72]	68 [65; 80]	0,0050	66 [54; 72]	66 [54; 70]	67 [52; 81]	0,8200
иФРФ23, пг/мл Me [Q1; Q3]	13,9 [4,6; 26]	84 [33; 245]	154 [56; 310]	28 [19; 40]	0,0001	10 [4; 17]	9 [4; 14]	12 [3; 20]	0,0001
Са, мМ/л Me [Q1; Q3]	-	2,3 [2,2; 2,4]	2,3 [2,1; 2,4]	2,3 [2,2; 2,4]	0,7810	2,3 [2,2; 2,4]	2,4 [2,3; 2,6]	2,3 [2,2; 2,4]	0,5990
ЩФ, Ед/л Me [Q1; Q3]	-	236 [135; 306]	236 [164; 306]	171 [66; 449]	0,479	167 [99; 330]	115 [99; 537]	185 [271; 80]	0,237

Примечание: поправка Бонферрони, значение p менее 0,007 считалось статистически значимым. p (Манна-Уитни)* — сравнение между группами «ФРФ-23-опухоль» и «Х-сцепленный ГФР». p (Манна-Уитни)** — сравнение между группами «ФРФ-23-зависимая гипофосфатемия» и «ФРФ-23-независимая».

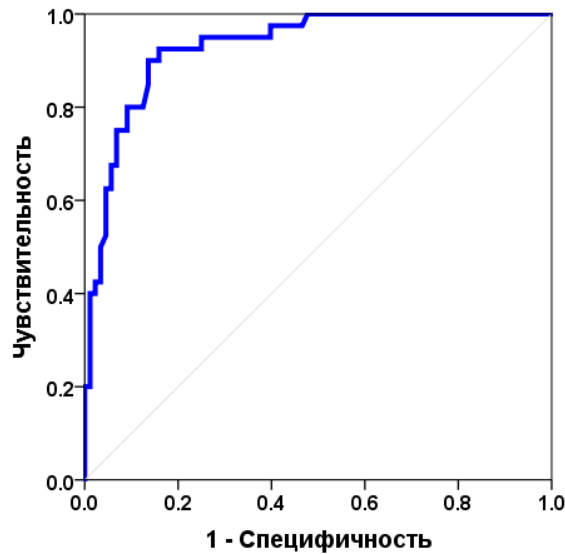


Рисунок 15 — ROC-кривая диагностических возможностей иФРФ-23 для выявления ФРФ-23-секретирующей опухоли, $n = 132$. Сравнение подгруппы «ФРФ-23-опухоль», $n = 44$ против всех остальных групп, $n = 88$. Площадь под кривой $AUC = 0,931$ (95% ДИ 0,888- 0,975)

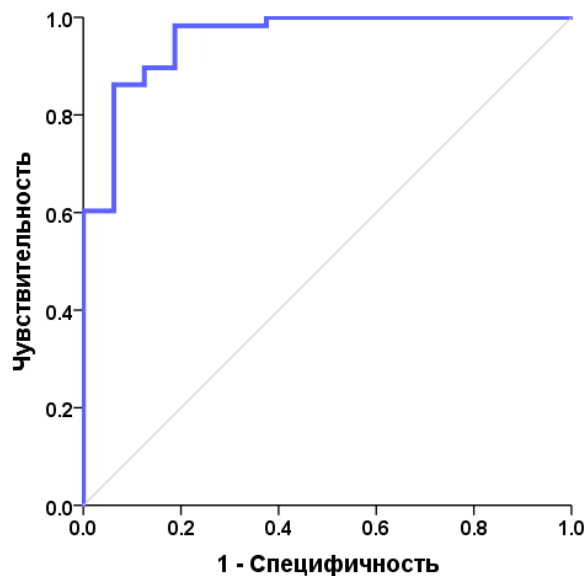


Рисунок 16 — ROC-кривая диагностических возможностей иФРФ-23 для выявления ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии среди пациентов с синдромом гипофосфатемии, $n = 77$. Сравнение подгруппы «ФРФ-23-зависимая гипофосфатемия», $n = 58$, против подгруппы «ФРФ-23-независимая гипофосфатемия», $n = 19$. Площадь под кривой $AUC = 0,957$ (95% ДИ 0,904-1)

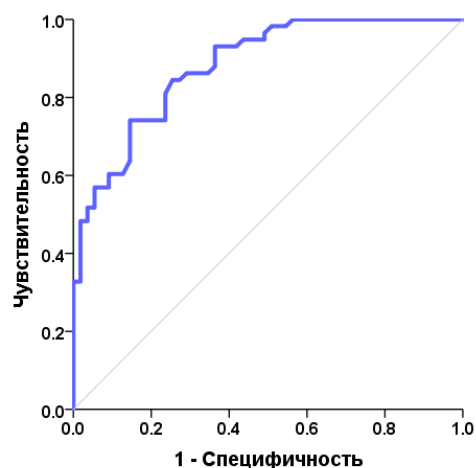


Рисунок 17 — ROC-кривая диагностических возможностей иФРФ-23 для выявления пациентов с ФРФ-23-зависимой гипофосфатемией среди здоровых, $n = 113$. Сравнивали пациентов из подгруппы «ФРФ-23-зависимая гипофосфатемия», $n = 58$ против подгруппы здоровых добровольцев, $n = 55$. Площадь под кривой $AUC = 0,882$ (95% ДИ 0,823-0,941)

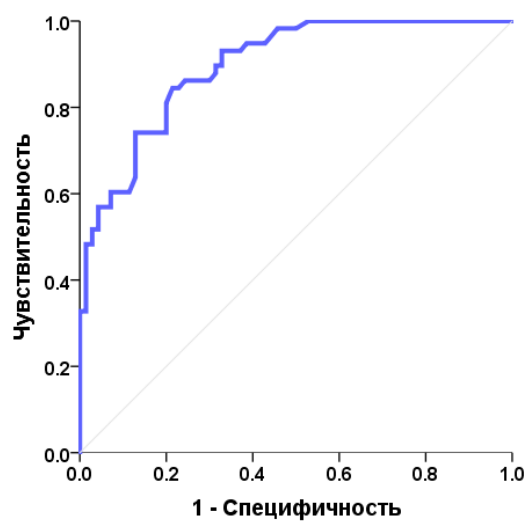


Рисунок 18 — ROC-кривая диагностических возможностей иФРФ-23 для выявления ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии среди пациентов с синдромом гипофосфатемии и у здоровых, $n = 132$. Сравнивали подгруппы «ФРФ-23-зависимая гипофосфатемия», $n = 58$ против «ФРФ-23-независимая гипофосфатемия», $n = 19$ и подгруппа здоровых добровольцев, $n = 55$. Площадь под кривой $AUC = 0,897$ (95% ДИ 0,846-0,948)

3.3.3 Клинические примеры диагностических возможностей иФРФ-23

Клинический случай № 2. Пациентка Р., 61 год, обратилась с жалобами на множественные переломы, болевой синдром, мышечную слабость, деформации костей позвоночника. Из анамнеза известно, что пациентка больна в течение 20 лет. Наблюдалась у врачей с диагнозом первичный гиперпаратиреоз. Лабораторно фиксировались гипофосфатемия до 0,4 ммоль/л (0,74-1,52), повышение уровня ЩФ до 400 ЕД/л (40-150), повышение уровня ПТГ до 400 пг/мл (15-65), гиперкальциемия до 2,9 ммоль/л (2,15-2,55). В 2016 и 2017 годах перенесла удаление правой нижней, а затем левой нижней ОЦЖ по поводу гиперпаратиреоза, без клинического улучшения, без нормализации лабораторных параметров (уровень ПТГ послеоперационно сохранялся повышенным до 545 пг/мл, уровень фосфора снижен до 0,41 ммоль/л), гистологически выявлена гиперплазия обеих околощитовидных желез. Семейный анамнез относительно заболеваний скелетно-мышечного аппарата не отягощен.

Пациентке был измерен уровень иФРФ-23 набором Biomedica BI-20700, который показал уровень иФРФ-23 — 4588 пг/мл. Пациентке был проведен поиск причин гиперсекреции ФРФ-23. По данным инструментальных методов выявлено мягкотканное образование 4,2 x 4,0 x 2,6 см, в крестцовом канале на уровне позвонков S2/3 с обтурацией крестцового канала и компрессией крестцовых нервов (рисунок 19). Образование накапливало радиофармпрепарат по данным сцинтиграфии с ^{99m}Tc -тектротидом с ОФЭКТ/КТ (рисунок 20).

Хирургическое лечение не проводилось ввиду вставания опухоли в крестцовый канал с компрессией нервов и высокими послеоперационными рисками. Пациентке был назначен «Буросуаб» с положительной динамикой.

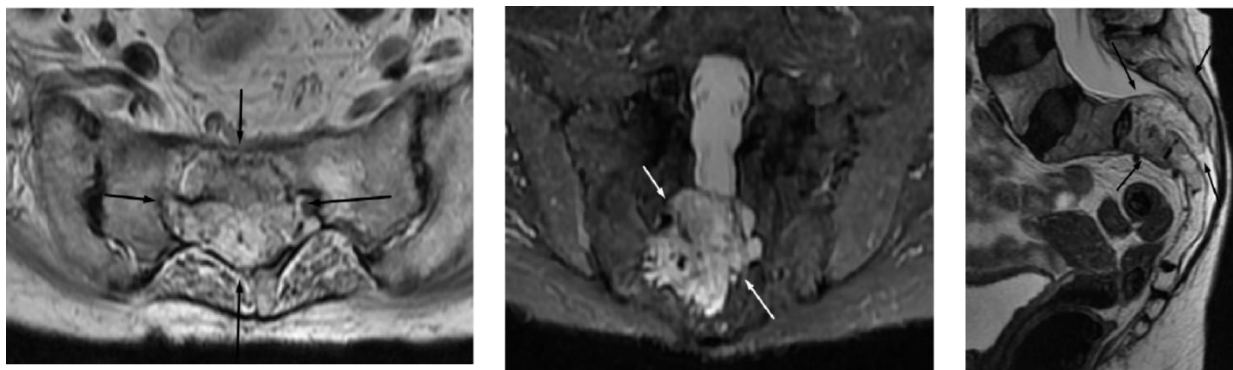


Рисунок 19 — МРТ-исследование. В телах позвонков S2-S3 образование размерами 44 x 26 x 38 мм, обтурирующее крестцовый канал, компримирующее крестцовые нервы

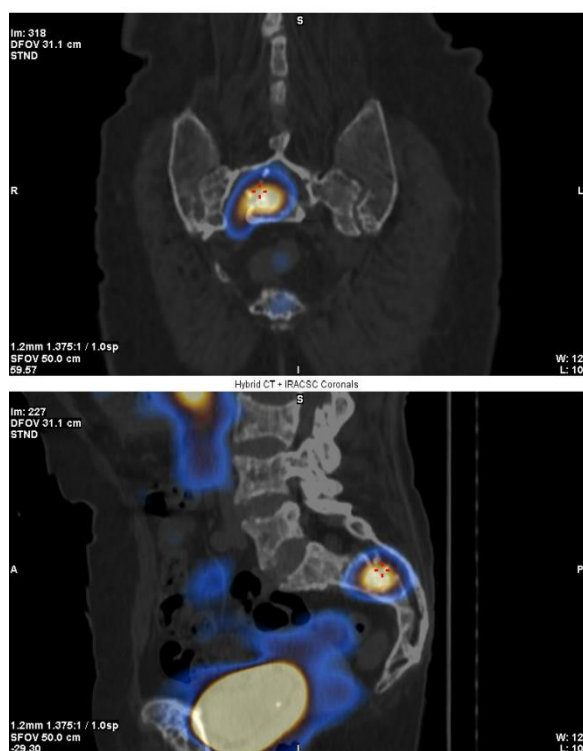


Рисунок 20 — Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -Тектритидом. В крестцовом канале мягкотканное образование 4,2 x 4,0 x 2,6 см, распространяющееся в малый таз

Клинический случай № 3. Пациентка Г., 50 лет, обратилась с жалобами на множественные переломы, болевой синдром, мышечную слабость, остеолитические очаги в костях таза, в нижних и верхних конечностях, в позвоночнике до 5 см.

Из анамнеза известно, что пациентка больна в течение двух лет. Обследовалась у онкологов, где проводилась пункционная биопсия образований

лобковой кости, по результатам которой выставлен диагноз гигантоклеточная опухоль и назначена терапия препаратом деносумаб 120 мг в месяц, пациентка сделала 6 инъекций. А также препараты кальция карбоната 2 г в сутки и колекальциферола 2000 ЕД в сутки.

По данным лабораторного обследования выявлены гипофосфатемия 0,33 ммоль/л (0,74-1,52); снижение индекса реабсорбции фосфатов (TRP, %) 54% (>85%); повышение уровня паратиреоидного гормона 2113 пг/мл (15-65); изменения маркеров костной резорбции С-концевого телопептида коллагена 1-го типа — снижение до 0,115 нг/мл (0,3-0,57); повышение остеокальцина 91,14 нг/мл (11-43); щелочная фосфатаза 114 Ед/л (40-150); на фоне нормокальциемии кальций, скорректированный на альбумин, 2,36 ммоль/л (2,15-2,55); сохранной функции почек креатинин 57 мкмоль/л (50-98); СКФ по СКД-ЕРІ 103мл/мин/1,73 м² (>60); нормокальциурии кальций суточной мочи 7,49 ммоль/24ч. Семейный анамнез относительно заболеваний скелетно-мышечного аппарата не отягощен.

По данным лучевых методов подтверждены очаги деструкции и новообразования дистальных метаэпифизов бедренных костей с двух сторон (рисунок 21) и костей таза (рисунок 22). Проведена сцинтиграфия с ОФЭКТ/КТ с ^{99m}Tc-тектротидом — выявлены SSTR2A-позитивные очаги в зоне деструкции латерального мышелка правой бедренной кости и в зоне деструкции правой лонной кости (рисунок 23). Пациентке проведено оперативное удаление мягкотканного образования латерального мышелка правой бедренной кости. По данным морфологического заключения явных признаков опухоли выявлено не было, кроме того, уровень фосфора после операции оставался сниженным 0,35 ммоль/л.

Пациентке измерен уровень иФРФ-23 набором Biomedica BI-20700, который показал неопределенно низкие концентрации иФРФ-23. Пациентке выполнено УЗИ околощитовидных желез и проведен поиск причин гиперпаратиреоза. При проведении сцинтиграфии ОЩЖ с ^{99m}Tc-технетрилом выявлено образование левой нижней околощитовидной железы (рисунок 24). Пациентке выполнено удаление аденомы ОЩЖ, после чего наступила ремиссия заболевания с

нормализацией уровня фосфора 0,92 ммоль/л, уровня ПТГ 100 пг/мл, деносумаб был отменен.

В первом клиническом случае определение ФРФ-23 позволило дифференцировать ФРФ-23-зависимую гипофосфатемию и развивающийся на этом фоне вторичный гиперпаратиреоз. Во втором случае определение ФРФ-23 позволило дифференцировать ФРФ-23-независимую гипофосфатемию вследствие ПГПТ с бурыми опухольми, в том числе в костях таза. При этом наблюдалась нормакальциемия вследствие высоких доз деносумаба.

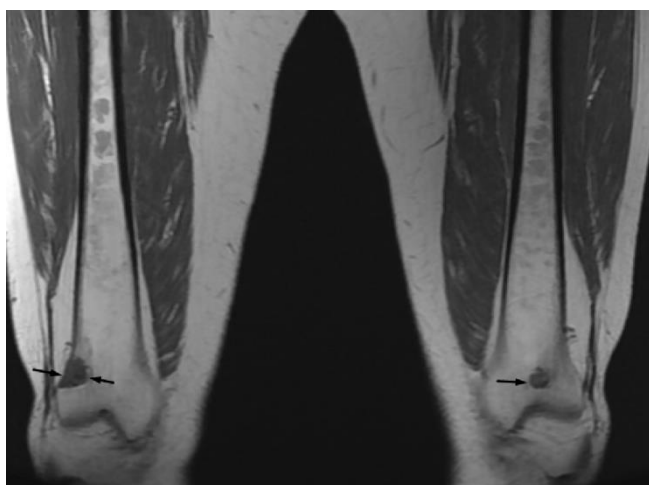


Рисунок 21 — МРТ-исследование. Образования дистальных метаэпифизов бедренных костей (стрелки)



Рисунок 22 — МСКТ-исследование. Очаги деструкции правой лонной кости, размерами до 50 x 33 мм

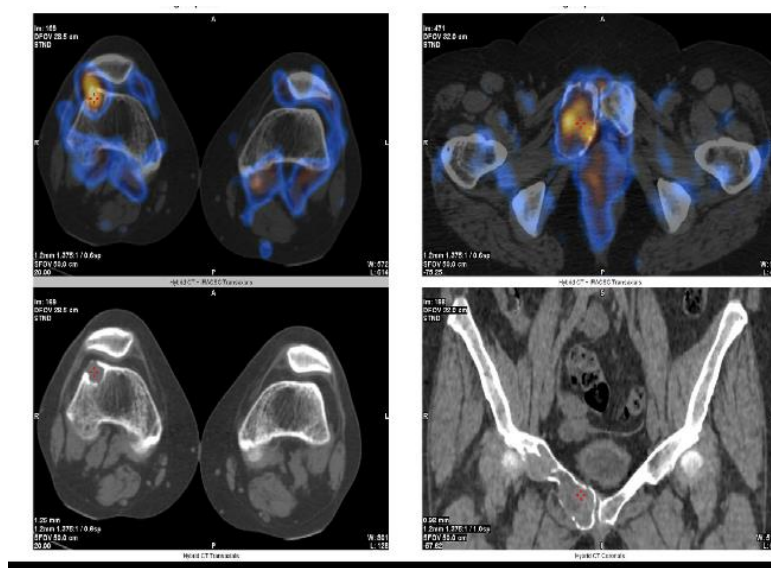


Рисунок 23 — Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -тектротидом. Множественные литические очаги костей скелета. ОФЭКТ/КТ-признаки умеренной гиперэкспрессии соматостатиновых рецепторов в очагах деструкции костной ткани правой лонной кости и латерального мыщелка правой бедренной кости. В других очагах костей накопления РФП не отмечаются

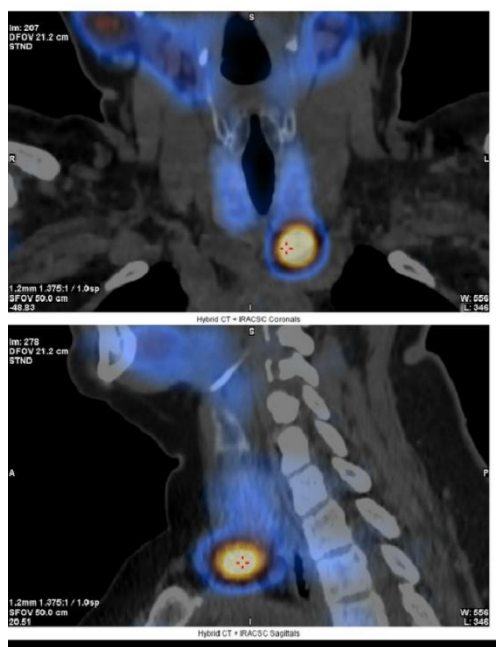


Рисунок 24 — Сцинтиграфия ОЩЖ с ^{99m}Tc -технетрилом, в левой нижней доле определяется образование размерами 2,3 x 2,2 x 1,2 см

3.4 Транскриптомные характеристики ФРФ-23-секретирующих опухолей

Выполнен анализ ФРФ-23-опухолей $n = 7$, из них секвенирование РНК единичных клеток (Single-cell-RNA-sequencing) выполнено для двух образцов, а тотальной РНК (Bulk-RNA-sequencing) для 5 образцов, в качестве контроля использовали тотальную РНК костной ткани $n = 4$. Характеристики образцов, а также клиническая информация по пациентам суммированы в таблице 11.

Анализ данных показал, что все проанализированные опухоли имеют схожий профиль экспрессии. На рисунке 25А изображен график MDS (Multidimensional scaling plot, график многомерного масштабирования), построенный на данных Bulk-RNA seq. Видно, что опухоли группируются вместе, следовательно, имеют схожий профиль экспрессии. Такое же распределение подтверждено экспрессией генов-маркеров ФРФ-23-опухолей *FGF23*, *FGF1*, *FGFR1*, *SSTR2*: значительная экспрессия наблюдается в новообразованиях, но не в костной ткани ($FDR < 0,05$) (рисунок 25С) [6, 44, 54].

Данные секвенирования единичных клеток также подтверждают, что опухоли имеют однородный профиль экспрессии генов, несмотря на разную локализацию. Получено 7162 клеток для 1-го образца и 11 088 клеток для 2-го образца. Проведена клеточная кластеризация интегрированных данных и выявлено, что во всех образцах наблюдается семь кластеров клеток, наибольший из которых (в среднем 48%) представлен уникальными опухолевыми клетками, экспрессирующими маркер *FGF23* (рисунок 26, 27). Остальные клеточные кластеры, представленные в опухоли, были аннотированы как клетки сосудов (Кластер#1: *PECAM1*, *VWF*, *KDR*, *CDH5*, *TIE1*); NK-клетки и макрофаги (#2: *FCGR3A*, *CD68*, *CD14*, *ITAGAX*, *CD163*); фибробласты (#3: *COL1A1*, *FAP*, *PDGFRB*, *ACTA2*, *THY1*), Т-клетки (#4: *CD3E*); хондрокласты (#5: *CTSK*; *ACP5*; *CALCR*; *MMP9*; *ATP6V0D2*); тучные клетки (#6: *KIT*; *CPA3*; *CMA1*; *TPSAB1*); моноциты (#7: *FCN1*; *CFP*; *CD14*; *FCGR3A*; *FGR*) (рисунок 28).

Таблица 11 — Клиническая информация о пациентах

Пациент	Опухоль	Контрольная ткань	Метод анализа	Пол	Возраст	Локализация опухоли	До операции лабораторные тесты						Фосфор крови через 1 год после операции
							ФРФ-23 (3,8-25 пг/мл)	TRP (>85%)	Фосфор (0,74-1,52 ммоль/л)	ЩФ (40-150 ед/л)	ПТГ (15-65 пг/мл)	Са скорр (2,15-2,55 ммоль/л)	
1	ФМО01	C01	Bulk	Ж	62	Нижняя челюсть	86	63	0,62	90	34	2,2	1,28
2	ФМО02	C02	Bulk	Ж	41	Нижняя челюсть	2380	65	0,51	68	114	2,7	0,92
3	ФМО03	-	Bulk	Ж	73	Большеберцовая кость	37	58	0,53	164	100	2,13	1,23
4	ФМО04	-	Bulk	Ж	65	Метатарзальная кость	139	76	0,4	148	74	2,5	1,07
5	ФМО05	-	Bulk	Ж	41	Пирамида височной кости	224	49	0,3	241	113	2,1	0,5
6	-	C03 C04	Bulk	М	43	Лобная кость	47	58	0,35	220	60	2,07	0,6
7	ФМО06	-	SC	Ж	66	Верхнее небо	434	74	0,71	152	76	2,33	1,4
8	ФМО07	-	SC	Ж	38	ПЖК левой ягодицы бедра	30	74	0,6	206	53	2,17	1,5

Примечания: ФМО — фосфатурическая мезенхимальная опухоль; С — костная ткань; Bulk — Bulk-RNA-sequencing; SC — Single-cell-RNA-sequencing.

С целью изучить клеточный состав опухоли проанализирована экспрессия маркеров костных клеток на разных этапах дифференцировки по данным Bulk RNA Sequencing (рисунок 28). Показано, что в опухолях наиболее экспрессированы маркеры остеоцитов и ранних остеоцитов, в частности гены секреторно-активных остеоцитов, экспрессируемые при условии высокой концентрации фосфора в крови. По данным Single-cell-RNA-sequencing подтверждена экспрессия в опухолевом кластере генов *FGF23*, *DMP1*, *ENPP1*, *PHEX*, *GALNT3*, *MEPE*, *TGFβ2*, *MEPE*, *SOST*, *BGLAP2*, *WIF1* [43] (рисунок 29). Полученные данные отражают, что вне зависимости от локализации опухоли (внутри мягких тканей или внутри костей), несмотря на низкий уровень фосфора в крови, клетки опухоли экспрессируют маркеры секреторно-активных остеоцитов, потерявших отрицательную обратную связь с концентрациями фосфора в крови.

В предыдущих работах найдены молекулярно-генетические перестройки, считающиеся этиологией опухоли. Это слияние генов *FN1*, *FGFR1*, *FGF1* либо гиперэкспрессия *KLOTHO*. В исследуемых образцах были найдены слияния генов *FN1:FGF1*, $n = 2/7$, гиперэкспрессия *KLOTHO*, $n = 3/7$, однако в 2/7 образцах изменения не идентифицированы.

Во всех изученных образцах была выявлена экспрессия генов *SLC30A3* и генов SNARE-комплекса (*SYT1*, *STX1A*, *SNAP25*), осуществляющих транспорт биологически активных соединений из везикул клетки в кровь (путем экзоцитоза). Наибольшая экспрессия была обнаружена в опухолевом кластере по данным секвенирования единичных клеток. Обнаруженные изменения могут представлять механизм опухолевой секреции (рисунок 29).

В опухолевом кластере обнаружены гены поверхностных мембранных белков, экспрессия которых высока в опухолях и низка в костной ткани, которые являются потенциальными диагностическими мишенями: *PHEX*, *PCDH7*, *RAMP1*, *CD44*, *NRG3*, *PCDH9*, *FGFR1*, *ENPP1*.

Максимально экспрессируемые генами в опухоли по сравнению с костной тканью: *SLC30A3*, *MB*, *ASTL*, *GPR139*, *ZCCHC12*. Наименее экспрессируемые гены

опухоли — это иммуноглобулинкодирующие гены. *SLC30A3 (ZIP3)* — ген транспортер цинка 3 (*ZnT3*) в пресинаптические пузырьки глутаматергических нейронов. Экспрессирован преимущественно в клетках нервной системы. Описана экспрессия *ZnT3* в некоторых секреторных, эндокринных клетках, в частности описано его влияние на секрецию инсулина [60]. Ген ассоциирован с развитием болезни Альцгеймера, депрессии [61, 62], злокачественных заболеваний ЦНС (глиобластома) [63]. Миоглобин — *myoglobin (MB)* — кодирует белок миоглобина. Функциями миоглобина являются хранение, транспортировка и диффузия кислорода в мышцы, а также индукция слияния митохондрий, онкогенеза и гипоксии [64]. Экспрессирован различными тканями, в частности мышечной и во многих злокачественных опухолях, включая рак предстательной железы, рак легкого, рак прямой кишки и карциномы яичника. Все указанные типы рака способны приобретать секрецию ФРФ-23 [12]. *ASTL* — астациноподобная металлоэндопептидаза (The astacin like metalloendopeptidase) — кодирует фермент овастацин, который является цинковой металлопротеазой, для активности которой требуется Zn^{2+} , и расщепляет прозрачную оболочку ооцитов млекопитающих для предотвращения полиспермии и бесплодия [65, 66]. Экспрессия обнаружена в гонадах, примордиальных половых клетках, костном мозге, клетках рака яичников [67, 14, 68]. *GPR 139* — рецептор 139, связанный с G-белком — экспрессирован в центральной нервной системе, преимущественно в головном мозге [69–71]. *ZCCHC12* — Цинковый палец с доменом CCHC 12 (Zinc Finger CCHC-Type Containing 12) — транскрипционный фактор [72], передающий сигнал от костного морфогенетического белка (BMP) (англ. Bone Morphogenetic protein) [73]. Белок экспрессирован в эндометрии [74], головном мозге и в некоторых злокачественных опухолях. Описано влияние *ZCCHC12* на прогрессирование папиллярного рака щитовидной железы [75], на эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) остеосаркомы (OS), активации пути PI3K/AKT [76, 77, 78].

Проанализированы гены, ассоциированные с иммунной системой ($FDR < 0,05$, $|\log FC| > 2$) (рисунок 30). Обнаружено, что наиболее выраженной

дифференциальной экспрессией обладают гены, ассоциированные с иммунной системой, участвующие в связывании антигена (GO p.adj = $3,0\text{e-}39$), активности иммунных/цитокиновых рецепторов (GO p.adj $1,8\text{e-}12$ и $2,5\text{e-}08$), сигнальном пути хемокинов и первичном иммунодефиците (KEGG p.adj $3,7\text{e-}06$ и $6,0\text{e-}06$), а также нарушении регуляции транскрипции и пути ее прохождения при раке (KEGG p.adj $0,0016$ и $0,0104$) (рисунок 30А). В опухоли обнаруживается значительное количество генов, ассоциированных с развитием онкологии, которые разделяют между собой опухолевые и контрольные образцы (рисунок 30В).

В ходе исследования изучены транскриптомные характеристики опухолей, секретирующих ФРФ-23, которые включают в себя экспрессию генов, ассоциированных с остеоцитами, секретирующими ФРФ-23 (*FGF23*, *DMP1*, *ENPP1*, *PHEX*, *GALNT3*, *DSPP*, *MEPE*, *ANKH*); экспрессию генов, ответственных за экзоцитоз (*SLC30A3*, *SYT1*, *STX1A*, *SNAP25*); экспрессию специфических мембранных белков (*PHEX*, *PCDH7*, *RAMP1*, *CD44*, *NRG3*, *PCDH9*, *FGFR1*, *ENPP1*).

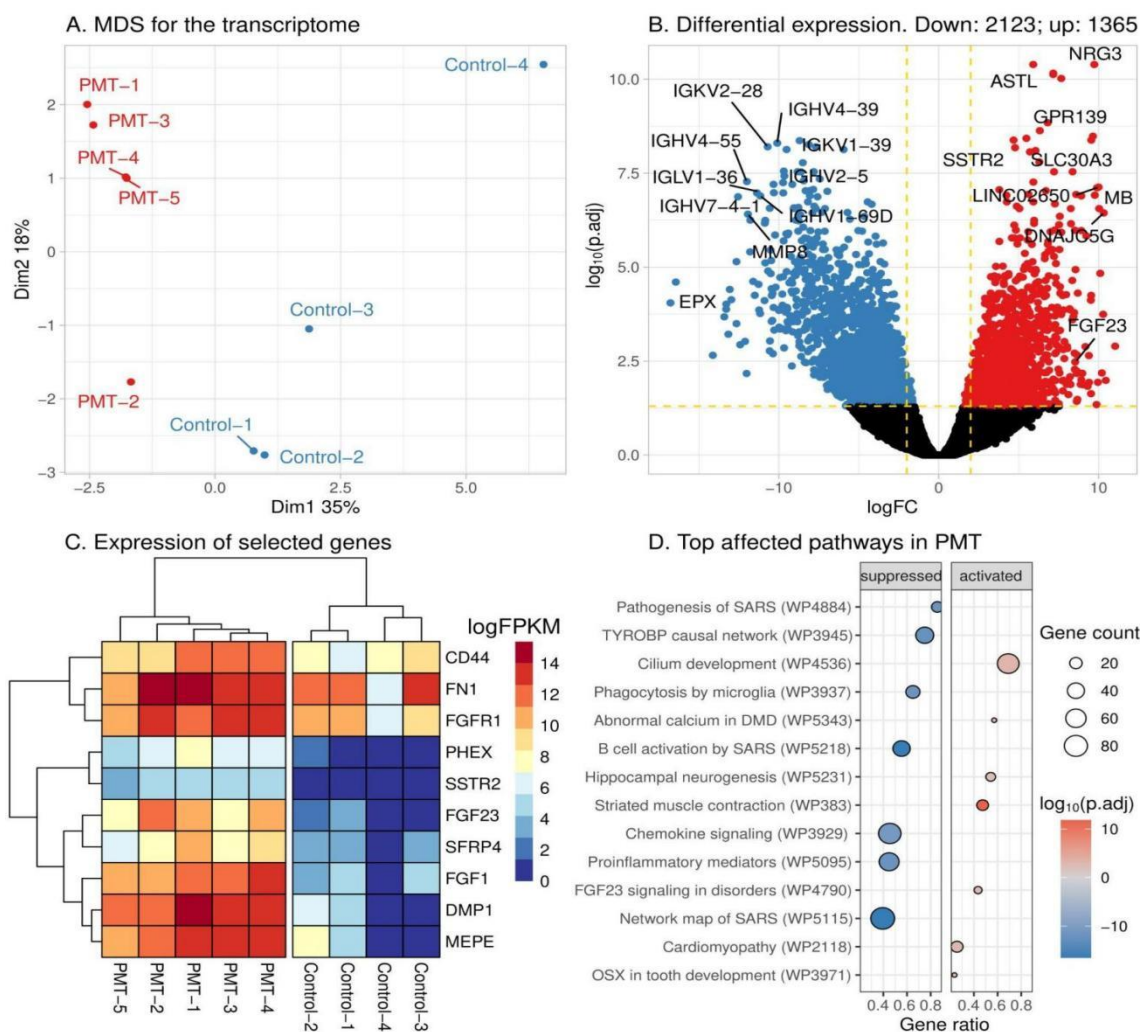


Рисунок 25 — Анализ данных Bulk RNA-seq. Сравнивались экспрессии генов в опухолевых образцах, $n = 5$, против костной ткани, $n = 4$. (А) График MDS. На графике изображены группы образцов опухолей (красным) и контрольной костной ткани (синим), которые группируются и имеют выраженные различия. (В) Дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) в ФРФ-23-опухолях по сравнению с костной тканью. Красным отмечены гиперэкспрессируемые, а синим — гипоекспрессируемые гены ($|\log_2 FC| \geq 1$ и $FDR < 0,01$), а черным — незначительные дифференциально экспрессируемые гены. Буквами обозначены топ-10 ДЭГ. (С) Тепловая карта экспрессии генов — маркеров ФРФ-23-опухолей. Большинство выбранных генов показали значительно более высокую экспрессию в опухолях ($FDR < 0,05$), за исключением *FN1* и *FGFR1* (FDR 0,47, 0,051 соответственно). Видно, что разделение между ФРФ-23-опухолями и контролем четко подтверждается. (D) Сигнальные пути. На рисунке отмечены сигнальные пути, в которых найдены наибольшие изменения экспрессии генов в ФРФ-23-опухолях

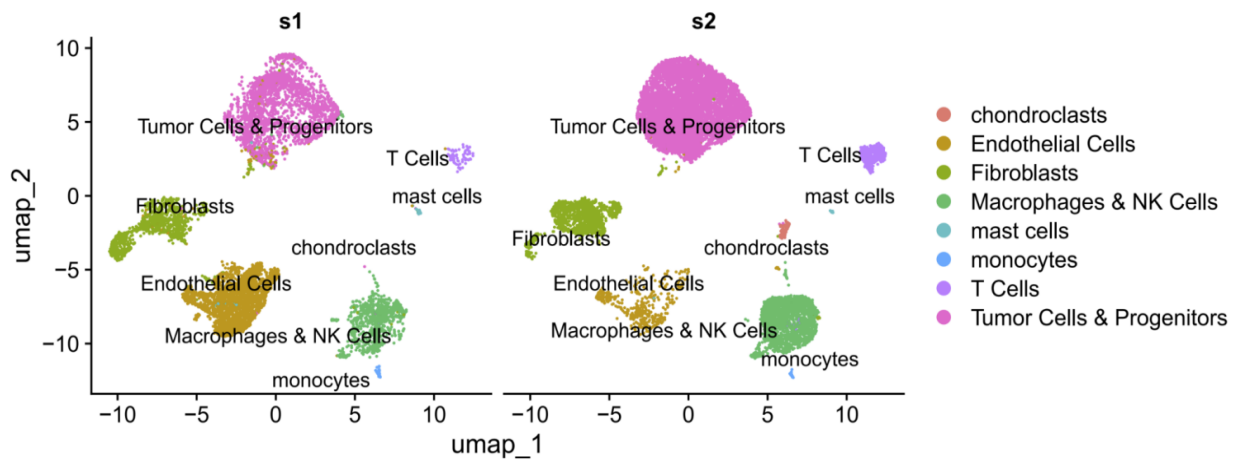


Рисунок 26 — scRNAseq dataset двух образцов ФРФ-23-секретирующих опухолей с аннотацией соответствующего клеточного типа

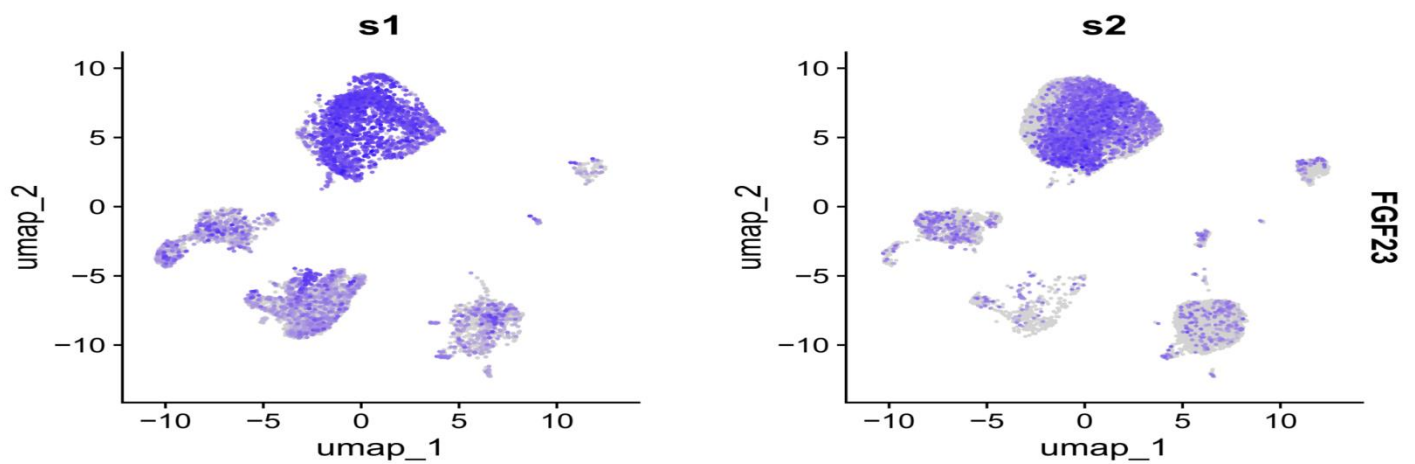


Рисунок 27 — Экспрессия *FGF23* в клеточных кластерах ФРФ-23-опухоли, $n = 2$. Наибольшая экспрессия (выделено синим цветом) наблюдается в опухолевом кластере в обоих образцах

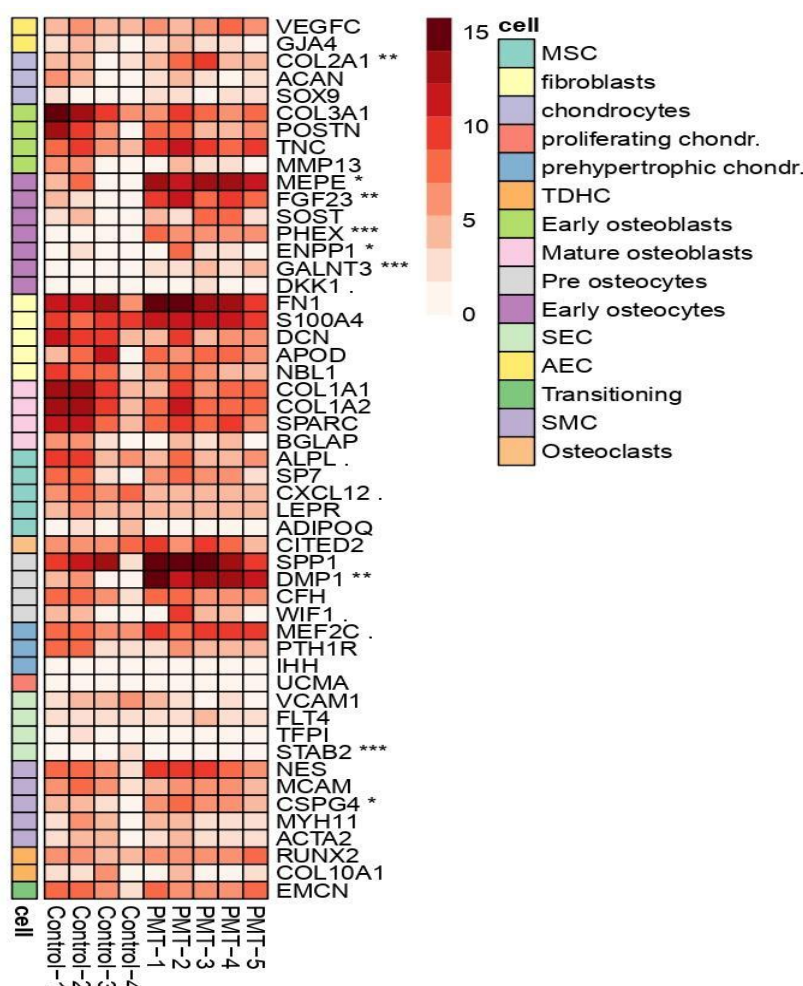


Рисунок 28 — Анализ данных Bulk RNA-seq. Сравнивались экспрессии генов в опухолевых образцах, $n = 5$, против костной ткани, $n = 4$. Экспрессия в образцах генов-маркеров костных клеток и сосудов, пронизывающих костную ткань

Примечание: видно, что большинство дифференциально экспрессируемых генов в опухоли являются маркерами ранних остеоцитов. Некоторые гены-маркеры повторяются в разных типах клеток, в таких случаях мы показали на рисунке только одну аннотацию. Например, *SPP1* является маркером как для преостеоцитов, так и для ранних остеоцитов, но мы показали его аннотацию для преостеоцитов. Ниже представлен список костных клеток, которые были проанализированы: MSC — мезенхимальные стволовые клетки; фибробласты; хондроциты, пролиферирующие хондроциты, предгипертрофические хондроциты, TDHC — терминально дифференцированные хондобласты; ранние остеобласты, зрелые остеобласты, преостеоциты, ранние остециты, остеокласты. Клетки сосудистой сети: SEC — синусоидальные эндотелиальные клетки, AS — эндотелиальные клетки артериол, переходные зоны метафиза, соединяющие артериолы с синусоидами, SMC — гладкомышечные клетки.

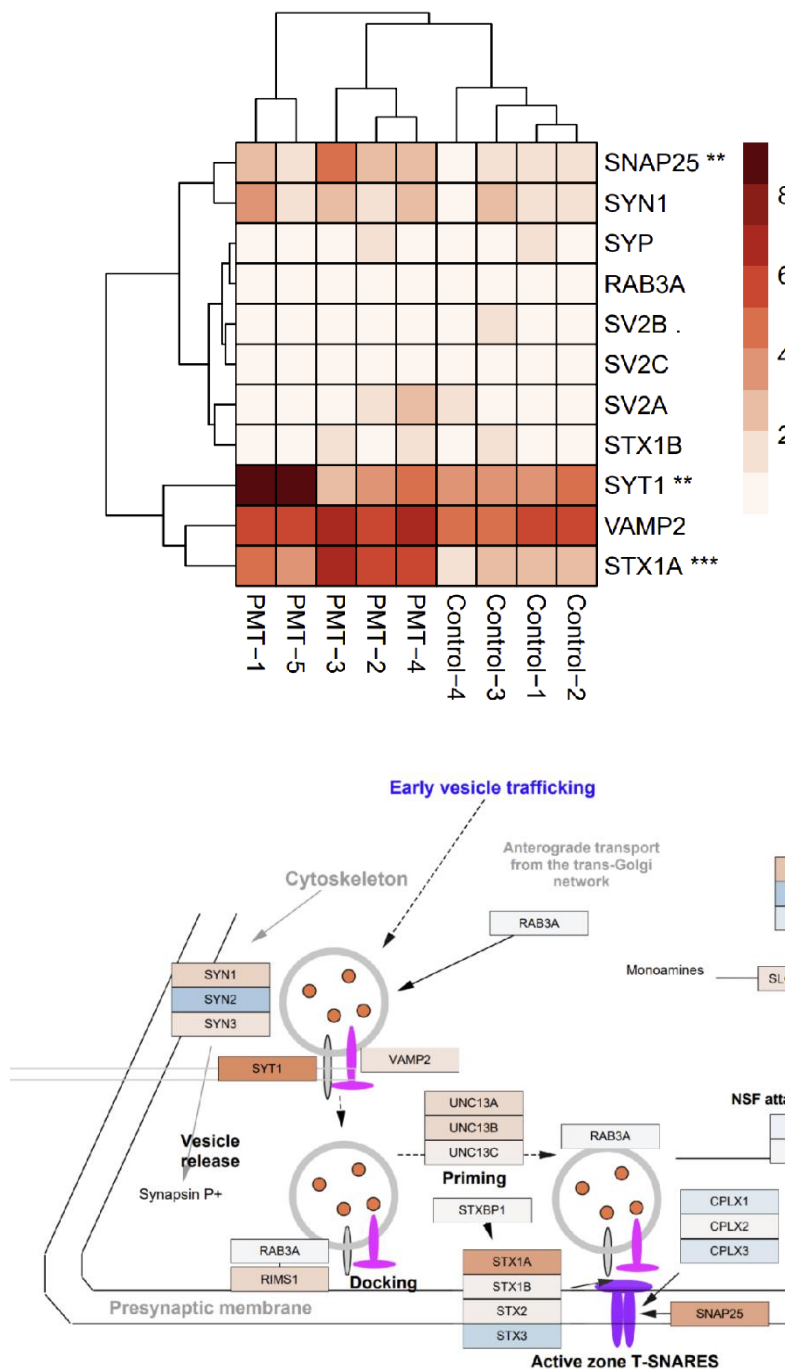


Рисунок 29 — Функция белков — продуктов генов SNARE-комплекса. Гены, связанные с везикулами, разделяют образцы на здоровые и больные, есть значимые (*SNAP25*; *SYT1*; *STX1A*). Значимые гены представляют собой механизм секреции везикул в пресинаптическую щель SNARE complex, считающийся наиболее быстрым и эффективным механизмом экзоцитоза везикул, особенно в секреторных клетках. Данные белки осуществляют экзоцитоз и представляют потенциальный механизм опухолевой секреции

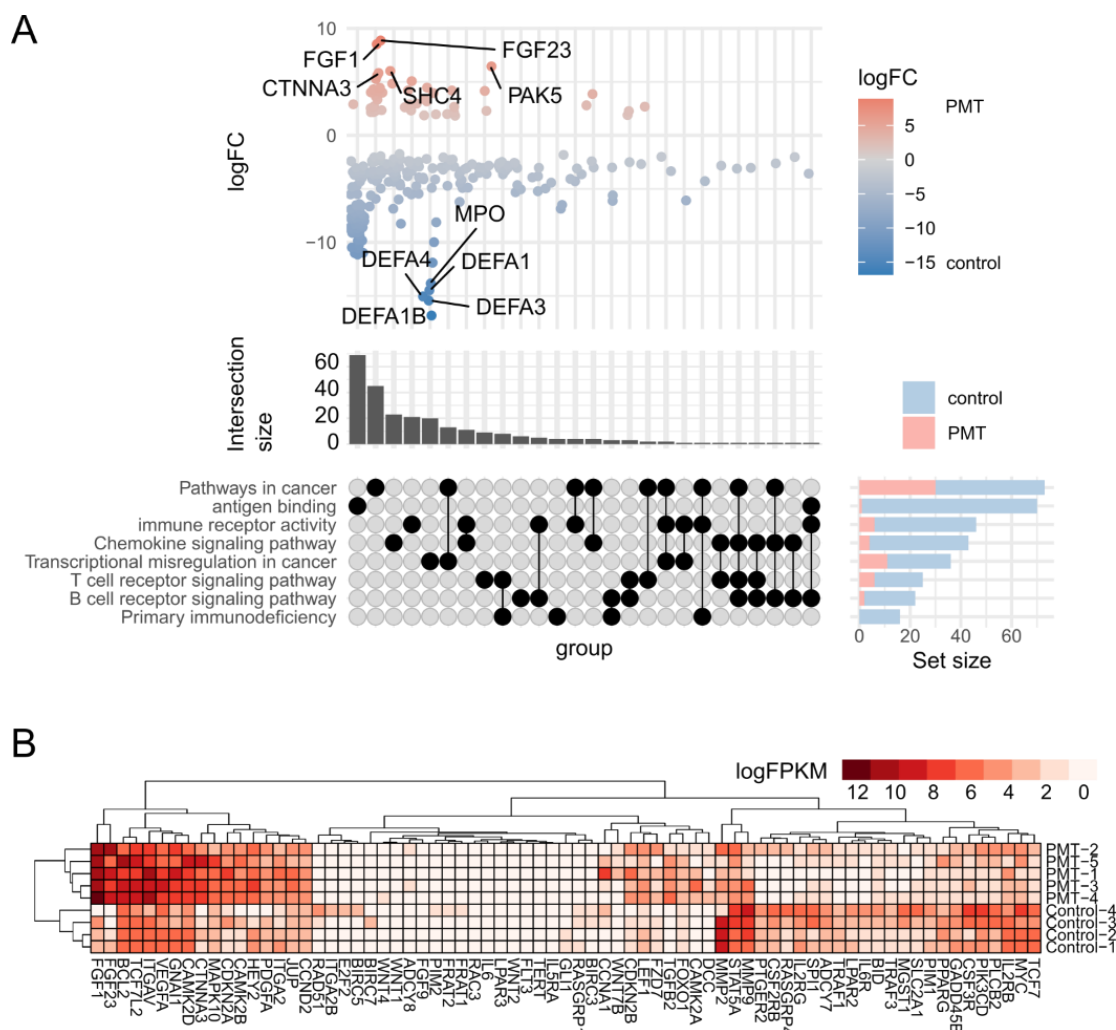


Рисунок 30 — Взаимосвязи и экспрессия генов, ассоциированных с иммунной системой в опухолевых и контрольных образцах. (А) Взаимодействие между генами, ассоциированными с иммунной системой, со значительными изменениями экспрессии при сравнении опухолей с контролем ($FDR < 0,05$, $|\log FC| > 2$). (В) Экспрессии генов, ассоциированных с онкологией

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Клинические характеристики пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями

Данная работа представляет собой первое исследование в России, посвященное анализу пациентов с ФРФ-23-секретирующими опухолями. Основная цель — изучить клинические, диагностические и транскриптомные характеристики пациентов с ФРФ-23-секретирующими образованиями. Ограничением настоящего исследования является объем выборки, что связано с редкостью изучаемого заболевания. Репрезентативность выборки оценена по распределению пола, возраста, диагностики. По нашим данным, медиана возраста на момент постановки диагноза 46 [37; 62], что согласуется с другими исследованиями [23]. По результатам предыдущих работ, ФРФ-23-опухоль встречается приблизительно одинаково у мужчин и у женщин [39], с чем согласуются и данные, полученные в настоящей работе. Диагноз верифицируется спустя 6 лет после появления симптомов, что является длительным сроком, и у пациентов успевают развиваться осложнения заболевания, переломы, мышечная слабость, выраженный болевой синдром. В Китае и Японии диагноз верифицируется быстрее, а именно спустя 2,9 и 2,4 года соответственно [30, 39]. Поздняя диагностика может быть связана с тем, что у врачей недостаточно информации, так как данное заболевание является орфанным, клинические проявления неспецифичны, особенно вначале заболевания, людям с патологией костной системы редко оценивают концентрацию фосфора в крови. Наконец, в России пока недоступно определение ФРФ-23. Поздняя диагностика и стремительное прогрессирование заболевания приводят к выраженному снижению качества жизни пациентов, что проявляется изнуряющим болевым синдромом, неспособностью самостоятельно передвигаться и заниматься повседневной деятельностью, нарастанием тревожности и депрессии.

По результатам дооперационного лабораторно-инструментального обследования у пациентов зафиксированы: гипофосфатемия (100%), снижение

индекса тубулярной реабсорбции фосфатов (100%), высокие концентрации иФРФ-23 в крови (97%), повышение щелочной фосфатазы (66%), повышение паратиреоидного гормона (30%), на фоне нормокальциемии (84%), нормального уровня креатинина крови и СКФ (100%). Любопытно, что у 30% выявлено повышение ПТГ, а патогенез данного состояния является предметом изучения и почвой для дифференциальной диагностики. Снижение фосфора крови в сочетании с поражением костного аппарата встречается как при первичном (ПГПТ), так и при вторичном гиперпаратиреозе (ВГПТ). Чаще всего ВГПТ обусловлен дефицитом витамина D (D-гормона, или 1,25(OH)D₃), однако избыточные концентрации ФРФ-23 приводят именно к дефициту активного метаболита витамина D, что влечет за собой развитие ВГПТ. Кроме того, в литературе описано, что кальций-чувствительные рецепторы способны перекрестно реагировать на гипофосфатемию и увеличивать секрецию ПТГ. Если такая ситуация сохраняется длительно (учитывая позднюю диагностику ФРФ-23-опухолей), то развивается гиперплазия околощитовидных желез и может сформироваться третичный гиперпаратиреоз [79].

В работе анализировались размеры и расположение ФРФ-23-продуцирующих образований. Локализации соответствуют зарубежному опыту, т.е. обычно опухоли малых размеров: в 73% (27/37) до 2 см располагаются внутрикостно либо в мягких тканях [23].

Метод выбора лечения ФРФ-23-опухоли — хирургическое иссечение. Выполнение операции требует высокой квалификации онкохирурга в специализированном отделении. Успех хирургического лечения в значительной степени зависит от местоположения опухоли. Широкая резекция предпочтительна, поскольку она ассоциируется с наивысшим процентом биохимической ремиссии: в нашем исследовании этот показатель составляет 90% (26 из 29), в Японии, согласно ретроспективному наблюдению, 93,8% (15 из 16) [39]. В случаях, когда широкая резекция невозможна, рассматривается эффективность краевой резекции. В нашем исследовании ремиссию достиг 1 из 2 оперированных пациентов, в Японии этот

показатель составил 15 из 23 (ретроспективное наблюдение). Данные о выскабливании, согласно нашему опыту, не продемонстрировали эффективности (0 из 2). Исходя из нашего и зарубежного опыта, мы не рекомендуем проведение предоперационной биопсии, так как она может быть ассоциирована с риском развития метастазов. В качестве альтернативы в зарубежных исследованиях предлагается проводить селективный забор крови из вен, оттекающих от опухоли и от симметричного участка, с последующим определением концентраций ФРФ-23 [23, 80].

Гистологические признаки многообразны. Наиболее часто опухоль представлена мелкими клетками с выраженной сосудистой сетью, много межклеточного матрикса. Наиболее специфическим, однако нечасто встречающимся, является наличие грубодисперсных кальцинатов. Также в зависимости от локализации опухоли могут встречаться эпителиальные элементы (в опухолях нижней челюсти), очаги липоматоза (в опухолях, расположенных в мягких тканях). В литературе описаны случаи обнаружения ФРФ-23-опухолей не только в костях и в мышцах, но в жировой и в других тканях [57, 81].

Все пациенты лечились консервативно препаратами альфакальцидола и колекальциферола, что позволило добиться уменьшения симптомов. Более половине пациентов (66%) были назначены препараты солей фосфатов. Биохимическую ремиссию удалось достичь только у небольшой части пациентов 8/44 (18%).

Реабилитация пациентов с ФРФ-23-опухолью представляет интерес, особенно состояние и динамика восстановления костной и мышечной масс. При достижении ремиссии в результате хирургического лечения регистрируется восстановление уровня фосфора крови 27/27 (100%), болевой синдром снижается 27/27 (100%), улучшается мобильность пациентов (передвижение без средств опоры 20/27 (74%)), отсутствуют новые переломы, отмечается прирост МПК и значительно улучшается качество жизни у 27/27 (100%), что соответствует и зарубежному опыту [23].

4.2 Предоперационная диагностика ФРФ-23-секретирующих опухолей

В качестве стандартных методов визуализации при топической диагностике ФРФ-23-продуцирующих опухолей в клинической практике применяют МСКТ или МРТ всего тела с контрастированием. Однако у опухолей нет специфических лучевых признаков, они обычно имеют малые размеры и могут локализоваться по всему телу. При анализе обнаружена низкая чувствительность и специфичность МСКТ и МРТ, что не позволяет использовать их в качестве самостоятельных методов диагностики.

На поверхности ФМО в 50-70% обнаруживаются соматостатиновые рецепторы, на чувствительности к которым основаны методы функциональной визуализации, такие как соматостатин-рецепторная сцинтиграфия, точность которой значительно улучшается при комбинации с ОФЭКТ/КТ. В Российской Федерации зарегистрирован РПП 99mTc-EDDA/HYNIC-TOC (99mTc-тектротид) для визуализации образований с гиперэкспрессией соматостатиновых рецепторов (SSTR). Результаты проведенного исследования демонстрируют информативность метода соматостатин-рецепторной сцинтиграфии с ОФЭКТ/КТ с 99mTc-тектротидом, обладающей более высокой чувствительностью по сравнению с МРТ и МСКТ. Таким образом, метод функциональной визуализации может быть рекомендован к проведению в первой линии диагностики ФРФ-23-опухолей.

В качестве примера практического применения описанного метода приведена демонстрация клинического случая № 1. У пациента И. был установлен диагноз ФРФ-23-секретирующая опухоль на основании лабораторных и клинических данных. Однако на этапе топической визуализации опухоли возникли трудности дифференциальной диагностики. Согласно данным МРТ, определялся очаг в нижней челюсти, а по данным МСКТ определялось 2 очага: в челюсти и в стопе, что нехарактерно для ФМО. Установление топики образований произошло благодаря соматостатин-рецепторной сцинтиграфии с 99mTc-тектротидом.

Именно этот метод позволил локализовать опухоль, определить тактику хирургической операции и положительный исход лечения.

4.3 Дифференциальная диагностика ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии

ФРФ-23 является многообещающим биомаркером, поскольку это белковый гормон, обладающий мощным действием. Кроме того, изменения концентраций ФРФ-23 ассоциированы со смертностью пациентов, находящихся на гемодиализе [82]. Разработано несколько лабораторных наборов, позволяющих измерить уровень ФРФ-23 в крови [82]. Известно, что ФРФ-23 является стабильным и крупным пептидом, точность анализов приемлема, однако лабораторные тесты не стандартизированы и, следовательно, несопоставимы, а референтные значения и точки разделения разработаны не для всех наборов [83]. Работ по сравнению диагностической эффективности различных тест-систем мало [82, 84, 85]. Настоящее исследование является первой подобной работой в России. Для исследования использовали выборки пациентов с нарушениями обмена фосфора. В целом акромегалия приводит к повышению уровней сывороточного фосфора [86]. ФРФ-23-опухоль приводит к его снижению. Схожие результаты были получены и в нашем исследовании. В данной работе проведен анализ двух лабораторных наборов для измерения интактной формы ФРФ-23 и одного лабораторного набора для измерения С-концевой формы ФРФ-23 с целью выявить наилучший диагностический тест для диагностики ФРФ-23-секретирующей опухоли. Наша работа продемонстрировала, что анализ иФРФ-23 (BI-20700) имел наибольшую площадь под AUC-кривой по сравнению с другими исследуемыми наборами при диагностике нарушений обмена фосфора.

Далее этот набор был использован для поиска отрезных точек при диагностике ФРФ-23-секретирующей опухоли и в целом ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии. Наблюдались различия в уровнях иФРФ-23 при сравнении групп с ФРФ-23-зависимой гипофосфатемией и ФРФ-23-независимой гипофосфатемией ($p = 0,0001$). Среди пациентов с ФРФ-23-зависимой гипофосфатемией наблюдались

значимые различия уровня иФРФ-23 внутри группы. Так, у пациентов с ФРФ-23-опухолью медиана концентраций иФРФ-23 была значимо выше, чем при генетических заболеваниях и составила 154 [56; 310] против 28 [19; 40] пг/мл ($p < 0,0001$).

Примечательно, что в группе здоровых добровольцев, уровень иФРФ-23 составлял 13,9 [4,6; 26] пг/мл и был несколько выше, чем в группе ФРФ-23-независимой гипофосфатемии 10 [4; 17] (p -value 0,177). Схожее наблюдение сделали и зарубежные коллеги [87]. Полученные данные свидетельствует, что при ФРФ-23-независимой гипофосфатемии уровень иФРФ-23 в крови снижается благодаря компенсаторным механизмам в ответ на гипофосфатемию. Однако это требует уточнения на больших выборках.

Целевой популяцией для измерения ФРФ-23 выступают, в первую очередь, лица с гипофосфатемией. Однако, определение фосфора не всегда доступно. Кроме того, многие опухоли, потенциально, могут приобретать секрецию ФРФ-23. В связи с этим в расчёт точки разделения была включена группа сравнения - лица с нормофосфатемией. Видно, что при учете только пациентов с гипофосфатемией, точки разделения снижены, ввиду обратной связи между уровнями фосфора и ФРФ-23, это может быть неверно трактовано при отсутствии измерения фосфора в крови. При поиске отрезной точки для диагностики ФРФ-23-опухоли предложена точка отсечения 37,45 пг/мл с чувствительностью 93% и специфичностью 84%. На сегодняшний день опубликовано несколько работ, предлагающих использовать точку отсечения 30 пг/мл [88, 89] с чувствительностью 99% и специфичностью 100% для выявления ФРФ-23-опосредованного заболевания, а также точку отсечения в 27 пг/мл для ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии, обладающей 100% чувствительностью и специфичностью, согласно работе Iris R. Hartley с соавт. [87]. В данной работе предложенные точки разделения обладают меньшей чувствительностью и специфичностью: 27 пг/мл чувствительность 85%, специфичность 74%; 30 пг/мл чувствительность 76%, специфичность 76%. В проведенном исследовании предлагается точка разделения 28,23 пг/мл

(чувствительность 85% и специфичность 75%) для дифференциальной диагностики ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии как среди здоровых, так и среди пациентов с гипофосфатемией. А для выявления ФРФ-23-зависимого заболевания среди пациентов с синдромом гипофосфатемии предложена точка разделения 24,23 пг/мл (чувствительность 86% и специфичность 93%).

Таким образом, определение иФРФ-23 обладает высокой диагностической значимостью для выявления ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии и может использоваться, особенно у пациентов с ФРФ-23-секретирующей опухолью.

В качестве примеров практического применения описанного метода приведена демонстрация клинических случаев № 2, № 3. У обеих пациенток Р. и Г. наблюдалась похожая клиническая картина со множественными переломами, очагами в костях. Лабораторно у обеих наблюдались гипофосфатемия, повышение щелочной фосфатазы, сниженный индекс тубулярной реабсорбции фосфатов, повышение паратиреоидного гормона. Дифференциальную диагностику необходимо было проводить между опухоль-индуцированной остеомалацией, гиперпаратиреоидной остеодистрофией, остеосаркомой и скелетными метастазами. После проведения биопсии онкологический процесс в костях был исключен. Инструментальные высокочувствительные тесты с применением радиофармпрепаратов оказались недостаточно специфичными и не позволили однозначно верифицировать диагноз. Установление верного диагноза состоялось благодаря измерению уровня иФРФ-23 в сыворотке крови. Именно высокий уровень иФРФ-23 (4588 пг/мл) в сыворотке крови позволил диагностировать опухоль-индуцированную остеомалацию у пациентки Р, а неопределяемо низкий уровень иФРФ-23 позволил диагностировать гиперпаратиреоз у пациентки Г. В результате каждый пациент получил патогенетическое лечение, которое привело к ремиссии основного заболевания.

Исследование уровня сывороточных концентраций альтернативных биомаркеров у пациентов с нарушениями фосфорного обмена не выявило статистически значимых различий: липокалин-2 ($p = 0,16$), склеростин ($p = 0,12$).

Данные об изменении их уровней при нарушениях костного метаболизма (в том числе нарушений фосфорного обмена) были получены ранее [90–93]. Отсутствие фиксируемых изменений в нашем исследовании может являться следствием недостаточного размера выборки. Поиск других биомаркеров, которые отражали бы вовлеченность костной и мышечной тканей при нарушениях фосфорного обмена, остается актуальным.

4.4 Транскриптомное исследование ФРФ-23-секретирующих опухолей

Впервые в мире проведен транскриптомный анализ РНК единичных клеток ФРФ-23-опухолей ($n = 2$). Впервые в России проведен транскриптомный анализ тотальной РНК ФРФ-23-опухолей ($n = 5$) по сравнению с окружающей костной тканью ($n = 4$). Полученные данные согласуются друг с другом. Опухоли имеют схожий профиль дифференциально экспрессированных генов, что отражает их специфический, сходный фенотип. Интересно, что предыдущие исследователи, в частности Folpe с соавт. отмечали схожее гистологическое строение, несмотря на различные локализации образований. Данная работа подтверждает этот вывод, но на молекулярно-генетическом уровне. Продемонстрировано, что даже ФРФ-23-опухоли в мягких тканях экспрессируют маркеры остеоцитов (*FGF23*, *DMP1*, *ENPP1*, *PHEX*, *GALNT3*, *DSPP*, *MEPE*, *ANKH*), что отражает направление дифференцировки клеток из мезенхимальных в костные.

В опухолях обнаружено 7 клеточных кластеров, в том числе уникальный опухолевый кластер с гиперэкспрессией специфических генов, включая *FGF23*. В первую очередь это экспрессия генов *SLC30A3* и генов SNARE-комплекса, осуществляющих экзоцитоз биологически активных веществ из везикул клетки в кровь, что может раскрывать механизм опухолевой секреции ФРФ-23. Также были обнаружены новые специфические мембранные белки, которые могут быть использованы в качестве диагностических мишеней. В опухоли обнаружена гиперэкспрессия генов, активирующихся в остеоцитах при высоком уровне

фосфатов в крови. Это свидетельствует о потере отрицательной обратной связи в опухолевых клетках, секретирующих ФРФ-23.

Основной причиной опухоль-индуцированной остеомалиции является гормон ФРФ-23 [44, 52]. Тяжесть симптомов и системная остеомалиция в первую очередь обусловлены секреторной функцией опухоли, в то время как медленный рост имеет меньшее значение. Однако точный механизм, лежащий в основе гормональной секреции неизвестен. Мы обнаружили, что одним из максимально экспрессируемых генов ФМО является *SLC30A3*. Уровень экспрессии *SLC30A3* был близок к нулю в контроле и выраженно экспрессировался во всех образцах опухолей (данные Bulk seq), а наибольшая экспрессия наблюдалась именно в опухолевом кластере (данные Single Cell seq). Белок, синтезируемый с гена *SLC30A3*, является транспортером ионов цинка (Znt3), и он специфичен для синаптических везикул [60, 94]. В целом известно несколько Zn-транспортеров ((ZIP — Zn-импортирующие белки (*SLC39A*)) и Zn-экспортирующие белки (ZnT (*SLC30A*)). Однако среди всех них только ZnT3 дифференциально активен в опухоли. ZnT3 малоэкспрессирован в тканях организма, известно, что он активен в инсулин-секретирующих β -клетках, а его блокада связана со снижением секреции инсулина и увеличением апоптоза клеток, а также в синаптических везикулах Zn-зависимых нейронов в мозге [60, 94]. Синаптические везикулы содержат специализированный белковый комплекс SNARE, осуществляющий экзоцитоз биологически активных веществ из везикул клетки в кровь [95]. Мы выявили значительную активацию трех ключевых генов, связанных с этим комплексом: синаптотагмина 1 (SYT1), синтаксина 1A (STX1A) и белка 25, ассоциированного с синаптосомой (SNAP25). Комплекс SNARE описан в литературе как наиболее активный и быстрый механизм секреции, характерный для гормон-секреторных клеток.

ZnT3 ведет именно к везикулам, которые секретируются через SNARE механизм как в нейронах и, видимо, именно в эти везикулы включается ФРФ-23 для секреции. Это также подтверждается тем, что гены *SNAP25*, *SYT1*, *STX1A*,

связанные с везикулами и SNARE-механизмом, имеют выраженные изменения активности и разделяют образцы на опухолевые и здоровые. Предположительно, ингибирование SNARE-механизма может остановить секрецию ФРФ-23 и привести к апоптозу клеток.

В предыдущих исследованиях сообщалось об активации рецептора FGFR1 и его сигнального пути [96–99]. FGFR1 приводит в действие слияние генов *FN1-FGFR1*, *FN1-FGF1*, которые были обнаружены почти у половины ФМО, и эти изменения описаны очень подробно [54–56, 58]. Ученые предполагают, что ФРФ-23 взаимодействует с FGFR1 в опухоли, что активирует туморогенез [53]. Однако, остается часть ФМО, где не были найдены слияния генов. Для этой подгруппы ФМО ученые выявили экспрессию белка KLOTNO, которая ассоциирована с генетическими перестройками, такими как транслокация хромосомы 13, что приводит к нарушению пространственного положения между геном *KL* (предшественник белка KLOTNO) и его энхансером [57, 58]. Поскольку KLOTNO действует как ко-фактор для FGFR1, то также формируется комплекс FGF23-FGFR1/KLOTNO, активирующий сигнальный путь FGFR1 [53, 100]. Тем не менее остаются ФМО, в которых не найдены ни химерные гены, ни экспрессия KLOTNO, и механизм секреции ФРФ-23 остается неясным.

Согласно нашим данным, были найдены слияния генов *FN1:FGF1*, $n = 2/7$, гиперэкспрессия *KLOTNO*, $n = 3/7$, а в двух образцах изменения не идентифицированы, однако экспрессия *FGF23* и белков SNARE-комплекса наблюдалась везде.

С клинической точки зрения существует необходимость улучшить диагностику, поскольку до сих пор до 27% опухолей остаются нелокализованными [39]. В настоящее время методы функциональной визуализации используют рецепторы соматостатина 2А типа (SSTR2A) для определения локализации опухоли, что было внедрено и в настоящей работе. Однако не все ФМО экспрессируют SSTR2A. Кроме того, SSTR2A также экспрессируются в зонах переломов, которые крайне характерны для остеомалации. Был проведен анализ

поверхностных, мембранных белков опухоли, чтобы найти различия между ФМО и окружающей, остеомалатической костной тканью. Мы идентифицировали *PHEX*, *PCDH7*, *RAMP1*, *CD44*, *NRG3*, *PCDH9*, *FGFR1*, *ENPP1*. Представленные гены могут служить ценными диагностическими мишенями для визуализации опухолей

Предыдущие исследователи показали, что ФМО экспрессирует гены, участвующие в костном и минеральном обмене: *DMP1*, *FN*, *MEPE*, *Pit1* [44]. В данном исследовании подтверждена эта концепция. Интересно, что найденные гены характерны именно для остеоцитов, активирующихся при высоких концентрациях фосфора: *FGF23*, *DMP1*, *PHEX*, *ENPP1*, *ANKH*, *GALNT3*, *DSPP*, *MEPE*, *FGF1*. Физиологически остециты ответственны за выработку ФРФ-23 путем активации секреции в ответ на высокие концентрации фосфатов в крови. Известно несколько генетических маркеров остеоцитов [43, 101]. Мы обнаружили их высокую экспрессию в образцах ФМО (рисунок 28). Можно заключить, что опухолевые клетки подобны остецитам, экспрессирующим гены, связанные с ФРФ-23. Интересно, что в недавнем исследовании, где провели секвенирование РНК единичных клеток мышинных костей, выявило субпопуляцию остеоцитов, ответственных за экспрессию ФРФ-23 [102]. Таким образом, этот специфический тип клеток может быть потенциальной мишенью для таргетного лечения.

Секреция гормонов контролируется стимулирующим фактором и системой отрицательной обратной связи. Для секреции ФРФ-23 основным стимулом является высокая концентрация фосфатов в крови. У пациентов с ФМО наблюдается тяжелая гипофосфатемия наряду с активацией генов, индуцирующих секрецию ФРФ-23. Это свидетельствует о потере механизма отрицательной обратной связи между уровнем фосфата и секрецией ФРФ-23 в опухолевых клетках. Мы изучили гиперэкспрессированные гены в опухоли по данным Bulk-RNA sequencing, которые могут участвовать в регуляции чувствительности опухоли к фосфатам. Описано, что в многоклеточных организмах чувствительность к фосфату регулируется с помощью транспортеров фосфора

(PIT1, PIT2), трансформирующего фактора роста β (TGF β), и различных гормонов, таких как ПТГ, кальцитриол, адреналин.

PIT1 (SLC20A1) высоко экспрессирован в опухоли, а в тканях организма экспрессирован реже, чем *FGFR1*. Соответственно, это предполагает потенциально более низкую токсичность ингибиторов PIT1 по сравнению с ингибиторами пан-FGFR. Хотя экспериментально не подтверждена связь между PIT1-FGF23, но, согласно базе данных STRING, предполагаются их функциональные взаимосвязи. Поэтому изучение PIT1 в качестве потенциальной мишени для терапии ФМО представляется актуальным.

TGF β 2 регулирует поступление фосфатов внутрь клетки, увеличивая экспрессию *PIT1* [102]. Кроме того, эксперименты на клеточных линиях остеобластов (UMR106), хондроцитах (ATDC5) и на мышах показали, что сигналы от TGF β стимулируют экспрессию *FGF23* [102, 103]. Сигнал от TGF β передается каноническим и неканоническим путем. В наших данных не было найдено изменений активности генов, участвующих в канонической передаче сигнала от TGF β 2 (TGF β R2, TGF β R1, Smad2, Smad3, Smad4). Однако были идентифицированы изменения в неканоническом пути TGF β 2 — Orai1/STIM1, SOCE. Проводились эксперименты, которые показали, что синтез ФРФ-23 в остеоцитах активируется за счет кальций-зависимого пути (store-operated Ca²⁺ entry: SOCE). TGF- β 2 усиливает SOCE через активируемый высвобождением кальция кальциевый канал (CRAC) Orai1/Stim1 и может стимулировать выработку ФРФ-23 [102, 103]. Мы обнаружили измененные экспрессии *Orai1*, *TGF- β 2*, *NFATC1*, *STRIT1*, *VEGFA*, *ERBB4*, *SYT12*, *PCDH7*, а также в целом изменения в кальций-зависимой передаче сигнала (calcium signaling pathway (KEGG p.adj 0.0004) and calcium ion binding (GO p.adj 5.93e-06), что может свидетельствовать об их вовлеченности в патогенез ФМО.

VDR — внутриядерный рецептор кальцитриола также был гиперэкспрессирован в опухолях. Известно, что кальцитриол регулирует экспрессию генов, участвующих в метаболизме кальция и фосфата. Можно

заклучить: во-первых, гиперэкспрессия *VDR* может быть ассоциирована с секрецией опухолью ФРФ-23, а во-вторых, терапия пациентов активными формами метаболита D может влиять не только симптоматически на течение заболевания, но и на опухолевую ткань, оказывая свое действие на рецептор *VDR*.

В опухолях наблюдалась значительная экспрессия генов, связанных с активностью и дифференцировкой остеобластов, включая хорошо известные маркеры, такие как *RANKL* и *OPG*. Мы предполагаем, что избыточная экспрессия *RANKL/OPG* была маркером остеобластов/остеоцитоподобных клеток и отражает сущность опухоли.

Также в опухоли активированы гены, ответственные за эпителиально-мезенхимальный переход при злокачественных новообразованиях. Несмотря на доброкачественную природу опухоли, наблюдалась экспрессия генов, ассоциированных с канцерогенезом и кастрационно-резистентным раком предстательной железы: *CD44*, *TLAM1* и *CENPK* [104].

Необходимы экспериментальные исследования для проверки выдвинутых в настоящем исследовании гипотез и разработки новых подходов к терапии и диагностике ФРФ-23-секретирующих опухолей.

Таким образом, выявлены характерные особенности ФРФ-23-опухолей. Обнаружен специфический фенотип опухоли, включающий гиперэкспрессию генов, ассоциированных с остеоцитами, секретирующими ФРФ-23 (*FGF23*, *DMP1*, *ENPP1*, *PHEX*, *GALNT3*, *DSPP*, *MEPE*, *ANKH*), потерявшими отрицательную обратную связь с уровнем фосфора; гиперэкспрессию генов, ответственных за экзоцитоз (*SLC30A3*, *SYT1*, *STX1A*, *SNAP25*); а также экспрессию специфических мембранных белков (*PHEX*, *PCDH7*, *RAMPI*, *CD44*, *NRG3*, *PCDH9*, *FGFR1*, *ENPP1*). Обнаруженные мишени могут потенциально быть использованы для блокировки секреции ФРФ-23, индукции апоптоза, таргетной визуализации и требуют дальнейших исследований по разработке новых методов диагностики и терапевтического воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения диссертационной работы впервые в России изучены эндокринные проявления опухолей, секретирующих ФРФ-23. Сочетание клинических симптомов: возраст манифестации старше 40 лет (77%), наличие переломов (100%), выраженного болевого синдрома (95%), мышечной слабости (91%), неспособность передвигаться без средств опоры (93%), лабораторных проявлений, таких как гипофосфатемия (100%), снижение индекса тубулярной реабсорбции фосфатов (100%), высокие концентрации иФРФ-23 в крови (97%), повышение щелочной фосфатазы (66%), повышение паратиреоидного гормона (30%), на фоне нормокальциемии (84%), нормального уровня креатинина крови и СКФ (100%) — патогармонично для паранеопластического процесса вследствие избыточной секреции ФРФ-23. Опухоли малых размеров: в 73% (27/37) до 2 см, локализуются преимущественно в нижних конечностях (61%), в области головы (18%). Хирургическое иссечение в пределах здоровых тканей приводит к наивысшей частоте ремиссии (26/29, 90%). При достижении ремиссии регистрируется восстановление уровня фосфатов в крови 27/27 (100%), болевой синдром снижается 27/27 (100%), улучшается мобильность пациентов (передвижение без средств опоры 20/27 (74%)), отсутствуют новые переломы, отмечается прирост МПК и значительно улучшается качество жизни у 27/27 (100%). Терапия препаратами альфакальцидола, колекальциферола и фосфора позволяет добиться уменьшения симптомов.

В рамках работы внедрен метод соматостатин-рецепторной сцинтиграфии в режиме ОФЭКТ для топической диагностики опухолей, секретирующих ФРФ-23, что позволяет значительно оптимизировать визуализацию. Наибольшей диагностической чувствительностью для визуализации ФРФ-23-продуцирующей опухоли обладает метод сцинтиграфии с ^{99m}Tc -тектротидом с ОФЭКТ/КТ.

Впервые в ходе диссертационной работы проведен анализ диагностических возможностей тест-систем для измерения ФРФ-23 в крови и выбран наиболее информативный тест — Biomedica BI-20700 ($\text{AUC} = 0,966$). Далее с помощью

выбранного набора исследованы пациенты с гипофосфатемией, а также группа здоровых добровольцев. Предложены точки разделения концентраций ФРФ-23 для диагностики ФРФ-23-зависимой гипофосфатемии вследствие опухоли — 37,45 пг/мл ($AUC = 0,931$) (чувствительность 93%; специфичность 84%). Полученные результаты обладают практической значимостью и позволяют оптимизировать дифференциальную диагностику пациентов с ФРФ-23-секретирующей опухолью.

Наконец, используя результаты транскриптомного анализа РНК единичных клеток в совокупности с анализом тотальной РНК, исследованы основные характеристики ФРФ-23-секретирующих опухолей. Установлено, что опухоли имеют схожий профиль экспрессии. В опухолях экспрессируются гены, ассоциированные с остеоцитами, секретирующими ФРФ-23 в условиях гиперфосфатемии (*FGF23*, *DMP1*, *ENPP1*, *PHEX*, *GALNT3*, *DSPP*, *MEPE*, *ANKH*), что отражает сущность опухолевых клеток. В опухолях экспрессируются гены, ответственные за экзоцитоз (*SLC30A3*, *SYT1*, *STX1A*, *SNAP25*), что может представлять механизм секреции ФРФ-23. Найдены специфические мембранные белки (*PHEX*, *PCDH7*, *RAMP1*, *CD44*, *NRG3*, *PCDH9*, *FGFR1*, *ENPP1*).

Полученные в ходе работы результаты демонстрируют важность диагностики гиперэкспрессии неклассического гормона костной ткани ФРФ-23, который определяет тяжелую (патологические переломы, обездвиженность) и потенциально летальную клиническую симптоматику пациентов. Метод соматостатин-рецепторной сцинтиграфии всего тела в режиме ОФЭКТ и исследование интактного ФРФ-23 в крови позволяют оптимизировать диагностику ФРФ-23-секретирующих опухолей. Совокупность изученных признаков определяет уникальный профиль опухоли, дает новое представление о мишенях для терапевтических вмешательств при ФРФ-23-секретирующих опухолях.

ВЫВОДЫ

1. Клинические проявления опухолевой секреции ФРФ-23 включают в себя сочетание наличия патологических (низкотравматичных) переломов у 44/44 (100%), болевого синдрома в костях 42/44 (95%), низкой работоспособности скелетной мускулатуры и необходимости использовать средства опоры при передвижении 40/44 (91%), обусловленные гипофосфатемией 44/44 (100%) и низким индексом тубулярной реабсорбции фосфора 44/44 (100%).

2. Хирургическое иссечение в пределах здоровых тканей ФРФ-23-секретирующих опухолей приводит к частоте ремиссии 26/29 (90%). Консервативная терапия метаболитами активной формы витамина D, солями фосфора калия дигидрофосфата и натрия двухосновного фосфата позволяет добиться уменьшения жалоб у большинства 40/44 (91%), однако к биохимической ремиссии приводит у небольшой части пациентов 8/44 (18%).

3. Наибольшими диагностическими возможностями для визуализации ФРФ-23-продуцирующих опухолей обладает метод сцинтиграфии с применением РФП на основе октреотида с ОФЭКТ/КТ, обладающий большей чувствительностью 84% по сравнению с МРТ (чувствительность 54%) и МСКТ (чувствительность 40%).

4. Диагностическая информативность теста, определяющего интактную форму ФРФ-23 в сыворотке крови у пациентов с ФРФ-23-опухолью по критерию площади под кривой, является арифметически наибольшей ($AUC = 0,931$), по сравнению с определением с-концевого пептида ФРФ-23 ($AUC = 0,826$). Для диагностики ФРФ-23-опухоли среди пациентов с гипофосфатемией и группы контроля точка разделения теста для измерения интактной формы ФРФ-23 составила 37,45 пг/мл с чувствительностью 93% и специфичностью 84%.

5. Уровни секреторных белков костной ткани склеростина и липокалина-2 не отличаются у пациентов с нарушением обмена фосфора вследствие избыточной секреции ФРФ-23 и ИРФ-1.

6. Транскриптомные характеристики опухолей, секретирующий ФРФ-23, включают в себя экспрессию генов, ассоциированных с остеоцитами, секретирующими ФРФ-23 (*FGF23*, *DMP1*, *ENPP1*, *PHEX*, *GALNT3*, *DSPP*, *MEPE*, *ANKH*); экспрессию генов, ответственных за экзоцитоз (*SLC30A3*, *SYT1*, *STX1A*, *SNAP25*); экспрессию специфических мембранных белков (*PHEX*, *PCDH7*, *RAMP1*, *CD44*, *NRG3*, *PCDH9*, *FGFR1*, *ENPP1*).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с низким уровнем фосфора крови в сочетании с развитием поражения опорно-двигательного аппарата (переломы, миопатия) целесообразно обследование для исключения ФРФ-23-индуцированной остеомалации.
2. Пациентам с установленной ФРФ-23-продуцирующей опухолью по данным лабораторных и клинических тестов оптимально проведение соматостатин-рецепторной сцинтиграфии, совмещенной с ОФЭКТ/КТ, в качестве первой линии топической диагностики.
3. Исследование интактного ФРФ-23 в сыворотке крови может быть рекомендовано для диагностики ФРФ-23-индуцированной остеомалации.
4. При установленной локализации опухоли пациентам рекомендовано хирургическое иссечение в пределах здоровых тканей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ — аденозинтрифосфорная кислота
- ВАШ — визуальная аналоговая шкала
- ВГПТ — вторичный гиперпаратиреоз
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
- ДИ — доверительный интервал
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДС — диагностическая специфичность
- ДЧ — диагностическая чувствительность
- ИАСМ — индекс аппендикулярной скелетной мускулатуры
- ИГХ — иммуногистохимия
- ИМТ — индекс массы тела
- ИТМ — индекс тощей массы
- ИФА — иммуноферментный анализ
- ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста 1
- иФРФ 23 — интактный фактор роста фибробластов 23
- ИХЛА — иммунохемилюминесцентный анализ
- КТ — компьютерная томография
- МПК — минеральная плотность костей
- МРТ — магнитно-резонансная томография
- МСКТ — мультиспиральная компьютерная томография
- ОР — относительный риск
- ОР — относительный риск
- ОТ — общая точность
- ОФЭКТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография
- ПТГ — паратиреоидный гормон
- ПЦОР — прогностическая ценность отрицательного результата
- ПЦПР — прогностическая ценность положительного результата
- ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография

РИ — референсный интервал

РНК — рибонуклеиновая кислота

РФП — радиофармпрепараты

СКФ — скорость клубочковой фильтрации

сФРФ 23 — с-концевой пептид фактора роста фибробластов 23

ФМО — фосфатурическая мезенхимальная опухоль

ФРФ 23 — фактор роста фибробластов 23

ЩФ — щелочная фосфатаза

ЭХЛА — электрохемилюминесцентный анализ

AUC — area under curve, площадь под кривой

Bulk-RNA-seq — Bulk-RNA-sequencing

DXA — рентгеновская двухэнергетическая остеоденситометрия

FDR — false discovery rate

MDS — multidimensional scaling plot

Me — медиана

N — количество

NGS — next-generation sequencing, высокопроизводительное секвенирование

Q25 — 25 перцентиль

Q75 — 75 перцентиль

ROC-анализ — анализ характеристических кривых

RT-qPCR — reverse-transcription quantitative polymerase-chain reaction,

SSTR2 — somatostatin receptor type 2, рецептор соматостатина 2-го подтипа

SSTR2/SSTR5 —соматостатиновые репеторы 2-го и 5-го подтипов

SSTR5 — somatostatin receptor type 5, рецептор соматостатина 5-го подтипа

Wnt сигнал — канонический Wiggless/β-катенин сигнальный путь

XLH — X-сцепленный гипофосфатемический рахит

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tumor-Induced Osteomalacia / P. Florenzano, I.c.R. Hartley, M. Jimenez [et al.] // *Calcified Tissue International*. — 2021. — Vol. 108. — № 1. — P. 128-142.
2. Peacock, M. Phosphate Metabolism in Health and Disease / Peacock M. // *Calcified Tissue International*. — 2021. — Vol. 108. — № 1. — P. 3-15.
3. Krebs, E. G. Protein Phosphorylation and Metabolic Control / E. G. Krebs, J. T. Stull // *Novartis Foundation Symposia* / eds. G.E.W. Wolstenholme, D.W. Fitzsimons. — Wiley, 1975. — Vol. 31. — P. 355-367.
4. Krebs, E. G. Hosphorylation-dephosphorylation of enzymes / E. G. Krebs, J. A. Beavo // *Annual Review of Biochemistry*. — 1979. — Vol. 48. — № 1. — P. 923-959.
5. Knochel, J. P. Neuromuscular manifestations of electrolyte disorders / J. P. Knochel // *The American Journal of Medicine*. — 1982. — Vol. 72. — № 3. — P. 521-535.
6. Folpe, A. L. Phosphaturic mesenchymal tumors: A review and update / A. L. Folpe // *Seminars in Diagnostic Pathology*. — 2019. — Vol. 36. — Phosphaturic mesenchymal tumors. — № 4. — P. 260-268.
7. Abrahamsen, B. Epidemiology of Tumor-Induced Osteomalacia in Denmark / B. Abrahamsen, C. D. Smith, S. Minisola // *Calcified Tissue International*. — 2021. — Vol. 109. — № 2. — P. 147-156.
8. Epidemiology of Tumor-Induced Osteomalacia in Germany Based on Real World Data / M. May, R. Oheim, L. Bovy [et al.] // *Calcified Tissue International*. — 2023. — Vol. 113. — № 6. — P. 630-639.
9. Tumor-induced Osteomalacia: A Systematic Review and Individual Patient's Data Analysis / D. Rendina, V. Abate, G. Cacace [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2022. — Vol. 107. — Tumor-induced Osteomalacia. — № 8. — P. e3428-e3436.
10. Malignant transformation of phosphaturic mesenchymal tumor: a case report and literature review / N. Oyama, K. Kojima-Ishii, N. Toda [et al.] // *Clinical Pediatric*

Endocrinology. — 2020. — Vol. 29. — Malignant transformation of phosphaturic mesenchymal tumor. — № 2. — P. 69-75.

11. Advanced prostate cancer as a cause of oncogenic osteomalacia: an underdiagnosed condition / M. P. Mak, V. T. Da Costa E Silva, R. M. Martin [et al.] // Supportive Care in Cancer. — 2012. — Vol. 20. — Advanced prostate cancer as a cause of oncogenic osteomalacia. — № 9. — P. 2195-2197.

12. A clinical case of phosphopenic osteomalacia due to paraneoplastic secretion of metastatic prostate cancer / S. A. Gronskeya, O. O. Golounina, Yu. V. Buklemishev [et al.] // Osteoporosis and Bone Diseases. — 2023. — Vol. 25. — № 4. — C. 43-51.

13. Oncogenic osteomalacia and metastatic breast cancer: a case report and review of the literature / C. Savva, J. Adhikaree, S. Madhusudan, K. Chokkalingam // Journal of Diabetes & Metabolic Disorders. — 2019. — Vol. 18. — Oncogenic osteomalacia and metastatic breast cancer. — № 1. — P. 267-272.

14. Ovarian Cancer-Related Hypophosphatemic Osteomalacia—A Case Report / H.-A. Lin, S.-R. Shih, Y.-T. Tseng [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 2014. — Vol. 99. — № 12. — P. 4403-4407.

15. Reinert, R. B. Fibroblast Growth Factor 23-Induced Hypophosphatemia in Acute Leukemia / R. B. Reinert, D. Bixby, R. J. Koenig // Journal of the Endocrine Society. — 2018. — Vol. 2. — № 5. — P. 437-443.

16. Tumor-induced osteomalacia / W. H. Chong, A. A. Molinolo, C. C. Chen, M. T. Collins // Endocrine-Related Cancer. — 2011. — Vol. 18. — № 3. — P. R53-R77.

17. White, K. E. The Roles of Specific Genes Implicated as Circulating Factors Involved in Normal and Disordered Phosphate Homeostasis: Frizzled Related Protein-4, Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein, and Fibroblast Growth Factor 23 / K. E. White, T. E. Larsson, M. J. Econs // Endocrine Reviews. — 2006. — Vol. 27. — The Roles of Specific Genes Implicated as Circulating Factors Involved in Normal and Disordered Phosphate Homeostasis. — № 3. — P. 221-241.

18. Rickets following bone tumor / A. Prader, R. Illig, E. Uehlinger, G. Stalder // Helvetica Paediatrica Acta. — 1959. — Vol. 14. — P. 554-565.

19. Tumor-Induced Rickets in a Child With a Central Giant Cell Granuloma: A Case Report / E. Fernández-Cooke, J. Cruz-Royo, C. Gallego [et al.] // *Pediatrics*. — 2015. — Vol. 135. — Tumor-Induced Rickets in a Child With a Central Giant Cell Granuloma. — № 6. — P. e1518-e1523.

20. A 9-month-old phosphaturic mesenchymal tumor mimicking the intractable rickets / G.-H. Jung, J.-D. Kim, Y. Cho [et al.] // *Journal of Pediatric Orthopaedics B*. — 2010. — Vol. 19. — № 1. — P. 127-132.

21. Successful Use of Denosumab for Life-Threatening Hypercalcemia in a Pediatric Patient with Primary Hyperparathyroidism / E. Mamedova, A. Kolodkina, E. V. Vasilyev [et al.] // *Hormone Research in Paediatrics*. — 2020. — Vol. 93. — № 4. — P. 272-278.

22. Multimodality Image-Guided Cryoablation for Inoperable Tumor-Induced Osteomalacia / S. H. Tella, H. Amalou, B. J. Wood [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. — 2017. — Vol. 32. — № 11. — P. 2248-2256.

23. Global guidance for the recognition, diagnosis, and management of tumor-induced osteomalacia / S. M. Jan De Beur, S. Minisola, W. Xia [et al.] // *Journal of Internal Medicine*. — 2023. — Vol. 293. — № 3. — P. 309-328.

24. Nationwide survey of fibroblast growth factor 23 (FGF23)-related hypophosphatemic diseases in Japan: prevalence, biochemical data and treatment / I. Endo, S. Fukumoto, K. Ozono [et al.] // *Endocrine Journal*. — 2015. — Vol. 62. — Nationwide survey of fibroblast growth factor 23 (FGF23)-related hypophosphatemic diseases in Japan. — № 9. — P. 811-816.

25. Imel, E. A. FGF23 Concentrations Vary With Disease Status in Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets / E. A. Imel, S. L. Hui, M. J. Ecibs // *Journal of Bone and Mineral Research*. — 2007. — Vol. 22. — № 4. — P. 520-526.

26. Kulikova, K. S. Hypophosphatemic rickets: pathogenesis, diagnosis and treatment / K. S. Kulikova, A. N. Tiulpakov // *Obesity and metabolism*. — 2018. — T. 15. — Hypophosphatemic rickets. — № 2. — P. 46-50.

27. Carpenter, T. O. New perspectives on the biology and treatment of x-linked

hypophosphatemic rickets / T. O. Carpenter // *Pediatric Clinics of North America*. — 1997. — Vol. 44. — № 2. — P. 443-466.

28. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting / M. Riminucci, M. T. Collins, N. S. Fedarko [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. — 2003. — Vol. 112. — № 5. — P. 683-692.

29. Hypophosphatemia after intravenous iron therapy: Comprehensive review of clinical findings and recommendations for management / B. Schaefer, M. Tobiasch, S. Wagner [et al.] // *Bone*. — 2022. — Vol. 154. — Hypophosphatemia after intravenous iron therapy. — P. 116202.

30. The diagnostic dilemma of tumor induced osteomalacia: a retrospective analysis of 144 cases / J. Feng, Y. Jiang, O. Wang [et al.] // *Endocrine Journal*. — 2017. — Vol. 64. — The diagnostic dilemma of tumor induced osteomalacia. — № 7. — P. 675-683.

31. Prevalence and clinical outcomes of hip fractures and subchondral insufficiency fractures of the femoral head in patients with tumour-induced osteomalacia / H. Kobayashi, N. Ito, T. Akiyama [et al.] // *International Orthopaedics*. — 2017. — Vol. 41. — № 12. — P. 2597-2603.

32. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis / A. J. Cruz-Jentoft, G. Bahat, J. Bauer [et al.] // *Age and Ageing*. — 2019. — Vol. 48. — Sarcopenia. — № 1. — P. 16-31.

33. Tebben, P. J. Hypophosphatemia: A Practical Guide to Evaluation and Management / P. J. Tebben // *Endocrine Practice*. — 2022. — Vol. 28. — Hypophosphatemia. — № 10. — P. 1091-1099.

34. Erythropoietin induces bone marrow and plasma fibroblast growth factor 23 during acute kidney injury / L. Toro, V., Barrientos P. León [et al.] // *Kidney International*. — 2018. — Vol. 93. — № 5. — P. 1131-1141.

35. Acute blood loss stimulates fibroblast growth factor 23 production / S. Rabadi, I. Udo, D. E. Leaf, S. S. Waikar, M. Christov // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. — 2018. — Vol. 314. — № 1. — P. F132-F139.

36. Oncogenic osteomalacia/phosphaturic mesenchymal tumor: clinical case and literature review / I. V. Bulycheva, S. S. Rodionova, V. Yu. Karpenko [et al.] // Bone and soft tissue sarcomas, tumors of the skin. — 2022. — T. 14. — Oncogenic osteomalacia/phosphaturic mesenchymal tumor. — № 1. — P. 48-54.

37. Most Osteomalacia-associated Mesenchymal Tumors Are a Single Histopathologic Entity: An Analysis of 32 Cases and a Comprehensive Review of the Literature / A. L. Folpe, J. C. Fanburg-Smith, S. D. Billings [et al.] // The American Journal of Surgical Pathology. — 2004. — Vol. 28. — Most Osteomalacia-associated Mesenchymal Tumors Are a Single Histopathologic Entity. — № 1. — P. 1-30.

38. Ornitz, D. M. Fibroblast growth factors / D. M. Ornitz, N. Itoh // Genome Biology. — 2001. — Vol. 2. — № 3. — P. reviews3005.1.

39. Clinical Challenges in Diagnosis, Tumor Localization and Treatment of Tumor-Induced Osteomalacia: Outcome of a Retrospective Surveillance / N. Hidaka, M. Koga, S. Kimura [et al.] // Journal of Bone and Mineral Research. — 2020. — Vol. 37. — Clinical Challenges in Diagnosis, Tumor Localization and Treatment of Tumor-Induced Osteomalacia. — № 8. — P. 1479-1488.

40. Sundaram, M. Oncogenic osteomalacia / M. Sundaram, E. F. McCarthy // Skeletal Radiology. — 2000. — Vol. 29. — № 3. — P. 117-124.

41. Malignant phosphaturic mesenchymal tumor of the pelvis: A report of two cases / T. Morimoto, S. Takenaka, N. Hashimoto [et al.] // Oncology Letters. — 2014. — Vol. 8. — Malignant phosphaturic mesenchymal tumor of the pelvis. — № 1. — P. 67-71.

42. 68Ga-dotatate for Tumor Localization in Tumor-Induced Osteomalacia / D. El-Maouche, S. M. Sadowski, G. Z. Papadakis [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 2016. — Vol. 101. — № 10. — P. 3575-3581.

43. Chande, S. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism / S. Chande, C. Bergwitz // Nature Reviews Endocrinology. — 2018. — Vol. 14. — № 11. — P. 637-655.

44. Tumors Associated With Oncogenic Osteomalacia Express Genes Important in

Bone and Mineral Metabolism / S. M. J. De Beur, R. B. Finnegan, J. Vassiliadis [et al.] // Journal of Bone and Mineral Research. — 2002. — Vol. 17. — № 6. — P. 1102-1110.

45. Nonremission and Recurrent Tumor-Induced Osteomalacia: A Retrospective Study / X. Li, Y. Jiang, L. Huo [et al.] // Journal of Bone and Mineral Research. — 2020. — Vol. 35. — Nonremission and Recurrent Tumor-Induced Osteomalacia. — № 3. — P. 469-477.

46. Gronskaia, S. A. FGF23 tumor induced osteomalacia / S. A. Gronskaia, Zh. E. Belaya, G. A. Melnichenko // Problems of Endocrinology. — 2022. — Vol. 68. — № 5. — P. 56-66.

47. Clinical features, diagnostics and treatment of FGF23 secreting tumors: series of 40 clinical cases / S. A. Gronskaia, Zh. E. Belaya, L. Ya. Rozhinskaya [et al.] // Problems of Endocrinology. — 2023. — Vol. 69. — Clinical features, diagnostics and treatment of FGF23 secreting tumors. — № 5. — P. 25-38.

48. Tumor induced osteomalacia: A single center experience on 17 patients / C. Crotti, F. Bartoli, L. A. Coletto [et al.] // Bone. — 2021. — Vol. 152. — Tumor induced osteomalacia. — P. 116077.

49. Huang, Q. L. Development of tertiary hyperparathyroidism after phosphate supplementation in oncogenic osteomalacia / Q. L. Huang, D. S. Feig, M. E. Blackstein // Journal of Endocrinological Investigation. — 2000. — Vol. 23. — № 4. — P. 263-267.

50. Oncogenic osteomalacia: two case reports with surprisingly different outcomes / R. Seijas, O. Ares, J. Sierra, M. Pérez-Dominguez // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. — 2009. — Vol. 129. — Oncogenic osteomalacia. — № 4. — P. 533-539.

51. Malignant phosphaturic mesenchymal tumor of the larynx / D. Sidell, C. Lai, S. Bhuta [et al.] // The Laryngoscope. — 2011. — P. n/a-n/a.

52. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia / T. Shimada, S. Mizutani, T. Muto [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2001. — Vol. 98. — № 11. — P. 6500-6505.

53. Tumor-induced Osteomalacia: A Comprehensive Review / S. Minisola,

S. Fukumoto, W. Xia [et al.] // Endocrine Reviews. — 2023. — Vol. 44. — Tumor-induced Osteomalacia. — № 2. — P. 323-353.

54. Characterization of FN1–FGFR1 and novel FN1–FGF1 fusion genes in a large series of phosphaturic mesenchymal tumors / J.-C. Lee, S.-Y. Su, C. A. Changou [et al.] // Modern Pathology. — 2016. — Vol. 29. — № 11. — P. 1335-1346.

55. Identification of a novel *FN1-FGFR1* genetic fusion as a frequent event in phosphaturic mesenchymal tumour: *FN1 - FGFR1* fusion in PMT / J.-C. Lee, Y.-M. Jeng, S.-Y. Su [et al.] // The Journal of Pathology. — 2015. — Vol. 235. — Identification of a novel *FN1-FGFR1* genetic fusion as a frequent event in phosphaturic mesenchymal tumour. — № 4. — P. 539-545.

56. RNA Sequencing Reveals Novel Oncogenic Fusions and Depicts Detailed Fusion Transcripts of FN1-FGFR1 in Phosphaturic Mesenchymal Tumors / X. Liu, X. Yin, D. Li [et al.] // Modern Pathology. — 2023. — Vol. 36. — № 10. — P. 100266.

57. Ectopic expression of Klotho in fibroblast growth factor 23 (FGF23)-producing tumors that cause tumor-induced rickets/osteomalacia (TIO) / Y. Kinoshita, Y. Takashi, N. Ito [et al.] // Bone Reports. — 2019. — Vol. 10. — P. 100192.

58. Klotho Overexpression Is Frequently Associated With Upstream Rearrangements in Fusion-Negative Phosphaturic Mesenchymal Tumors of Bone and Sinonasal Tract / J.-C. Lee, T.-H. Hsieh, Y.-C. Kao [et al.] // Modern Pathology. — 2023. — Vol. 36. — № 12. — P. 100336.

59. Brooks, R. EuroQol: the current state of play / R. Brooks // Health Policy. — 1996. — Vol. 37. — EuroQol. — № 1. — P. 53-72.

60. The zinc transporter ZNT3 co-localizes with insulin in INS-1E pancreatic beta cells and influences cell survival, insulin secretion capacity, and ZNT8 expression / K. Smidt, A. Larsen, A. Brønden [et al.] // BioMetals. — 2016. — Vol. 29. — № 2. — P. 287-298.

61. Depression and Synaptic Zinc Regulation in Alzheimer Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Parkinson Disease Dementia / D. R. Whitfield, J. Vallortigara, A. Alghamdi [et al.] // The American Journal of Geriatric Psychiatry. — 2015. — Vol. 23.

— № 2. — P. 141-148.

62. Zinc transporters protein level in postmortem brain of depressed subjects and suicide victims / A. Rafalo-Ulinska, J. Piotrowska, A. Kryczyk [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. — 2016. — Vol. 83. — P. 220-229.

63. Epigenetic targeting of SLC30A3 by HDAC1 is related to the malignant phenotype of glioblastoma / L. Zhang, Z. Liu, Y. Dong, L. Kong // *IUBMB Life*. — 2021. — Vol. 73. — № 5. — P. 784-799.

64. Elkholi, I. E. Myoglobin: From physiological roles to potential implications in cancer / I. E. Elkholi, M. E. Elsherbiny, M. Emara // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Reviews on Cancer*. — 2022. — Vol. 1877. — Myoglobin. — № 3. — P. 188706.

65. ASTL is mutated in female infertility / S. Maddirevula, S. Coskun, M. Al-Qahtani [et al.] // *Human Genetics*. — 2022. — Vol. 141. — № 1. — P. 49-54.

66. In silico identification and characterization of the SNPs in the human ASTL gene and their probable role in female infertility / K. Suri, N. Rajput, P. Sharma [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2023. — Vol. 11. — P. 1151672.

67. Potential tumor biomarkers identified in ovarian cyst fluid by quantitative proteomic analysis, iTRAQ / B. Kristjansdottir, K. Levan, K. Partheen [et al.] // *Clinical Proteomics*. — 2013. — Vol. 10. — № 1. — P. 4.

68. Elevated Fibroblast Growth Factor 23 in Women With Malignant Ovarian Tumors / P. J. Tebben, K. R. Kalli, W. A. Cliby [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings*. — 2005. — Vol. 80. — № 6. — P. 745-751.

69. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse / D. K. Vassilatis, J. G. Hohmann, H. Zeng [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2003. — Vol. 100. — № 8. — P. 4903-4908.

70. Pharmacological characterization of novel small molecule agonists and antagonists for the orphan receptor GPR139 / L. Pallareti, T. F. Rath, B. Trapkov [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. — 2023. — Vol. 943. — P. 175553.

71. Zhang, R. Research progress on the role of orphan receptor GPR139 in

neuropsychiatric behaviors / R. Zhang, J. Chen // *European Journal of Pharmacology*. — 2023. — Vol. 960. — P. 176150.

72. Human ZCCHC12 activates AP-1 and CREB signaling as a transcriptional co-activator / H. Li, Q. Liu, X. Hu [et al.] // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. — 2009. — Vol. 41. — № 7. — P. 535-544.

73. Szn1 Is a Novel Protein That Functions as a Transcriptional Coactivator of Bone Morphogenic Protein Signaling / G. Cho, Y. Lim, D. Zand, J. A. Golden // *Molecular and Cellular Biology*. — 2008. — Vol. 28. — № 5. — P. 1565-1572.

74. Transcriptome sequencing of endometrium revealed alterations in mRNAs and lncRNAs after ovarian stimulation / L. Li, P. Wang, S. Liu [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. — 2020. — Vol. 37. — № 1. — P. 21-32.

75. ZCCHC12, a novel oncogene in papillary thyroid cancer / O. Wang, Z. Zheng, Q. Wang [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. — 2017. — Vol. 143. — № 9. — P. 1679-1686.

76. Differential expression of zinc finger CCHC-type superfamily proteins in thyroid carcinoma and their associations with tumor immunity / Y. Yin, J. Chen, Q. Chen [et al.] // *Thyroid Research*. — 2023. — Vol. 16. — № 1. — P. 42.

77. FGF23 promotes proliferation, migration and invasion by regulating miR-340-5p in osteosarcoma / L. Fang, Z. Li, B. Yu, L. Zhou // *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. — 2023. — Vol. 18. — № 1. — P. 12.

78. FGF23 alleviates neuronal apoptosis and inflammation, and promotes locomotion recovery via activation of PI3K/AKT signalling in spinal cord injury / Y. Cui, B. Yang, S. Lin [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. — 2023. — Vol. 26. — № 1. — P. 340.

79. European expert consensus on practical management of specific aspects of parathyroid disorders in adults and in pregnancy: recommendations of the ESE Educational Program of Parathyroid Disorders (PARAT 2021) / J. Bollerslev, L. Rejnmark, A. Zahn [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. — 2022. — Vol. 186. — European expert consensus on practical management of specific aspects of

parathyroid disorders in adults and in pregnancy. — № 2. — P. R33-R63.

80. Clinical utility of systemic venous sampling of FGF23 for identifying tumours responsible for tumour-induced osteomalacia / N. Ito, Y. Shimizu, H. Suzuki [et al.] // *Journal of Internal Medicine*. — 2010. — Vol. 268. — № 4. — P. 390-394.

81. FGF23 tumor induced osteomalacia with localization of neoplasm in the tympanic cavity / A. Yu. Ovchinnikov, E. M. Khon, A. V. Bakotina [et al.] // *Vestnik otorinolaringologii*. — 2023. — Vol. 88. — № 6. — P. 91.

82. Heijboer, A. C. The Measurement and Interpretation of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) Concentrations / A. C. Heijboer, E. Cavalier // *Calcified Tissue International*. — 2022. — Vol. 112. — № 2. — P. 258-270.

83. Van Helden, J. Technical and diagnostic performance of a new fully automated immunoassay for the determination of intact fibroblast growth factor 23 (FGF23) / J. Van Helden, R. Weiskirchen // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. — 2018. — Vol. 78. — № 7-8. — P. 584-590.

84. Smith, E. R. Method-specific differences in plasma fibroblast growth factor 23 measurement using four commercial ELISAs / E. R. Smith, L. P. McMahon, S. G. Holt // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. — 2013. — Vol. 51. — № 10. — P. 1971-1981.

85. Sensitivity of Fibroblast Growth Factor 23 Measurements in Tumor-Induced Osteomalacia / E. A. Imel, M. Peacock, P. Pitukcheewanont [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2006. — Vol. 91. — № 6. — P. 2055-2061.

86. Effects of short-term insulin-like growth factor-I or growth hormone treatment on bone turnover, renal phosphate reabsorption and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ production in healthy man / T. Bianda, M. A. Hussain, Y. Glatz [et al.] // *Journal of Internal Medicine*. — 1997. — Vol. 241. — № 2. — P. 143-150.

87. Determination of FGF23 Levels for the Diagnosis of FGF23-Mediated Hypophosphatemia / I. R. Hartley, R. I. Gafni, K. L. Roszko [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. — 2020. — Vol. 37. — № 11. — P. 2174-2185.

88. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in

hypophosphatemic patients / I. Endo, S. Fukumoto, K. Ozono [et al.] // *Bone*. — 2008. — Vol. 42. — № 6. — P. 1235-1239.

89. Clinical performance of a novel chemiluminescent enzyme immunoassay for FGF23 / N. Ito, T. Kubota, S. Kitanaka [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. — 2021. — Vol. 39. — № 6. — P. 1066-1075.

90. Palomo, T. Circulating Sclerostin in Children and Young Adults with Heritable Bone Disorders / T. Palomo, F. H. Glorieux, F. Rauch // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2014. — Vol. 99. — № 5. — P. E920-E925.

91. Elevated Bone Remodeling Markers of CTX and P1NP in Addition to Sclerostin in Patients with X-linked Hypophosphatemia: A Cross-Sectional Controlled Study / S. Hansen, V. V. Shanbhogue, N. R. Jørgensen, S. S. Beck-Nielsen // *Calcified Tissue International*. — 2019. — Vol. 104. — Elevated Bone Remodeling Markers of CTX and P1NP in Addition to Sclerostin in Patients with X-linked Hypophosphatemia. — № 6. — P. 591-598.

92. Agoro, R. Regulation of FGF23 production and phosphate metabolism by bone-kidney interactions / R. Agoro, K. E. White // *Nature Reviews Nephrology*. — 2023. — Vol. 19. — № 3. — P. 185-193.

93. Muscle-bone crosstalk and potential therapies for sarco-osteoporosis / G. Li, L. Zhang, D. Wang [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. — 2019. — Vol. 120. — № 9. — P. 14262-14273.

94. Eide, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc / D. J. Eide // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Cell Research*. — 2006. — Vol. 1763. — № 7. — P. 711-722.

95. Jahn, R. Mechanisms of SNARE proteins in membrane fusion / R. Jahn, D. C. Cafiso, L. K. Tamm // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2024. — Vol. 25. — № 2. — P. 101-118.

96. Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation / Y. Takashi, H. Kosako, S. Sawatsubashi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2019. —

Vol. 116. — № 23. — P. 11418-11427.

97. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor *Fgf23* expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling / A. Martin, S. Liu, V. David [et al.] // The FASEB Journal. — 2011. — Vol. 25. — № 8. — P. 2551-2562.

98. Antibody-Mediated Activation of FGFR1 Induces FGF23 Production and Hypophosphatemia / A.-L. Wu, B. Feng, M. Z. Chen [et al.] // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8. — № 2. — P. e57322.

99. Osteocyte-Specific Deletion of *Fgfr1* Suppresses FGF23 / Z. Xiao, J. Huang, L. Cao [et al.] // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9. — № 8. — P. e104154.

100. Tumour-induced osteomalacia / S. Minisola, M. Peacock, S. Fukumoto [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. — 2017. — Vol. 3. — № 1. — P. 17044.

101. Chai, R. C. Single-Cell RNA Sequencing: Unravelling the Bone One Cell at a Time / R. C. Chai // Current Osteoporosis Reports. — 2022. — Vol. 20. — Single-Cell RNA Sequencing. — № 5. — P. 356-362.

102. Single-cell RNA sequencing identifies *Fgf23*-expressing osteocytes in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment / A. Hanai, A. Kawabata, K. Nakajima [et al.] // Frontiers in Physiology. — 2023. — Vol. 14. — P. 1102751.

103. Transforming Growth Factor- β Stimulates Inorganic Phosphate Transport and Expression of the Type III Phosphate Transporter *Glvr-1* in Chondrogenic ATDC5 Cells* / G. Palmer, J. Guicheux, J.-P. Bonjour, J. Caverzasio // Endocrinology. — 2000. — Vol. 141. — № 6. — P. 2236-2243.

104. Karunasinghe, N. Zinc in Prostate Health and Disease: A Mini Review / N. Karunasinghe // Biomedicines. — 2022. — Vol. 10. — Zinc in Prostate Health and Disease. — № 12. — P. 3206.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Анкета EQ5D. Отметьте галочкой ОДИН квадрат в каждом из разделов, приведенных ниже. Укажите такие ответы, которые наилучшим образом отражают состояние вашего здоровья на СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ.

ПОДВИЖНОСТЬ (D1)

Я не испытываю трудностей при ходьбе

Я испытываю некоторые трудности при ходьбе

Я прикован(-а) к постели

УХОД ЗА СОБОЙ (D2)

Я не испытываю трудностей при уходе за собой

Я испытываю некоторые трудности с мытьем или одеванием

Я не в состоянии сам(-а) мыться или одеваться

ПОВСЕДНЕВНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ (например: работа, учеба, работа по дому, участие в делах семьи, досуг) (D3)

Я не испытываю трудностей в моей привычной повседневной деятельности

Я испытываю некоторые трудности в моей привычной повседневной деятельности

Я не в состоянии заниматься своей привычной повседневной деятельностью

БОЛЬ/ДИСКОМФОРТ (D4)

Я не испытываю боли или дискомфорта

Я испытываю умеренную боль или дискомфорт

Я испытываю крайне сильную боль или дискомфорт

ТРЕВОГА/ДЕПРЕССИЯ (D5)

Я не испытываю тревоги или депрессии

Я испытываю умеренную тревогу или депрессию

Я испытываю крайне сильную тревогу или депрессию

ПРИЛОЖЕНИЕ Б**(справочное)**

Анкета ВАШ. ВАШ представляет собой отрезок прямой длиной 10 см. Его начало соответствует отсутствию болевого ощущения — «боли нет», а конечная точка отражает мучительную нестерпимую боль — «невыносимая боль». Линия горизонтальная. Пациенту предлагается сделать на ней отметку, соответствующую интенсивности испытываемых им в данный момент болей. Расстояние между началом отрезка («боли нет») и сделанной отметкой измеряют в сантиметрах и округляют до целого. Каждый сантиметр на линии соответствует 1 баллу. При отметке до 2 см боль классифицируется как слабая, от 2 до 4 см — умеренная, от 4 до 6 см — сильная, от 6 до 8 см — сильнейшая и до 10 см — невыносимая.

