

УДК 615.355.099:599.323.4

Э.Р. Переверзева<sup>1</sup>, И.Д. Трещалин<sup>1</sup>, Е.В. Возняковская<sup>1</sup>, М.И. Трещалин<sup>1</sup>, Т.Б. Переверзева<sup>1</sup>,  
Н.В. Еремкин<sup>1</sup>, Н.В. Булушова<sup>2</sup>, Е.П. Санникова<sup>2</sup>

**ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА****БИОМОДИФИЦИРОВАННОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА – L-АСПАРАГИНАЗЫ WAS79**<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф. Гаузе», Москва<sup>2</sup>ФГУП ГосНИИгенетики, Москва**Контактная информация**

Переверзева Элеонора Рафаиловна, д.б.н., зам. директора по научной работе

адрес: 119021 Москва, улица Б. Пироговская, д. 11, стр. 1; тел. +7(499)255-23-92

e-mail: pereverzeva-ella@yandex.ru

Статья поступила 16.10.2015, принята к печати 27.11.2015.

**Резюме**

На неинбредных крысах. самках и самцах, проведено токсикологическое изучение L-аспарагиназы Was 79, полученной путем модификации природного фермента *Wolinella succinogenes* в ФГУП «ГосНИИгенетика». L-аспарагиназу вводили внутривентриально в 1 и 10 терапевтических дозах (1200 и 12000 МЕ/кг) ежедневно в течение 15 суток. В ходе исследования определяли массу тела животных, проводили клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, снимали ЭКГ. На 1 и 15 сутки после окончания курса по пять животных из каждой группы подвергали эвтаназии. При вскрытии макроскопически оценивали состояние внутренних органов, определяли массовые коэффициенты сердца, печени, почек, селезенки и тимуса, проводили патоморфологическое исследование внутренних органов. Проведенное исследование показало, что применение L-аспарагиназы не оказывает влияния на массу тела животных, показатели клинического и биохимического анализов крови, анализа мочи. Гемато-, нефро-, панкреа-, и гастроинтестинальная токсичность проявляются только при патоморфологическом исследовании. Гепатотоксичность, выявленная при микроскопическом изучении, была подтверждена результатами биохимического анализа сыворотки крови, который показал значительное увеличение уровней АЛТ и щелочной фосфатазы в обеих группах животных, получавших L-аспарагиназу. Обнаруженные изменения были обратимы и зависели от дозы препарата.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа, *Wolinella succinogenes*, хроническая токсичность, крысы.

E.R. Pereverzeva<sup>1</sup>, I.D. Treschalin<sup>1</sup>, E.V. Voznyakovskaya<sup>1</sup>, M.I. Treschalin<sup>1</sup>, T.B. Pereverzeva<sup>1</sup>,  
N.V. Eremkin<sup>1</sup>, N.V. Bulushova<sup>2</sup>, E.P. Sannikova<sup>2</sup>

**TOXICOLOGICAL PROPERTIES****OF BIOMODIFIED ENZYME DRUG - L-ASPARAGINASE WAS79**<sup>1</sup>Gause Institute of New Antibiotics, Moscow<sup>2</sup>Research Institute of Genetics and Selection, Moscow**Abstract**

Toxicological study of L-asparaginase Was79, obtained by modification of native enzyme *Wolinella succinogenes* in Research Institute of Genetics and Selection, was performed in male and female inbred rats. L-asparaginase was injected intraperitoneally at the 1 and 10 therapeutic dose (15×1200 IU/kg or 15×12000 IU/kg with 24-h interval). Dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. Five animals in each group were sacrificed 1 and 15 days post treatment. At necropsy, the organs were inspected macroscopically. The mass coefficients of heart, kidneys, liver, spleen and thymus were calculated. The pathomorphological evaluation was performed for internal organs. The results of the study demonstrate that the treatment with L-asparaginase Was79 did not produce any changes in body weight, hematology, blood biochemical or urinary parameters. Hematological, renal, gastrointestinal, and pancreatic toxicity of L-asparaginase have been documented only by microscopic pathology observation. Liver toxicity, revealed in the histopathological findings, was supported by the results of clinical chemistry. Marked elevation of ALT and alkaline phosphatase in serum was found in both treated groups. Most of these abnormalities were reversible and dose-dependent.

**Key words:** L-asparaginase, *Wolinella succinogenes*, chronic toxicity, rats.**Введение**

Ферментативные и противоопухолевые свойства L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* хорошо известны

[3; 5; 6; 7; 9; 14; 17]. В то же время, в литературе крайне мало сведений об исследованиях рекомбинантной версии этого фермента. Встречаются лишь данные о значительном увеличении ее глутаминазной активности [4].

Во ФГУП «ГосНИИгенетика» был сконструирован химерный вариант Was79 модифицированной L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, генетически слитой с гепарин-связывающим пептидом одного из белков человека. В отличие от немодифицированного белка, полученный химерный фермент обладает устойчивостью к деградации под действием трипсина, а также имеет пониженный уровень глутаминазной активности при сохранении аспарагиназной активности. Были разработаны технологии экспрессии химерного белка в клетках штамма *E. coli*, его очистки и получения лекарственной формы ГЛФ\_Was79. На модели лимфаденоза Фишера у мышей в режиме монотерапии препарат ГЛФ\_Was79 продемонстрировал эффект полного излечения животных, достоверно превосходивший эффект коммерческой L-аспарагиназы *E. coli* и немодифицированной рекомбинантной L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*.

В ФГБНУ «НИИНА» было проведено доклиническое изучение токсикологической безопасности лекарственной формы биомодифицированной L-аспарагиназы Was79 в хроническом эксперименте на половозрелых крысах.

### Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [10].

Исследование проведено на неинбредных крысах, самцах и самках, массой 150–170 г, полученных из Центрального питомника «Андреевка». Животные содержались в условиях вивария ФГБНУ «НИИНА» на стандартном рационе брикетированных экструдированных кормов и со свободным доступом к питьевой воде. После двухнедельного карантина было сформировано 6 групп животных (3 группы самцов и 3 группы самок) по 10 голов. Крысы экспериментальных групп получали L-аспарагиназу Was79 внутрибрюшинно ежедневно в течение 15 дней, в разовых дозах, составляющих 1200 и 12000 МЕ/кг, эквивалентных 1 и 10 терапевтическим дозам соответственно. Величина терапевтической дозы для крыс была вычислена путем пересчета лечебной дозы для мышей, определенной экспериментально, с учётом коэффициента поверхности тела [11]. Препарат, прошедший предварительное тестирование на пирогенность в ЛАЛ-тесте, растворяли в апиrogenном физиологическом р-ре, предварительно подогретом до +37 °С.

Оценку токсического воздействия препарата на структуру и функцию органов и тканей животных осуществляли в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [1]. Перед началом введений препарата у животных определяли фоновые показатели (масса тела, клинический анализ крови, ЭКГ). На протяжении введений ежедневно следили за состоянием и поведением животных, один раз в

неделю животных взвешивали. На 7 и 15 дни во время курса и на 1; 3; 5; 7; 10; 15 сутки после окончания курса введений препарата при помощи автоматического гематологического анализатора «Abacus Junior Vet» (Швейцария) производили клинический анализ крови (лейкоциты и лейкоцитарная формула, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, гематокрит). На 1 и 15 день после окончания курса введений препарата в сыворотке крови определяли уровни АЛТ, АСТ, ЩФ, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина, глюкозы, проводили исследование мочи (суточный диурез, клинический анализ), снимали ЭКГ. При биохимическом исследовании сыворотки крови использовали автоматический биохимический анализатор ChemWell (США). При исследовании мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес) использовали автоматический анализатор мочи Laura Smart (Лахема, Чехия). ЭКГ во втором стандартном отведении регистрировали с помощью электрокардиографа ЭКГТ-07 (Россия).

На 1 и 15 сутки после окончания курса введений L-аспарагиназы половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии. При вскрытии макроскопически оценивали состояние органов и тканей. При помощи электронных весов «Ohaus» (США) определяли массу сердца, почек, печени, селезенки и тимуса и рассчитывали их массовые коэффициенты. Статистическую обработку данных проводили по критерию t Стьюдента при помощи программы Microsoft Excel. Отличия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

Для патоморфологического исследования брали участки различных органов и тканей, фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Короткие серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином.

### Результаты и обсуждение

L-Аспарагиназы на протяжении последних 40 лет успешно применяют в комбинированной химиотерапии острых лимфобластных лейкозов и спектр опухолей, чувствительных к действию данных ферментов, постоянно расширяется [2]. Основными видами побочного действия препаратов L-аспарагиназы, разрешенных для клинического применения, являются гиперчувствительность, анафилактические реакции, тромбозы, кровоизлияния, повышение активности трансаминаз, панкреатиты и гипергликемия [16]. Нарушения функции почек, гипопроотеинемия и реакции желудочно-кишечного тракта встречаются реже. Некоторые побочные эффекты L-аспарагиназы, особенно – негативное влияние на функцию печени, связывают с ее глутаминазной активностью [15]. Создание L-аспарагиназы со сниженной глутаминазной активностью позволило бы улучшить терапевтические свойства этого препарата. В 1976 г. была получена L-аспарагиназа из дикого штамма *Wolinella succinogens* (Was), практически лишённая L-

глутаминазной активности [5; 6; 8], но практического развития эта разработка не получила.

Во ФГУП «ГосНИИгенетика» был создан химерный вариант Was79, модифицированной L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* со сниженной глутаминазной активностью. Его токсические свойства были оценены в хроническом эксперименте на крысах.

Проведенные исследования показали, что ежедневное 15-кратное введение L-аспарагиназы Was79 в испытанных дозах хорошо переносится животными и не вызывает их гибели.

Не было отмечено и отклонений в поведенческих реакциях животных. Крысы нормально прибавляли в массе тела, состояние кожи и волосяного покрова не изменялось, что свидетельствует об отсутствии у препарата ярко выраженного общетоксического действия.

Известно, что применение препаратов L-аспарагиназы может приводить к развитию лейкопении, тромбоцитопении, изменениям в системе гемостаза [19]. L-аспарагиназа Was79 в исследованном режиме и дозах гематотоксических свойств не проявила.

Общее количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула во всех подопытных группах на всём протяжении опыта не отличались от таковых контроля. Общее количество эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина и величина гематокрита колебались в пределах физиологической нормы.

При патоморфологическом исследовании было установлено, что применение препарата в дозе, 10-кратно превышающей терапевтическую, вызывает глубокие атрофические изменения лимфоидной ткани селезенки (рис. 1, А-Б) и лимфоузлов (рис. 2, А-Б). В течение 15 дней происходит частичная репарация структуры этих органов.

При оценке влияния препарата на функцию почек по показателям общего анализа мочи, уровню креатинина и мочевины в сыворотке крови крыс отличий от группы контроля выявлено не было. Признаки нефротоксичности L-аспарагиназы Was79 были обнаружены только при патоморфологическом исследовании.

Превышение терапевтической дозы в 10 раз приводило возникновению патологических изменений как в канальцевой, так и в клубочковой системе почек (рис. 3, А-Б). Хотя деструктивным процессам подвергались лишь отдельные клубочки, их повреждение завершалось рубцеванием (Рис. 3, В).

По данным ЭКГ у животных, получавших препарат в обеих изученных дозах, признаков кардиотоксичности найдено не было.

Однако при патоморфологическом исследовании при применении L-аспарагиназы в разовой дозе, составляющей 10 терапевтических, на 1 сутки после курса введений в сердечной мышце был найден очаговый отек интерстиция, в области отека – мелкие очаги токсической кардиомиопатии. К концу эксперимента структура миокарда полностью восстанавливалась.

При биохимическом исследовании сыворотки крови на 1 сутки после окончания 15-дневного курса введений препарата как в 1, так и в 10 терапевтических дозах, было выявлено повышение активности АЛТ (рис. 4) и ЩФ (рис. 5). К 15 суткам после курса введений препарата уровни АЛТ и ЩФ возвращался к нормальным значениям.

Нарушение функции печени, которое проявляется в виде повышения активности трансаминаз и ЩФ, – часто возникающий побочный эффект L-аспарагиназ, используемых в клинике [18]. Как правило, он сопровождается снижением сывороточного альбумина. В наших исследованиях уровень сывороточного альбумина не изменялся, что, по-видимому, связано со сниженной глутаминазной активностью Was79. Тем не менее, препарат, примененный в высокой дозе, вызывал морфологические изменения в ткани печени. Степень и характер патологических изменений значительно различались у разных особей. У одних животных они выражались в нарушении гемодинамики и явлениях дистрофии, у других – усугублялись деструктивными изменениями (рис. 6, А–Б). К концу эксперимента у всех животных развивался тотальный или очаговый жировой гепатоз (рис. 6, В).

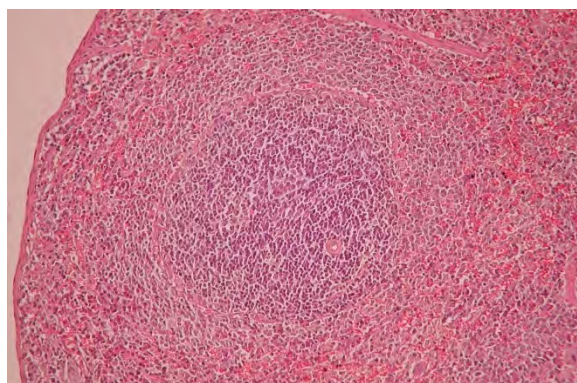
При микроскопическом исследовании поджелудочной железы на 1 сутки после курса введений препарата в высокой дозе у части животных были найдены множественные мелкие очаги некроза небольших групп ацинусов, отмечена очаговая деструкция клеток в островках Лангерганса. К концу наблюдения у некоторых животных были обнаружены отложения гемосидерина вокруг островков, сосудов и протоков, склерозирование отдельных островков. Очаги некроза ацинусов подвергались организации. Полученные данные отчасти согласуются с результатами экспериментальных и клинических исследований, в которых было установлено свойство L-аспарагиназ, полученных из разных источников, вызывать геморрагические панкреатиты, различные изменения в островках Лангерганса от отека до некроза [12; 20], гипергликемию [13]. Однако L-аспарагиназа Was79 диабетогенных свойств не проявила. Гипергликемия не была выявлена даже при применении препарата в дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую.

Деструктивные изменения в слизистой оболочке желудка, тощей и толстой кишки также возникали не у всех животных.

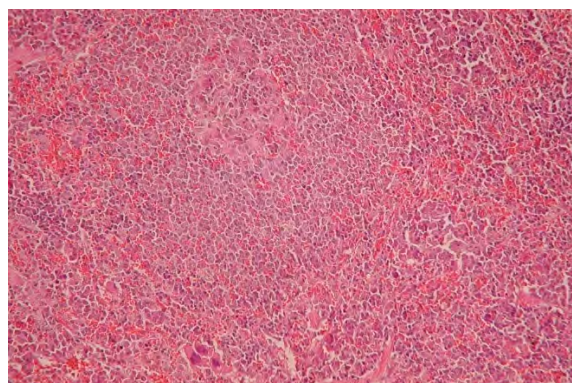
Неполное восстановление структуры слизистой оболочки желудка сопровождалось формированием кистоподобных структур в области дна и тела желез. Поврежденные участки кишечника подвергались склерозированию.

Таким образом, L-аспарагиназа Was79 по своему токсикологическому профилю значительно не отличается от имеющихся в настоящее время в распоряжении клиницистов препаратов L-аспарагиназы. Основным видом лимитирующей токсичности для нее остается гепатотоксичность, признаки которой выявляются как клинико-лабораторными методами, так и морфологически.





А

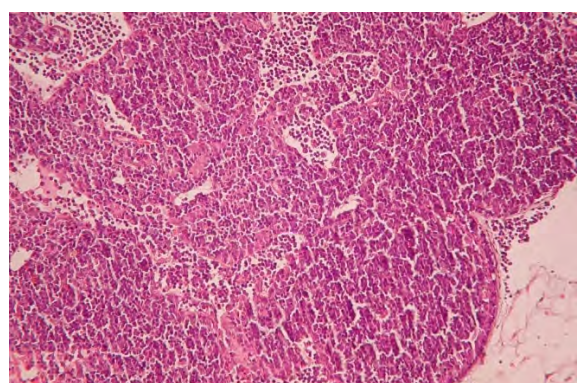


Б

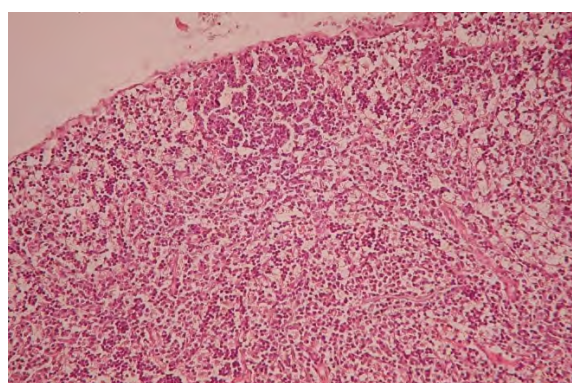
**Рис. 1.** Селезенка крысы,  $\times 20$ , окраска гематоксилин-эозин:

А – интактный контроль;

Б – L-аспарагиназа по 12000 МЕ/кг ежедневно в течение 15 суток, 1-е сутки после курса: глубокая атрофия лимфoidной ткани фолликулов.



А

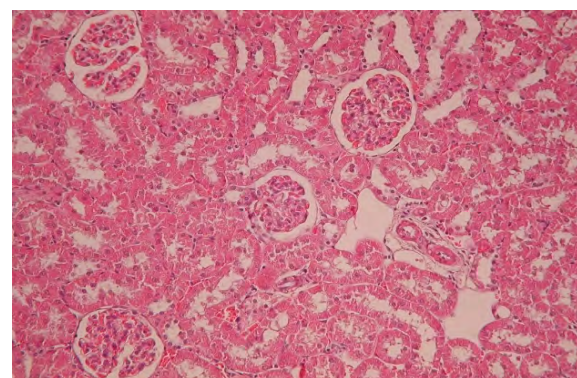


Б

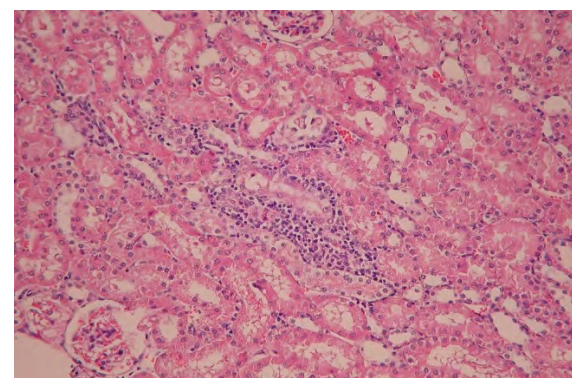
**Рис. 2.** Лимфоузел крысы,  $\times 20$ , окраска гематоксилин-эозин:

А – интактный контроль;

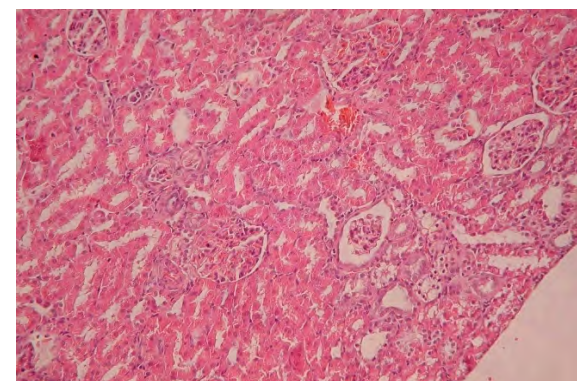
Б – L-аспарагиназа по 12000 МЕ/кг ежедневно в течение 15 суток, 1-е сутки после курса: глубокая атрофия лимфoidной ткани в корковой зоне.



А



Б



В

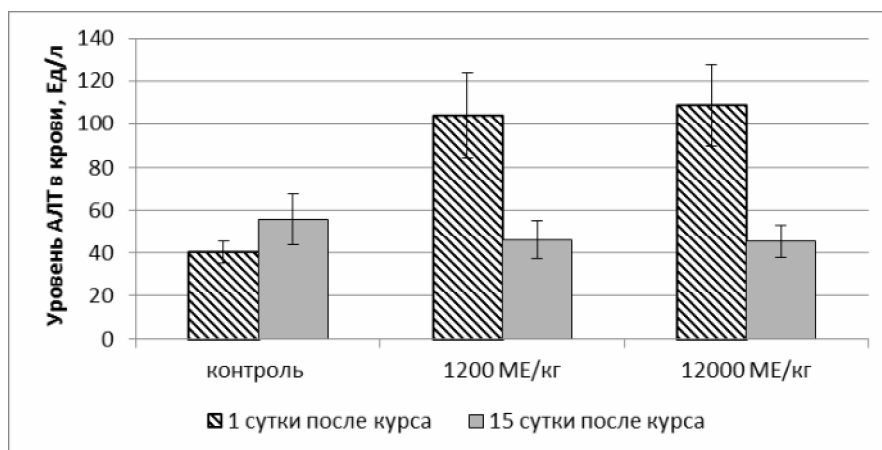
**Рис. 3.** Почка крысы,  $\times 20$ , окраска гематоксилин-эозин:

А – интактный контроль;

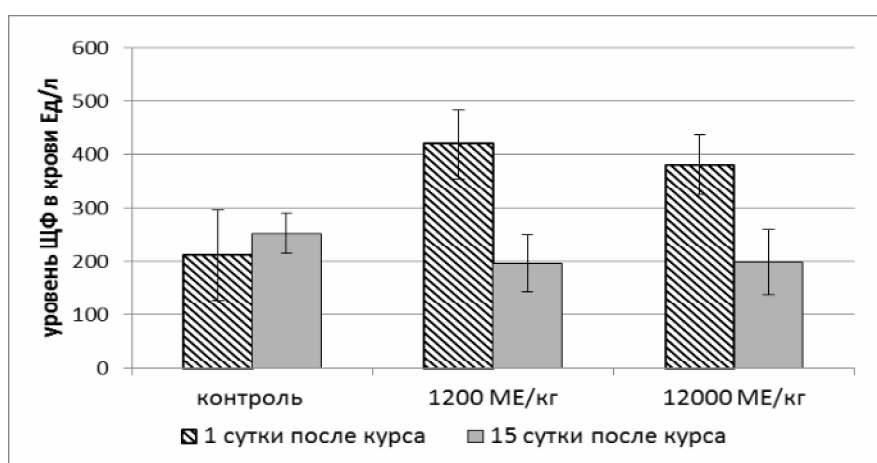
Б – L-аспарагиназа по 12000 МЕ/кг ежедневно в течение 15 суток, 1-е сутки после курса: очаг некроза и вакуольной дистрофии извитых канальцев; вакуолизация эндотелия капилляров клубочка, очаговая деструкция капиллярной сети;

В – L-аспарагиназа по 12000 МЕ/кг ежедневно в течение 15 суток, 15-е сутки после курса: рубцующийся клубочек, очаги деструкции канальцев в стадии организации.

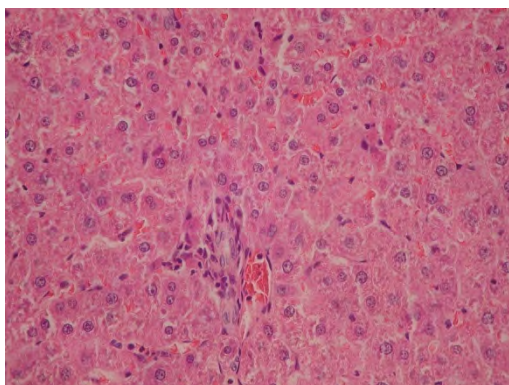




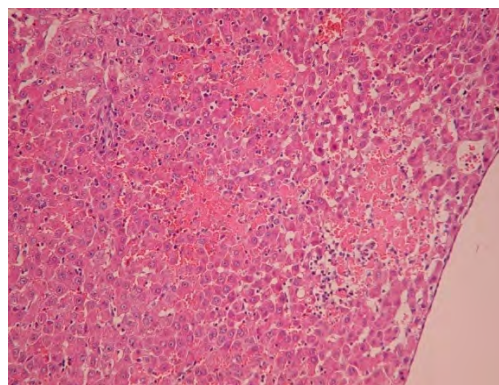
**Рис. 4.** Активность АЛТ в сыворотке крови крыс на 1 и 15 сутки после курса введений L-аспарагиназы Was79



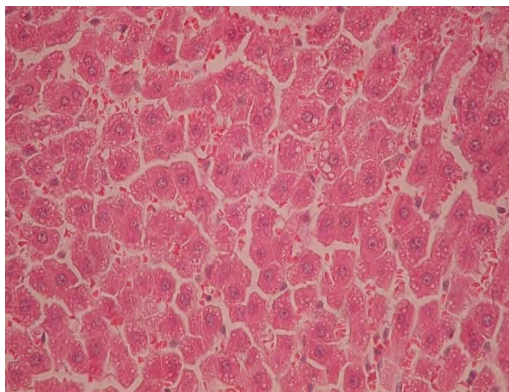
**Рис. 5.** Активность ЩФ в сыворотке крови крыс на 1 и 15 сутки после введений L-аспарагиназы Was79



**А**



**Б**



**В**

**Рис. 6.** Печень крысы, окраска гематоксилин-эозин:

А – интактный контроль,  $\times 20$ ;

Б – L-аспарагиназа по 12000 МЕ/кг ежедневно в течение 15 суток, 1-е сутки после курса: отек, кровоизлияния, некроз гепатоцитов,  $\times 20$ ;

В – L-аспарагиназа по 12000 МЕ/кг ежедневно в течение 15 суток, 15-е сутки после курса: тотальная жировая дистрофия гепатоцитов,  $\times 40$ .

При 10-кратном превышении терапевтической дозы морфологически проявляется панкреато-, нефро-, гемато- и гастроинтестинальная токсичность. При курсовом применении L-аспарагиназы Was79 в дозе, составляющей 1 терапевтическую, морфологические изменения в печени, почках, селезенке и поджелудочной железе выражены умеренно и обратимы в течение 15 суток.

Необходимо отметить, что степень тяжести повреждающего действия L-аспарагиназы Was79 зависит от индивидуальной чувствительности организма животных.

### Заключение

В хроническом эксперименте на крысах L-аспарагиназа Was79 проявила слабо выраженные токсические свойства.

### Литература

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч.1. – С. 13–24.
2. Соколов М.А., Эльдаров М.В. Покровская С.С. и др. Бактериальные рекомбинантные L-аспарагиназы: свойства, строение и антипролиферативная активность // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 3. – С. 312–24.
3. Bendich A., Kafkewitz D., Abuchowski A., Davis F.F. Immunological effects of native and polyethylene glycol-modified asparaginases from *Vibrio succinogenes* and *Escherichia coli* in normal and tumour-bearing mice // Clin. Exp. Immunol. – 1982. – 48. – P. 273–8.
4. Derst C., Henseling J., Röhm K.H. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position // Protein Science. – 2000. – P. 2009–17.
5. Distasio J.A., Niederman R.A., Kafkewitz D., Goodman D. Purification and characterization of L-asparaginase with antilymphoma activity from *Vibrio succinogenes* // J. Biol. Chem. – 1976. – 251(69). – P. 29–33.
6. Distasio J.A., Niederman R.A., Kafkewitz D. Antilymphoma activity of a glutaminase-free L-asparaginase of microbial origin // Exp Biol Med. – 1977. – 155(26). – P. 528–31.
7. Distasio J.A., Salazar A.M., Nadji M., Durden D.L. Glutaminase-Free Asparaginase From *Vibrio Succinogenes*: An Antilymphoma Enzyme Lacking Hepatotoxicity // Znt. J. Cancer. – 1982. – 30. – P. 343–7.
8. Durden D.L., Distasio J.A. Characterization of the effects of asparaginase from *Escherichia coli* and a glutaminase free asparaginase from *Vibrio succinogenes* on specific cell-mediated cytotoxicity // Int. J. Cancer. – 1981. – 27. – P. 59–65.
9. Durden D.L., Salazar A.M., Distasio J.A. Kinetic analysis of hepatotoxicity associated with antineoplastic asparaginases // Cancer Res. – 1983. – 43. – P. 1602–5.
10. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, ETS No. 123). – 1986.
11. Freireich E.J., Gehan E.A., Rail D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man // Cancer Chemother. Repts. – 1966. – 50(4). – P. 219–44.
12. Haskell S.M., Canellos G.P., Leventhal B.G. et al. L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease // New Engl. J. Med. – 1969. – 281. – P. 1028–34.
13. Khan A., Adachi M., Hill J.M. Diabetogenic effect of L-asparaginase // J. Clin. Endocrinol. & Metab. – 1969. – 29. – P. 1373–9.
14. Lubkowski J., Palm G.J., Gilliland G.L. et al. Crystal structure and amino acid sequence of *Wolinella succinogenes* L-asparaginase // Eur. J. Biochem. – 1996. – 241. – P. 201–7.
15. Ollenschläger G., Roth E., Linkesch W. et al. Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects // Eur. J. Clin. Invest. – 1988. – 18(5). – P. 512–6.
16. Plourde P.V., Jeha S., Hijiya N. et al. Safety profile of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* in a large compassionate-use trial // Pediatric Blood & Cancer. – 2014. – 61(7). – P. 1232–8.
17. Reinert R.B., Oberle L.M., Wek S.A. et al. Role Of Glutamine Depletion In Directing Tissue-Specific Nutrient Stress Responses To L-Asparaginase // J. Biol. Chem. – 2006. – 281. – P. 31222–33.
18. Storti E., Quaglini D. Dysmetabolic and neurologic complications in leukemic patients treated with L-asparaginase. In Experimental and clinical Effects of L-asparaginase. New York, Springer-Verlang, 1970. – P. 344–9.
19. Wintrobe M.M. Clinical hematology, ed. 6. – Philadelphia, Lea & Febiger, 1969. – P. 1044.
20. Zubrod C.G. The clinical toxicities of L-asparaginase in treatment of leukemia and lymphoma // Pediat. – 1970. – 45. – P. 555–9.

Даже при применении в суммарной дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую, препарат не оказывал влияния на показатели периферической крови, функцию почек и сердечно-сосудистой системы. Выявленное в этой группе животных повышение активности АЛТ и ЩФ, свидетельствует о гепатотоксическом действии препарата. При патоморфологическом исследовании были обнаружены повреждения тканей сердца, печени, почек, селезенки, лимфоузлов, семенников, желудка, тощей и толстой кишки, поджелудочной железы. Структура почек, селезенки и поджелудочной железы и лимфоузлов полностью восстанавливалась в течение 15 дней, структура печени восстанавливалась только у части животных. Зависимость изменений структуры внутренних органов крыс, возникающих под действием препарата, от величины примененной дозы позволяет рекомендовать L-аспарагиназу Was79 для дальнейшего изучения.