

УДК 543.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОГО СОСТАВА БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ МЕТОДОМ РФЛА–СИ

© 2025 г. В. А. Трунова^{а,с,*}, Т. И. Поспелова^б, М. С. Войтко^б, Е. С. Крупович^{а,д},
Г. С. Солдатова^{б,с}, Р. О. Кузьмин^б, К. С. Цигулёв^б

^аИнститут неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

^бНовосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, 630091 Россия

^сНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

^дЦКП “Сибирский кольцевой источник фотонов”, Институт катализа СО РАН,
Новосибирская область, Кольцово, 630559 Россия

*e-mail: valna-t@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2024 г.

После доработки 27.11.2024 г.

Принята к публикации 27.11.2024 г.

Персонализированная медицина представляет собой современную концепцию, направленную на индивидуализацию терапии пациента. Актуальность поиска и идентификации новых высокочувствительных и специфичных прогностических маркеров у больных гемобластозами обусловлена лидирующими позициями по частоте заболеваемости и смертности среди лиц молодого трудоспособного населения, что придает проблеме особую социально-экономическую значимость. Исследование направлено на изучение содержания микроэлементов в биопсийном материале (красном костном мозге) пациентов с гемобластомами в дебюте заболевания и после химиолучевой терапии. С помощью метода рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения можно одновременно определять более 25 химических элементов в пробе с малой массой при неdestructивной пробоподготовке образца. Рассмотрены различия в концентрации 10 элементов (S, K, Ca, Cu, Zn, Fe, Se, Br, Rb, Cd) у пациентов с двумя патологиями — лимфомой и лейкозом.

Ключевые слова: рентгенофлуоресцентный анализ, синхротронное излучение, следовые элементы, биопсийный материал, красный костный мозг, гемобластоzy, лимфомы, острый лейкоз, персонализированная медицина.

DOI: 10.31857/S1028096025020154, EDN: EILIRG

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время социальная значимость гемобластозов (опухолевых заболеваний кроветворной ткани) не вызывает сомнений и обусловлена не только молодым трудоспособным возрастом большинства заболевших, но и отдаленными последствиями противоопухолевого лечения. Благодаря индивидуальному подходу и появлению таргетной терапии и иммунотерапии произошел значительный прорыв в лечении пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Тем не менее показатели летальности все еще остаются вы-

сокими, особенно в группе пациентов с острыми лейкозами [1–4]. На сегодняшний день существует тенденция к увеличению распространенности злокачественных заболеваний лимфатической и кроветворной ткани в России по годам (рис. 1). Надо заметить, что количество летальных исходов с годами уменьшается, что говорит о повышении уровня лечения данной группы патологий. Тем не менее показатель летальности по-прежнему остается на высоком уровне при этой тяжелой патологии [5]. Доля больных гемобластомами до 40 лет составляет 25%, 40–59 лет — также 25%



Рис. 1. Показатели заболеваемости и летальности пациентов с гемобластозами с 2018 по 2023 г.

[6]. Основной пик заболеваемости лимфомой Ходжкина приходится на возраст от 16 до 35 лет [7]. У больных другими лимфомами средний возраст заболевших варьируется от 45 до 65 лет. Острый лимфобластный лейкоз может встречаться у лиц любого возраста, начиная с младенческого и заканчивая пожилым, однако максимальный уровень заболеваемости приходится на детский возраст (60% пациентов моложе 20 лет [8]).

Поздняя выявляемость приводит к высокой одногодичной летальности и низкой пятилетней выживаемости больных гемобластозами. Выявление новых предикторов развития заболевания и прогностических факторов его неблагоприятного течения актуально для медицинского сообщества.

В последнее десятилетие активно развиваются методы оценки минерального гомеостаза организма по уровню химических элементов в волосах, ногтевых пластинах и сыворотке крови. Взаимосвязь между микроэлементами и опухолевыми заболеваниями была показана во многих исследованиях [9–12]. Тем не менее в случае онкологических заболеваний кроветворной ткани подобные исследования единичны и носят фрагментарный характер [13, 14]. В основном для элементного анализа красного костного мозга и сыворотки крови применяют методы масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и атомно-адсорбционной спектрометрии [15, 16].

В [14] неорганические элементы рассматривали как предикторы негативного прогноза у больных острым миелоидным лейкозом. С использо-

ванием ROC-анализа (ROC — receiver operating characteristic) были рассчитаны концентрации микроэлементов в сыворотке крови. При преодолении порогового значения присваивали один балл каждому элементу. При суммарном учете выявленных факторов риска определяли общую выживаемость пациентов. Связь суммы баллов с выживаемостью пациентов отрицательная, т.е. чем больше баллы, тем ниже выживаемость пациентов.

Кроме того, в нескольких исследованиях изучали связь между дефицитом Se, Zn, Co, профитом Cu и Fe с риском развития лейкоза [17, 18]. Ряд исследователей указывает также на значительное повышение уровня Cd, Pb и Cr у больных острым или хроническим лейкозом [19]. В исследовании Chrysochou E. изучали потенциальную связь концентрации As, Ba, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Ni, Pb, Rb в сыворотке крови с риском развития как острого, так и хронического лейкозов. Результаты продемонстрировали более высокие ($p < 0.05$) концентрации микроэлементов в сыворотке пациентов с лейкозами по сравнению с контрольной группой. Кроме того, концентрация токсичных Pb и Cd была в семь и четыре раза соответственно выше у больных гемобластозами в сравнении с группой условно здоровых лиц. В [20] было показано, что у всех пациентов с неходжкинской лимфомой уровень микроэлементов (Zn, Cu, Ni и Cr) в костном мозге в дебюте заболевания повышен по сравнению с контрольной группой. В плазме крови также имеются различия в уровнях микроэлементов у пациентов по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем исследова-

ние показало, что внутриклеточное измерение состава микроэлементов более надежно, чем оценка в плазме крови.

Несмотря на перспективность данного направления исследований, следует отметить, что элементный состав сыворотки крови и волос не дает объективной информации о содержании неорганических микроэлементов в центральном органе кроветворения — красном костном мозге, что особенно важно для больных онкогематологическими заболеваниями. Так, лейкоз характеризуется первичным поражением костного мозга, в то время как при лимфоме имеет место нодальная или экстранодальная локализация опухоли с последующим возможным вовлечением в процесс красного костного мозга.

Таким образом, следует предположить, что изменения микроэлементного состава, вероятно, могут быть предрасполагающим фактором, инициирующим злокачественный процесс. Изучение взаимосвязи между злокачественными заболеваниями кроветворной ткани и микроэлементами имеет решающее значение для разработки стратегий персонализированной терапии и профилактической медицины, а также для ранней диагностики гемобластозов.

Целью настоящего исследования был анализ химического состава биологического субстрата (красного костного мозга) у больных гемобластомами для выявления прогностических критериев при прогрессировании онкологических заболеваний кроветворной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В сравнительное проспективное исследование были включены 33 пациента в возрасте от 22 до 67 лет. Среди них 20 больных лимфомами (с лимфомой Ходжкина — восемь обследуемых, с неходжкинскими лимфомами — 12 пациентов) и 13 пациентов с острыми лейкозами. Первичное обследование больных осуществляли в условиях гематологического отделения в рамках оказания высокотехнологичной и специализированной медицинской помощи. Забор красного костного мозга методом стеральной пункции осуществляли до начала лечения и после проведения первого и второго курсов полихимиотерапии. В качестве индукции ремиссии все пациенты получили полихимиотерапию I линии. Пациенты с диффузной В-крупноклеточной лимфомой получали химиотерапию по протоколам R-CHOP, R-miniCHOP, R-Hyper-CVAD. Больным В-мелкоклеточной лимфомой (фенотип В-ХЛЛ) назначали программную полихимиотерапию по схемам

FCR и RB. Лечение лимфомы Ходжкина осуществляли при использовании протокола ABVD и BEACOPP-14. Терапию острых миелобластных лейкозов проводили с использованием схемы “7+3”. Дизайн исследования представлен на рис. 2.

Стеральную пункцию проводили иглой Кассирского в вакуумную пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Для хранения образцы помещали в морозильную камеру с температурой -70°C . После транспортировки пробу размораживали до комнатной температуры, перемешивали в пробирке. Автоматической пипеткой капали по 1–2 мкл на фторопластовую пленку и высушивали при температуре до 40°C , а затем перетирали в агатовой ступке. Таблетки для исследования прессовали под гидравлическим прессом с усилием 120 кг/см^2 . Поверхностная плотность образцов и стандартов изменялась в диапазоне $5\text{--}30\text{ мг/см}^2$. Таблетку помещали между двумя майларовыми пленками (с известными микропримесями химических элементов) и закрепляли кольцами из фторопласта. Процедура пробоподготовки для стандартных образцов была такой же. Для определения концентраций химических элементов методом внешнего стандарта были использованы международные стандартные образцы: A-13 (Animal blood), Chlorella № 3, Oyster Tissue NIST 1566, Mussel № 6.

Измерения проводили на базе Сибирского центра синхротронного (СИ) и терагерцевого излучения в Институте ядерной физики СО РАН на ускорительном комплексе ВЭПП-3, экспериментальной станции рентгенофлуоресцентного анализа (РФЛА) № 3 с энергией возбуждающих квантов 21 кэВ. Время экспозиции составило 250 с на один образец. Спектры обрабатывали с помощью программы AXIL. Осуществляли нормировку на пик некогерентного рассеяния (пик Комптона).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ изменений микроэлементного состава у больных лимфомой Ходжкина выявил, что в дебюте заболевания концентрация брома в красном костном мозге была выше в сравнении с показателями, оцененными после проведенной полихимиотерапии (35 (28; 65) и 23 (14; 35) мкг/г, $p=0.02$). У пациентов с острым лейкозом концентрация стронция (0.27 (0.18; 0.86) и 0.11 (0.08; 0.14) мкг/г, $p=0.01$) и рубидия (8.7 (7; 10.2) и 8 (5.8; 8.5) мкг/г, $p=0.02$) была выше до начала лечения в сравнении с полученными результатами исследования, проведенного после завершения одного курса полихимиотерапии.



Рис. 2. Дизайн исследования. НХЛ — неходжкинская лимфома, ПХТ — полихимиотерапия.

Определялось значимое увеличение концентрации молибдена в костном мозге у пациентов с лимфомой Ходжкина после полихимиотерапии в сравнении с больными острым лейкозом ($p = 0.04$). Согласно корреляционному анализу с увеличением возраста больных отмечалось снижение концентрации меди ($r = -0.54$, $p = 0.04$) и мышьяка ($r = -0.56$, $p = 0.03$) и повышалось количество тория в костном мозге ($r = 0.52$, $p = 0.04$) в начале заболевания.

Рис. 3 демонстрирует снижение большинства неорганических микроэлементов в красном костном мозге у больных острыми лейкозами сразу после проведения химиотерапии. Отмечена тенденция к более равномерному снижению содержания Zn, Br, Rb, Ca по трем контрольным точкам в сравнении с аналогичными результата-

ми, выявленными для Cu, содержание которой уменьшается в 3.5 раза. Кроме того, установлено, что после проведенной полихимиотерапии только концентрация железа была выше у больных острыми лейкозами. Вероятно, это объясняется тем, что после проведения терапии у пациентов снижаются уровень гемоглобина и эритроцитов, что нередко требует переливания донорской эритроцитарной взвеси.

При анализе микроэлементного состава костного мозга у пациентов с лимфомами показано, что после проведенной терапии, содержащей противоопухолевый препарат доксорубин, происходит выраженное снижение концентрации калия. В то же время изменение уровня других эссенциальных элементов (Zn, Br, Rb) после полихимиотерапии, вероятно, связано с форсирова-

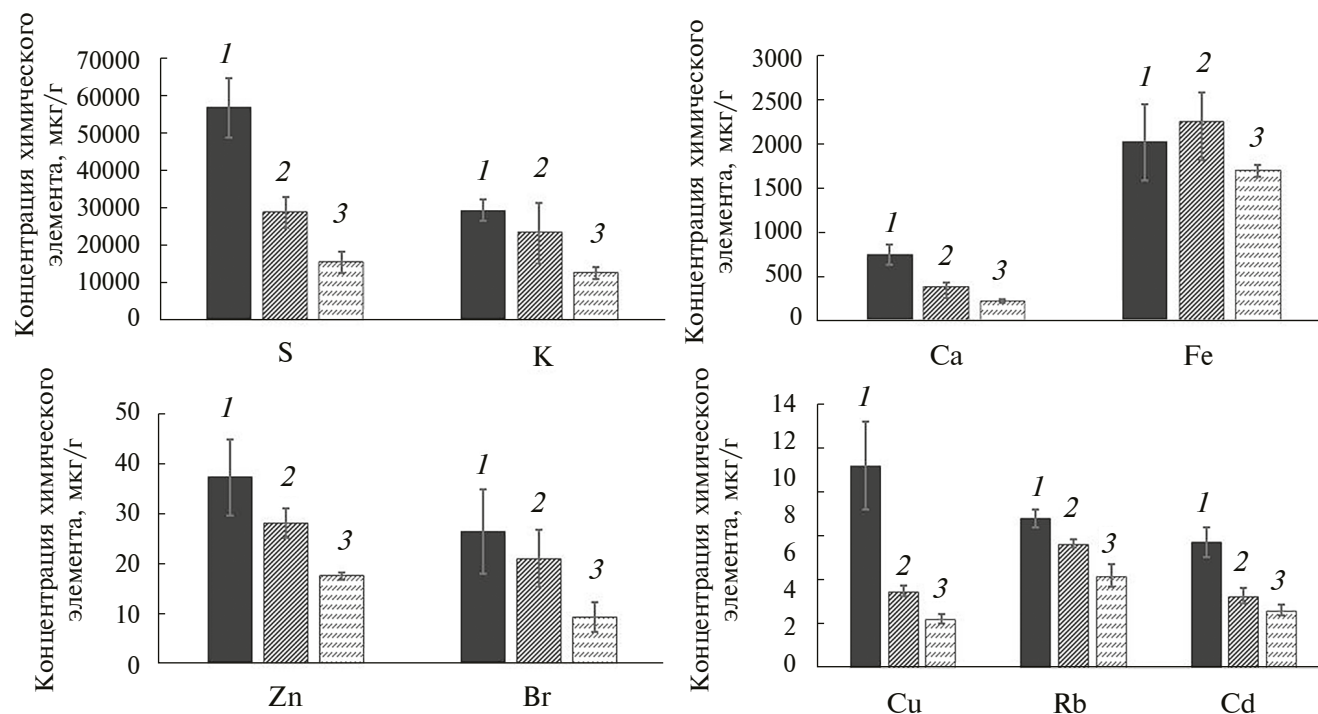


Рис. 3. Результаты элементного анализа красного костного мозга пациентов с лейкозом: 1 — до полихимиотерапии; 2 — после первого курса; 3 — после второго курса.

нием диуреза на фоне интенсивной инфузионной терапии, что выводит часть микроэлементов вместе с мочой (рис. 4).

При сравнительной оценке микроэлементного состава красного костного мозга до начала лечения между больными лимфомой Ходжкина

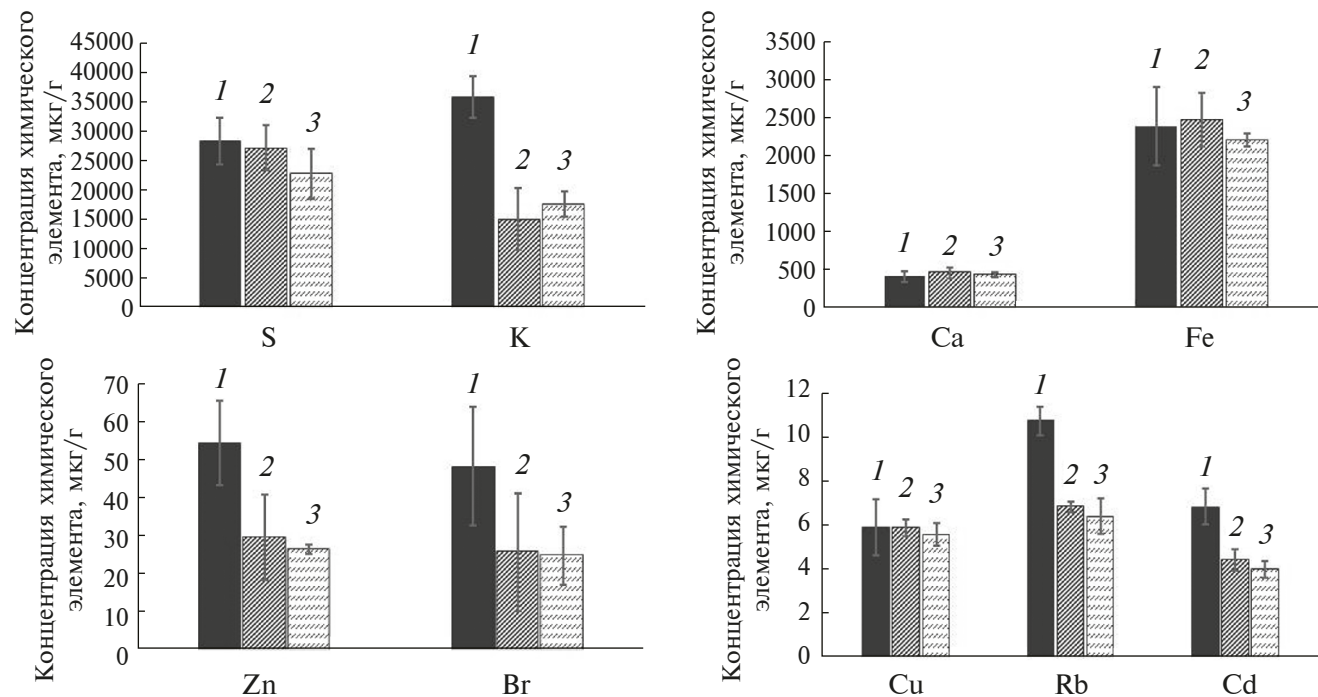


Рис. 4. Результаты элементного анализа красного костного мозга пациентов с лимфомой: 1 — до полихимиотерапии; 2 — после первого курса; 3 — после второго курса.

и острым лейкозом достоверных отличий не выявлено. Однако у пациентов с острым лейкозом в начале заболевания концентрация S, Se, Cu была выше в сравнении с больными неходжкинскими лимфомами, у которых был поражен красный костный мозг. В то же время уровень Fe, Zn, Br, Rb был выше у больных лимфопролиферативными заболеваниями, чем у пациентов с острыми лейкозами. Следует отметить, что соотношение Cu/Zn различается для лимфом и острых лейкозов, что может свидетельствовать о различном метаболизме этих опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Научная новизна проведенного исследования заключается не только в изучении микроэлементного состава биопсийного материала (красного костного мозга) пациентов с гемобластомами, но и в применении уникальной методики его определения. Метод РФЛА—СИ является одним из наиболее эффективных неразрушающих методов для сверхчувствительного, панорамного элементного анализа биопсийного материала. Важное достоинство метода — отсутствие необходимости растворения, разложения, концентрирования пробы, что снижает риски загрязнения и потерь анализируемых элементов, а также существенно сокращает время анализа. Использование СИ для возбуждения рентгеновской флуоресценции позволяет радикально улучшить возможности РФЛА. Благодаря высокой интенсивности и поляризации пучка СИ данный метод позволяет снизить пределы обнаружения химических элементов и использовать на порядок меньше количество материала по сравнению с традиционными современными методами анализа.

В ходе пилотного исследования выявлена тенденция к снижению как эссенциальных, так и токсических микроэлементов после проведения химиотерапии. С одной стороны, полученные результаты указывают на снижение активности опухолевого процесса, с другой стороны, это демонстрирует и негативное влияние химиопрепаратов на содержание жизненно необходимых микроэлементов, участвующих в важных метаболических процессах в организме. Длительность межкурсовых периодов химиотерапии может значительно отличаться у разных пациентов. Так, при увеличении длительности этого периода может изменяться эффективность терапии и увеличиваться скорость прогрессии опухоли. В то же время сокращение длительности межкурсового интервала может приводить к серьезным побочным эффектам химиотерапии и, как следствие, к ухудшению общего состояния пациента.

Продолжение исследования будет направлено на выявление ранних предикторов рефрактерно-рецидивирующего течения гемобластозов высокоспецифическим методом РФЛА—СИ с целью разработки индивидуальных программ профилактики, сопроводительного лечения и реабилитации, а также создание калькулятора для расчета риска негативных исходов заболевания на основе содержания химических элементов в костном мозге.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Разработка методики пробоподготовки цельного красного костного мозга для РФЛА с использованием СИ была выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ЦКП “СКИФ” ИК СО РАН (FWUR-2024-0040). Элементный анализ биопсийного материала красного костного мозга пациентов с гемобластомами методом РФЛА—СИ выполнен при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 121031700314-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овечкина В.Н., Бондаренко С.Н., Морозова Е.В. и др. // Клиническая онкогематология. 2017. Т. 10 № 3. С. 351.
<http://doi.org/10.21320/2500-2139-2017-10-3-351-357>
2. Schmid C., Labopin M., Nagler A., Niederwieser D., Castagna L., Tabrizi R., Stadler M., Kuball J., Cornelissen J., Vorlicek J., Socié G., Falda M., Vindeløv L., Ljungman P., Jackson G., Kröger N., Rank A., Polge E., Rocha V., Mohty M. // Blood. 2012. V. 119. № 6. P. 1599.
<http://doi.org/10.1182/blood-2011-08-375840>
3. Christopheit M., Kuss O., Finke J. et al. // J. Clin. Oncol. 2010. V. 31. № 26. P. 3259.
<http://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.7961>
4. Kröger N., Bornhäuser M., Stelljes M., Pichlmeier U., Trensche R., Schmid C., Arnold R., Martin H., Heinzelmann M., Wölschke C., Meyer R. G., Bethge W., Kobbe G., Ayuk F., Gökbüget N., Hölzer D., Zander A., Beelen D. // Bone Marrow Transplant. 2014. V. 50. № 12. P. 1503.
<http://doi.org/10.1038/bmt.2015.202>
5. Капурин А.Д., Старинский А.В., Шахзадовой А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2022. 239 с.
6. Мирзаахмедова И.З. // Экономика и социум. 2022. Т. 3. № 2. С. 94.

7. Мамедова А.А., Мочкин Н.Е., Саржевский В.О. и др. // Онкогематология. 2022. Т. 17. № 3. С. 40.
<http://doi.org/10.17650/1818-8346-2022-17-3-40-47>
8. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. // Гематология и трансфузиология. 2018. Т. 63. № 1-S2. С. 5.
9. Azin F., Raie R.M., Mahmoudi M.M. // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. V. 39. № 3. P. 179.
10. Guidotti T.L., McNamara J., Moses M.S. // Indian J. Med. Res. 2008. V. 128. № 4. P. 524.
11. Cui Y., Vogt S., Olson N., Glass A.G., Rohan T.E. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention. 2007. V. 16. № 8. P. 1682.
12. Yelinova V., Glazachev Y., Khrantsov V., Kudryashova L., Rykova V., Salganik R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 221. № 2. P. 300.
13. Ohanian M., Telouk P., Kornblau S., Albareda F., Ruvolo Peter, Tidwell R.S., Plesa A., Kangal-Shamanna R., Matera E., Cortes J., Carson A., Dumontet Ch. // Am. J. Hematology. 2020. V. 95. № 4. P. 422.
<http://doi.org/10.1002/ajh.25731>
14. Kul A. N., Ozturk Kurt B. // Clinical and Experimental Medicine. 2024. V. 24. № 1. P. 1.
<http://doi.org/10.1007/s10238-024-01349-5>
15. Qayyum M.A., Shah M.H. // Biol. Trace Elem. Res. 2020. V. 194. № 1. P. 34.
<http://doi.org/10.1007/s12011-019-01746-y>
16. Hasegawa T., Inagaki K., Haraguchi H. // Analyt. Sci. 2001. V. 17. P. 979.
17. Cirovic A., Cirovic A. // Leukemia Res. 2022. V. 112. P. 106755.
<http://doi.org/10.1016/j.leukres.2021.106755>
18. Ehudin M.A., Golla U., Trivedi D., Potlakayala S.D., Rudrabhatla S.V., Desai D., Dovat S., Claxton D., Sharma A. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 7972.
<http://doi.org/10.3390/ijms23147972>
19. Chrysochou E., Koukoulakis K., Kanellopoulos P.G., Sakellari A., Karavoltos S., Dassenakis M., Minaidis M., Maropoulos G., Bakeas E. // J. Trace Elements Medicine Biol. 2021. V. 68. P. 126833.
<http://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126833>
20. Schmitt Y., Schneider H. // Nephrology Dialysis Transplantation. 1993. V. 8. № 5. P. 438.

Determination of the Microelement Composition of Biopsy Material of Red Bone Marrow in Patients with Hemoblastoses by the SR–XRF Method

V. A. Trunova^{1,3,*}, T. I. Pospelova², M. S. Voytko², E. S. Krupovich^{1,4}, G. S. Soldatova^{2,3},
R. O. Kuzmin², K. S. Tsigulev²

¹Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630091 Russia

³Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

⁴SRF “SKIF”, Novosibirsk region, Koltsovo settlement, 630559 Russia

*e-mail: valna-t@mail.ru

Personalized medicine is a modern concept aimed at individualization of patient therapy. The relevance of the search and identification of new highly sensitive and specific prognostic markers in patients with hemoblastoses is due to the leading positions in the incidence and mortality rate among young working-age population, which gives the problem special socio-economic significance. The study is aimed at studying the content of trace elements in biopsy material (red bone marrow) of patients with hemoblastoses at the onset of the disease and after chemoradiation therapy. Using the method of X-ray fluorescence analysis and synchrotron radiation, it is possible to simultaneously determine more than 25 chemical elements in a low-mass sample with non-destructive sample preparation. Difference in the concentrations of 10 elements (S, K, Ca, Cu, Zn, Fe, Se, Br, Rb, Cd) in patients with two pathologies, lymphoma and leukemia, is considered.

Keywords: X-ray fluorescence analysis, synchrotron radiation, trace elements, biopsy material, red bone marrow, hemoblastoses, lymphoma, acute leukemia, personalized medicine.