

ОЦЕНКА ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ БИОМОДИФИЦИРОВАННОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ WAS79 В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРОЛИКАХ

Э.Р. Переверзева¹, И.Д. Трещалин¹, М.И. Трещалин¹, Е.В. Возняковская¹, Т.Б. Переверзева¹,
Н.В. Еремкин¹, Н.В. Булушова², Е.П. Санникова²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»; Россия, 119021, Москва, ул. Б. Пироговская, 11, стр. 1;

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»; Россия, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

Контакты: Элеонора Рафаиловна Переверзева pereverzeva-ella@yandex.ru

Цель исследования — изучение токсических свойств лекарственной формы биомодифицированной L-аспарагиназы Was79 в хроническом эксперименте на кроликах.

Материалы и методы. На самцах и самках кроликов породы «Советская шиншилла» проведено изучение хронической токсичности L-аспарагиназы Was79, производной природного фермента *Wolinella succinogenes*, полученной во ФГУП «ГосНИИ-генетика». Препарат вводили внутривенно в 1 и 5 терапевтических дозах (100 и 500 МЕ/кг ежедневно в течение 15 сут). Параметры исследования: масса тела, клинический и биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, электрокардиография, патоморфологическое исследование внутренних органов.

Результаты. Показано, что применение Was79 не оказывает влияния на функцию сердца и почек, но повреждает их структуру. Гастроинтестинальная токсичность проявляется в виде снижения массы тела животных, диареи, изменений слизистой оболочки желудка и кишечника. Гематотоксичность выражается в снижении общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов в периферической крови и атрофии лимфоидной ткани в селезенке, тимусе и лимфатических узлах. Увеличение уровня прямого и общего билирубина и патологические изменения в печени были отмечены в группах животных, получавших как высокую, так и низкую дозу Was79.

Выводы. Обнаруженные изменения обратимы и зависят от дозы препарата.

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

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-47-54

EVALUATION OF BIOMODIFIED L-ASPARAGINASE WAS79 SIDE EFFECTS IN CHRONIC EXPERIMENT ON RABBITS

E.R. Pereverzeva¹, I.D. Treschalin¹, M.I. Treschalin¹, E.V. Voznyakovskaya¹, T.B. Pereverzeva¹,
N.V. Eremkin¹, N.V. Bulushova², E.P. Sannikova²

¹Gause Institute of new antibiotics; p. 1, 11, B. Pirogovskaya str., Moscow, 119021, Russia;

²Research Institute of Genetics and Selection; 1, 1st Dorozhny proezd, Moscow, 117545, Russia

Objective. The aim of the study was to research the toxicity of L-asparaginase Was79 in rabbits.

Materials and methods. Chronic toxicity 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 Russian chinchilla rabbits. L-asparaginase was injected intravenously at the 1 and 5 therapeutic dose (15 × 100 IU/kg or 15 × 500 IU/kg with 24-h interval). The following parameters were tested: body mass, clinical and biochemical blood tests, urinalysis, electrocardiography, pathomorphological evaluation of internal organs.

Results. The results of the study suggest that the treatment with L-asparaginase Was79 does not influence on the function of heart and kidneys, but damages their structure. Loss in body mass, diarrhea and alteration of stomach and intestine mucosa could be interpreted as evidence of gastrointestinal toxicity. Hematological toxicity was exhibited as a decrease of total leukocyte count, lymphocyte and neutrophils count level in peripheral blood and atrophy of lymphoid tissue of the spleen, thymus and lymph nodes. Elevation of total and direct bilirubin in serum and histopathological findings in liver were found in groups treated with both high and low doses of Was79.

Conclusion. Most of these abnormalities were reversible and dose-dependent.

Key words: L-asparaginase, *Wolinella succinogenes*, chronic toxicity, rabbits

Введение

Токсичность L-аспарагиназ связывают с их глутаминазной активностью [1–5]. Во многих исследованиях было показано, что уменьшение содержания глутаминазы в препарате приводит к ослаблению его гепато- и панкреатотоксичности, иммуносупрессивного действия, но сопровождается снижением противоопухолевого эффекта [6–9].

Во ФГУП «ГосНИИгенетика» был сконструирован химерный вариант Was79, модифицированной L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, генетически слитой с гепаринсвязывающим пептидом одного из белков человека, с пониженным уровнем глутаминазной активности.

Преимущества Was79: высокая противоопухолевая эффективность, устойчивость к протеолизу под действием трипсина, продолжительная циркуляция в кровотоке [10, 11].

Цель исследования — изучение токсических свойств лекарственной формы биомодифицированной L-аспарагиназы Was79 в хроническом эксперименте на кроликах.

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 [12]. Исследования проведены на половозрелых кроликах породы «Советская шиншилла», самцах и самках массой 2200–2700 г, полученных из центрального питомника «Белый Мох». После 2-недельного карантина животные были разделены на 6 групп по 6 особей в каждой. Was79 вводили в краевую вену уха в течение 15 сут в разовых дозах 100 и 500 МЕ/кг, эквивалентных 1 и 5 терапевтическим дозам соответственно. Величина терапевтической дозы для кролика была рассчитана путем пересчета лечебной дозы для мышей, определенной экспериментально [13]. Контролем служили интактные животные обоих полов.

Оценку токсического действия препарата осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия лекарственных средств [14]. В ходе эксперимента проводили визуальный, инструментальный и лабораторный контроль состояния животных. Массу тела животных определяли 1 раз в неделю при помощи весов «Сартогосм» (Россия). Клинический анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоформула и гематокрит) производили на 0, 7-е и 15-е сутки во время курса и на 1, 3, 5, 7, 10 и 15-е сутки по окончании курса введений Was79 (Abacus Junior Vet, Швейцария). На 1-е и 15-е сутки по окончании курса введений препарата в сыворотке

крови определяли аланиновую (АЛТ) и аспарагиновую аминотрансферазу (АСТ), щелочную фосфатазу (ЩФ), креатинин, мочевины, билирубин (прямой и общий), общий белок, альбумин, глюкозу (ChemWell, США). На 1-й и 15-й дни по окончании курса введений регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) во 2-м стандартном отведении («ЭК1Т-07», Россия), проводили клинический анализ мочи (Laura Smart Lachema, Чехия).

На 1-е и 15-е сутки по окончании курса введений препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии. Сердце, печень, почки, тимус и селезенку взвешивали и определяли их массовые коэффициенты. Участки внутренних органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Полученные количественные данные подвергали статистической обработке при помощи компьютерной программы StatPlus 2006 с использованием критерия *t* Фишера — Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящее время в терапии определенных видов лейкозов используют 3 типа L-аспарагиназ: эльспар (ЕсА), онкаспар (пэгаспаргаза, РЕсА) и эрвиназа (ЕгА). ЕсА (нативный фермент) и его рекомбинантное пегилированное производное РЕсА получены из *Escherichia coli*, ЕгА — из *Erwinia chrysanthemi*. Клиническое изучение L-аспарагиназ, продолжавшееся более 40 лет, показало, что применение как ЕсА, так и ЕгА, сопровождают реакции гиперчувствительности, выраженная иммуносупрессия, коагулопатии, поражения печени и поджелудочной железы [15]. Пегилирование аспарагиназы позволяет несколько уменьшить интенсивность иммунного ответа [16]. По выраженности и частоте развития других побочных эффектов у пациентов эти препараты существенно не различаются [3, 17].

Экспериментальные исследования L-аспарагиназ, проведенные на различных видах животных, показали, что кролики наиболее чувствительны к токсическому действию этих лекарственных средств [15, 18, 19], поэтому особый интерес представляет изучение побочных эффектов лекарственной формы Was79 на кроликах.

Проведенное исследование показало, что животные хорошо переносят препарат. В течение эксперимента ни в одной из групп не было отмечено гибели животных, отклонений в поведенческих реакциях, изменений состояния кожи и волосяного покрова. У части животных, получавших препарат в высокой дозе, сразу после окончания курса введений возникал ринит. У 1 животного выявлен конъюнктивит.

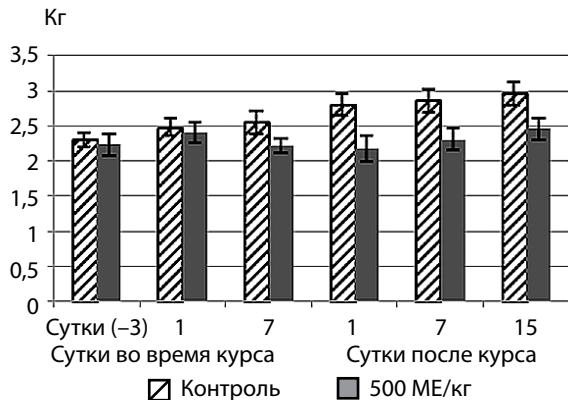


Рис. 1. Динамика массы тела самцов после курса введений L-аспарагиназы Was 79

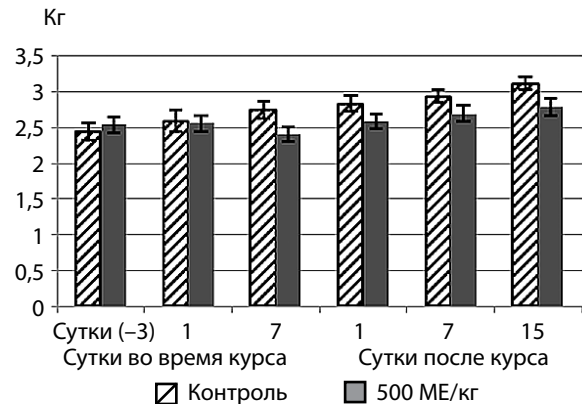


Рис. 2. Динамика массы тела самок после курса введений L-аспарагиназы Was 79

Риниты и конъюнктивиты при клиническом применении L-аспарагиназа отмечают довольно редко, в основном их ассоциируют с гиперчувствительностью к препарату [19, 20].

У некоторых животных, получавших Was 79 в разовой дозе 500 МЕ/кг, к середине курса введений развилась диарея, которая сохранялась до 3–5 сут после окончания курса. После 7 введений у этих животных было отмечено достоверное уменьшение массы тела, которое сохранялось до окончания срока наблюдения (рис. 1, 2).

Диарея и снижение массы тела — распространенные побочные эффекты при клиническом применении аспарагиназа [20], которые были обнаружены и в экспериментах на кроликах при изучении EcA и EgA [15, 19, 21].

При патоморфологическом исследовании животных, получавших Was 79 в высокой дозе, на 1-е сут после курса введений препарата в желудке 3 самцов и 2 самок были найдены очаги деструкции или атрофии покровно-ямочного эпителия, полнокровие его капилляров (рис. 3а, б). Такие же изменения были выявлены у 1 самца и 2 самок и на 15-е сут после курса. У остальных животных структура слизистой оболочки желудка не отличалась от контроля. Повреждающее действие Was 79 на структуру слизистой оболочки тонкой кишки проявлялось только при использовании препарата в высокой дозе и выражалось в виде полнокровия капилляров и деструкции апикальной зоны ворсинок (рис. 3в, г). К концу наблюдения она полностью восстанавливалась.

При исследовании гематотоксических свойств Was 79 изменений количества эритроцитов, тромбоцитов, содержания гемоглобина, величины гематокрита не выявлено. Однако во всех группах подопытных животных к концу курса введений было зарегистрировано уменьшение общего количества лейкоцитов, которое при этом не выходило за пределы физиологической нормы.

У самцов снижение числа лейкоцитов происходило за счет уменьшения количества лимфоцитов, у самок — как за счет лимфоцитов, так и за счет гранулоцитов. Снижение количества лимфоцитов у самок возникало только при применении препарата в высокой дозе (рис. 4–9).

При анализе массива данных о побочных эффектах L-аспарагиназа в клинической практике установлено, что изменения общего количества лейкоцитов возникают у 3,8 % больных. У части пациентов количество лейкоцитов уменьшается за счет лимфоидных элементов, у 2,3 % лейкоцитопения проявляется в виде нейтропении [17, 22].

Данные гематологического исследования коррелировали с результатами патоморфологического изучения структуры селезенки, тимуса и лимфатических узлов (ЛУ). На 1-е сутки после курса введений Was 79 в разовой

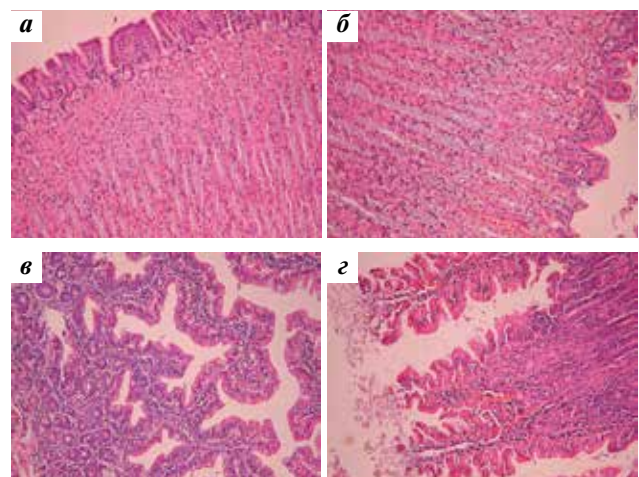


Рис. 3. Структура слизистой оболочки желудка и тонкой кишки до и после курса введений L-аспарагиназы Was 79: а — желудок, интактный контроль. ×20; б — желудок, Was 79 500 МЕ/кг. ×15. Полнокровие капилляров, очаги деструкции или атрофии покровно-ямочного эпителия. ×20; в — тонкая кишка, интактный контроль, ×20; г — тонкая кишка, Was 79 500 МЕ/кг. ×15. Полнокровие капилляров, деструкция апикальной зоны ворсинок. ×20

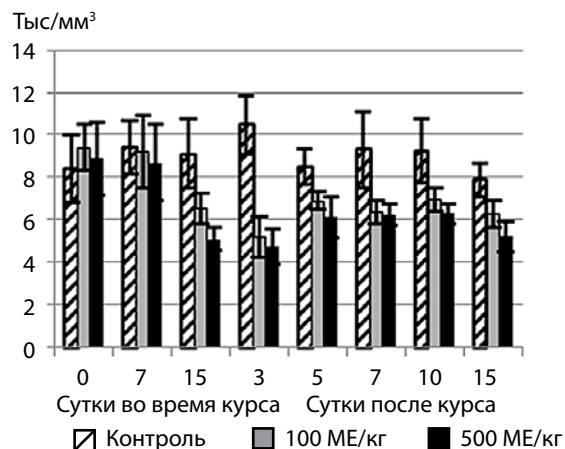


Рис. 4. Общее количество лейкоцитов у самцов кроликов

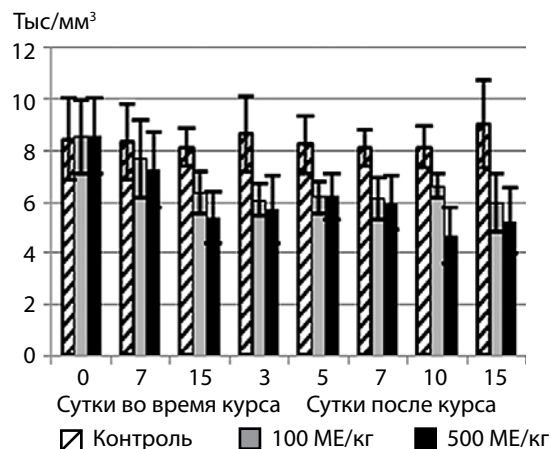


Рис. 5. Общее количество лейкоцитов у самок кроликов

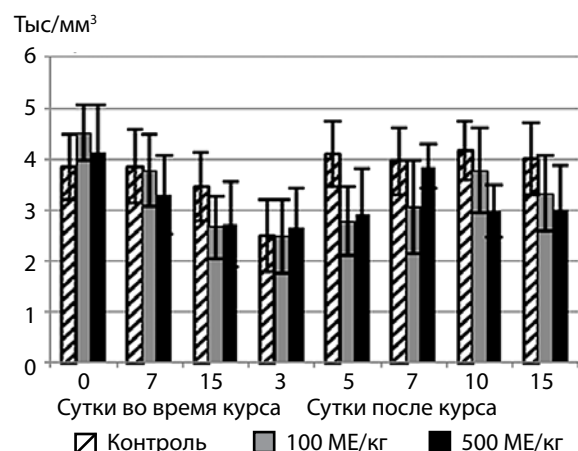


Рис. 6. Абсолютное количество гранулоцитов у самцов кроликов

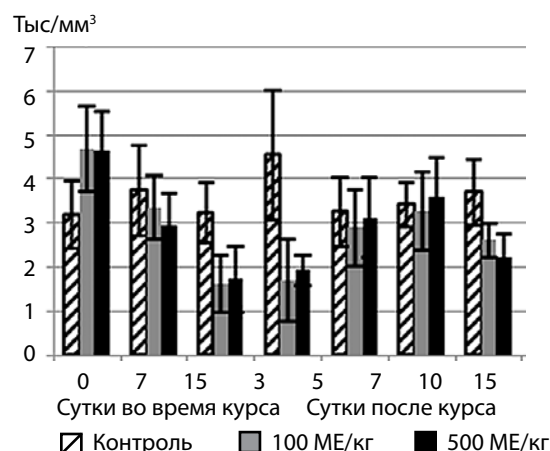


Рис. 7. Абсолютное количество гранулоцитов у самок кроликов

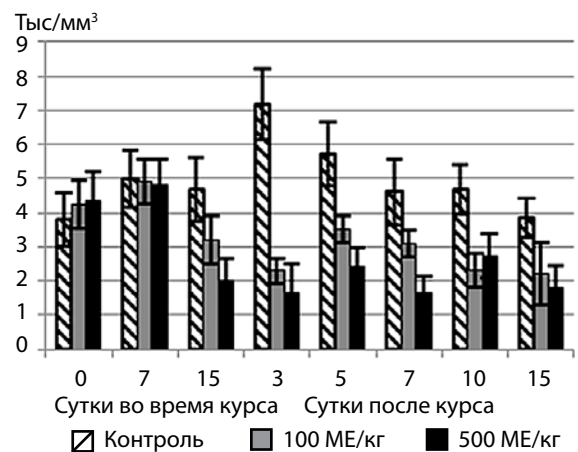


Рис. 8. Абсолютное количество лимфоцитов у самцов кроликов

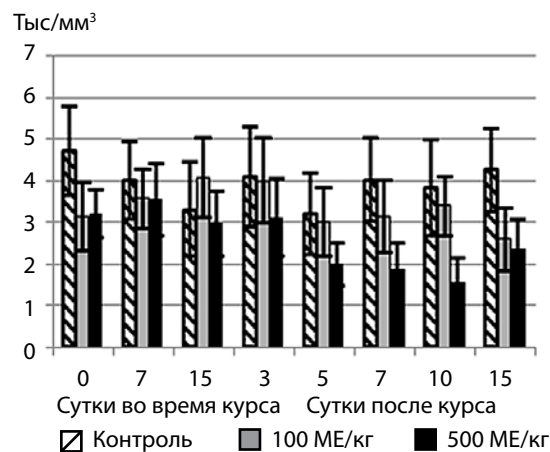


Рис. 9. Абсолютное количество лимфоцитов у самок кроликов

дозе 500 МЕ/кг были отмечены глубокая атрофия лимфоидной ткани фолликулов в селезенке (рис. 10а, б), резкое полнокровие красной пульпы, а у некоторых животных — и кровоизлияния (рис. 10в). У животных, получавших Was79 в терапевтической дозе, эти изме-

нения были менее выражены. К концу эксперимента структура органа не отличалась от контроля.

Несмотря на глубокие атрофические изменения в лимфоидной ткани селезенки, ее массовый коэффициент не уменьшался, что, по-видимому, связано

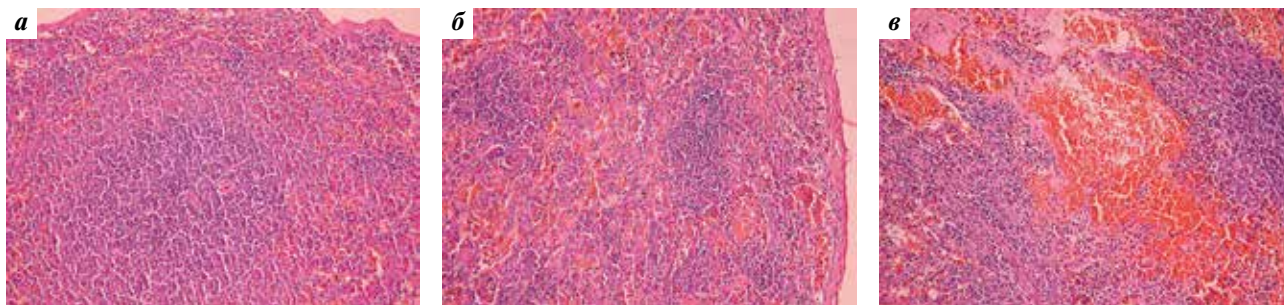


Рис. 10. Структура селезенки до и после курса введений *L*-аспарагиназы Was79: а — интактный контроль. $\times 20$; б — Was79 500 ME/кг. $\times 15$. Глубокая атрофия лимфоидной ткани фолликулов. Резкое полнокровие красной пульпы. $\times 20$; в — Was79 500 ME/кг. $\times 15$. Кровоизлияния в красной пульпе. $\times 20$

с полнокровием органа. Отек и полнокровие в селезенке были отмечены и в других исследованиях, проведенных на кроликах [23], в которых также наблюдали некроз герминативных центров в селезенке и ЛУ [19, 23].

В нашем эксперименте введение Was79 в разовой дозе 500 ME/кг приводило на 1-е сутки после курса к глубокой атрофии лимфоидной ткани фолликулов в ЛУ и в корковой и мозговой зоне тимуса, что подтверждалось снижением массового коэффициента тимуса. Использование терапевтической дозы препарата не оказывало повреждающего действия на структуру тимуса и ЛУ.

Глубокие атрофические изменения лимфоидной ткани селезенки, ЛУ и тимуса — выраженные признаки иммуносупрессивного действия исследуемого препарата. Хотя они проявлялись только при применении высокой дозы Was79, можно ожидать проявления иммуносупрессии и в клинике.

Признаки гепатотоксического действия препарата в виде повышения содержания прямого и общего билирубина в сыворотке крови были выявлены на 1-е сутки после окончания введений Was79. Через 15 сут эти показатели не отличались от контроля (рис. 11–14).

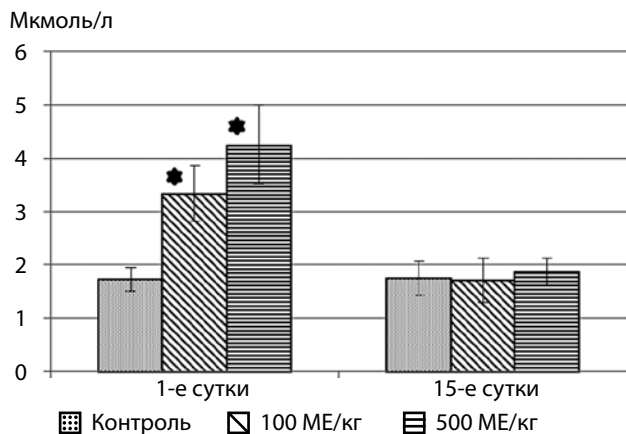


Рис. 11. Общий билирубин (самцы кроликов). Здесь и на рис. 12–14: * отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$

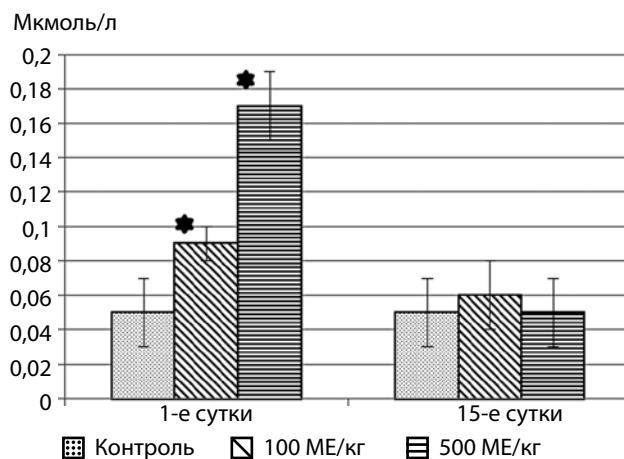


Рис. 12. Прямой билирубин (самцы кроликов)

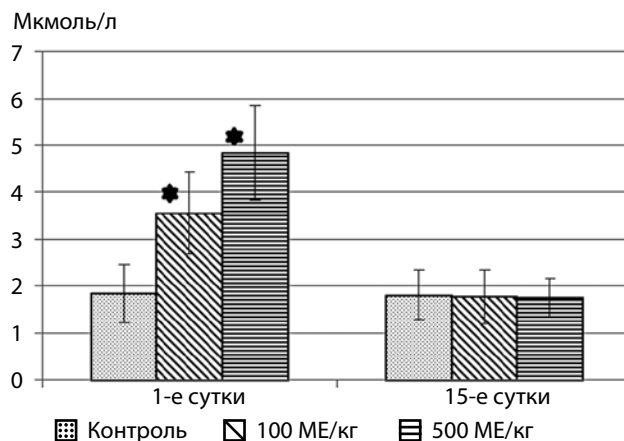


Рис. 13. Общий билирубин (самки кроликов)

При патоморфологическом изучении структуры печени животных, получавших препарат в высокой дозе как на 1-е, так и на 15-е сутки после курса введений были обнаружены очаги микронекроза вблизи триад и центральных вен (рис. 15а, б). На 15-е сутки у 1 самца и 1 самки вокруг отдельных триад было выявлено повышенное развитие соединительной ткани и найдены небольшие группы гепатоцитов в состоянии вакуольной дистрофии (рис. 15в, г). При применении Was79 в дозе 100 ME/кг эти явления были

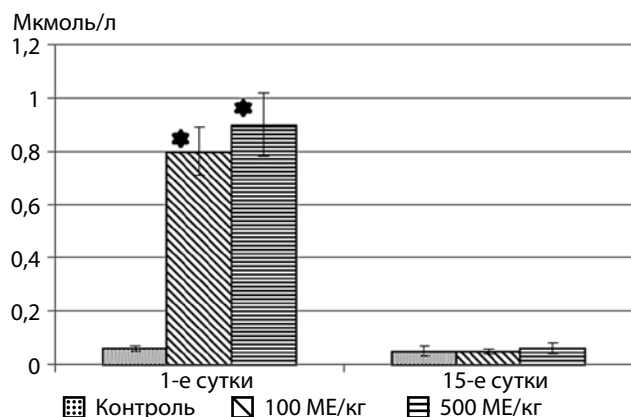


Рис. 14. Прямой билирубин (самки кроликов)

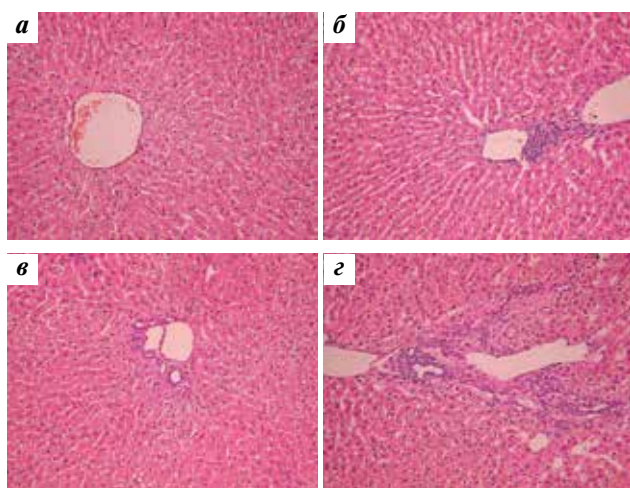


Рис. 15. Структура печени до и после курса введений L-аспарагиназы Was79: а – интактный контроль. Центральная вена. $\times 20$; б – Was79 500 МЕ/кг. $\times 15$. Некроз гепатоцитов вблизи центральной вены. $\times 20$; в – интактный контроль. Триада. $\times 20$; г – Was79 500 МЕ/кг. $\times 15$. Умеренный отек, микронекроз, повышенное развитие соединительной ткани вокруг триады, небольшая группа гепатоцитов в состоянии вакуольной дистрофии. $\times 20$

выражены слабее и отмечались лишь у отдельных животных сразу после курса.

Гепатотоксичность – один из распространенных видов токсичности L-аспарагиназа. В доклинических исследованиях ЕсА и ЕгА ее проявления в виде вакуолизации гепатоцитов, повышения уровня трансаминаз, жировой дистрофии печени были отмечены у кроликов и обезьян, причем у животных, получавших ЕгА, они были менее выраженными [15]. У пациентов нарушения функции печени включают повышение АЛТ, АСТ, ЩФ, билирубина (прямого и общего), сывороточного альбумина, фибриногена плазмы крови. При исследовании биоптатов печени обнаруживается жировая дистрофия гепатоцитов [19, 24–26].

При исследовании состава мочи на 1-е и 15-е сутки после окончания курса введений Was79 различий между подопытными и контрольными группами не выявлено. Однако при патоморфологическом

изучении структуры почек на 1-е сутки после курса введений препарата в разовой дозе 500 МЕ/кг наряду с полнокровием капилляров интерстиция и сильным периваскулярным отеком в корковой и юкстамедуллярной зонах были обнаружены множественные мелкие очаги деструкции извитых канальцев (рис. 16а, б). В клубочках юкстамедуллярной зоны отмечена резкая вакуолизация эндотелия капилляров, очаговая деструкция капиллярной сети (рис. 16в). У 2 самок к концу наблюдения во всех зонах почки были выявлены множественные обширные очаги некроза канальцев, которые подвергались организации с формированием кист, содержащих аморфные белковые массы (рис. 16г). Применение Was79 в низкой дозе приводило к умеренному периваскулярному отеку, возникновению единичных мелких очагов деструкции извитых канальцев.

При клиническом применении L-аспарагиназа патология почек выявлена только при передозировках препарата [17]. Единичные случаи острой почечной недостаточности были отмечены у больных, получавших ЕсА [27].

По результатам ЭКГ-признаков кардиотоксического действия Was79 не обнаружено. Ее использование в терапевтической дозе не оказывало влияния на структуру миокарда животных. При введении препарата в высокой дозе у 1 самца и 1 самки на 1-е сутки и у 1 самца на 15-е сутки после курса были найдены крупные очаги токсической кардиомиопатии, отека и вакуолизации мышечных волокон.

Нарушения структуры и функции сердца, которые выявляются при лечении больных, вторичны

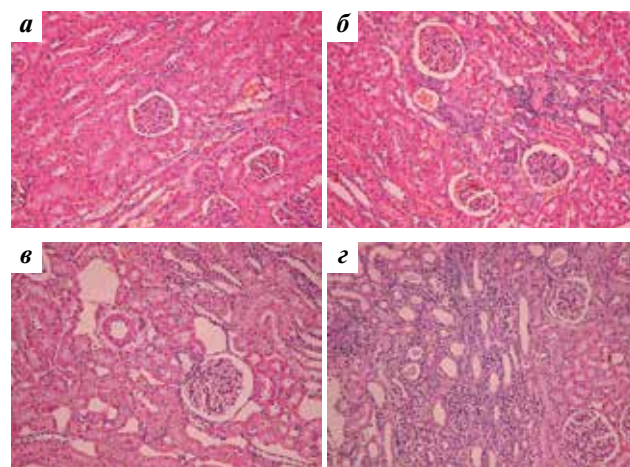


Рис. 16. Структура почки до и после курса введений L-аспарагиназы Was79: а – интактный контроль. Юкстамедуллярная зона. $\times 20$; б – Was79 500 МЕ/кг. $\times 15$. Очаг некроза и вакуольной дистрофии извитых канальцев в юкстамедуллярной зоне. $\times 20$; в – Was79 500 МЕ/кг. $\times 15$. Резкая вакуолизация эндотелия капилляров клубочка, очаговая деструкция капиллярной сети. $\times 20$; г – Was79 500 МЕ/кг. $\times 15$. Юкстамедуллярная зона. Обширный очаг некроза извитых канальцев в стадии организации. Кисты, содержащие аморфные белковые массы. $\times 20$

по отношению к другим побочным эффектам L-аспарагиназа [19] и в значительной степени связаны с тромбозами [28], однако у некоторых пациентов, получавших высокие и низкие дозы ЕгА, было отмечено удлинение интервала QT [22].

Реализация повреждающего действия Was79 на органы и ткани в значительной мере зависела от индивидуальной чувствительности организма животных. Так, при изучении структуры легкого кроликов, получавших препарат в высокой дозе, у 1 самца на 1-е сутки после курса введений было отмечено резкое полнокровие капилляров альвеолярных перегородок (рис. 17а, б). На 15-е сутки после курса у 1 самки были найдены кровоизлияния (рис. 17в), у другой — единичные небольшие очаги фиброза (рис. 17г).

При исследовании поджелудочной железы у 2 самцов и 2 самок на 1-е сутки после курса введений препарата в высокой дозе выявлены кровоизлияния и очаговая деструкция клеток в островках Лангерганса, а также множественные очаги некроза разных размеров в экзокринной части железы.

На эти изменения следует обратить внимание, так как они показывают, что при определенных условиях к органам-мишеням Was79 могут относиться легкие и поджелудочная железа. Панкреатотоксическое действие L-аспарагиназа известно [29], в клинике оно проявляется в виде гипергликемии и панкреатитов [17, 22].

Кровоизлияния, найденные в различных органах кроликов, указывают на возможность развития геморрагических процессов и у людей [30]. При клиническом применении L-аспарагиназа кровоизлияния регистрируют у 1–2 % пациентов [22].

Заключение

Изучение хронической токсичности Was79 на кроликах показало, что этот вид животных действительно более чувствителен к L-аспарагиназу. На кроликах удалось выявить виды токсичности, которые не были установлены в хроническом эксперименте на крысах [31], — ринит, конъюнктивит, диарею, снижение массы тела, изменения показателей периферической крови. Признаки гастроинтестинальной и гематологической токсичности у крыс были найдены только при патоморфологическом исследовании. У кроликов они

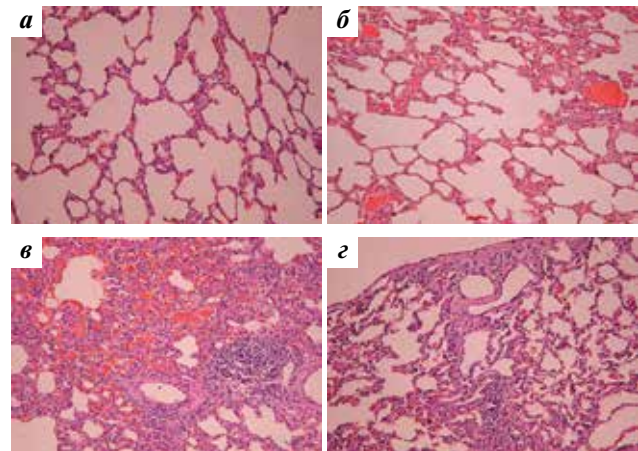


Рис. 17. Структура легкого до и после курса введений L-аспарагиназы Was79: а — интактный контроль. $\times 20$; б — Was79 500 ME/кг. $\times 15$. Резкое полнокровие капилляров альвеолярных перегородок. $\times 20$; в — Was79 500 ME/кг. $\times 15$. Кровоизлияния, лимфогистиоцитарный инфильтрат в сосудистом пучке. $\times 20$; г — Was79 500 ME/кг. $\times 15$. Небольшие очаги фиброза в ткани легкого. $\times 20$

проявились клинически. О гепатотоксическом действии препарата у кроликов свидетельствовало повышение уровня прямого и общего билирубина в сыворотке крови, тогда как у крыс повышалась активность АЛТ и ЩФ. Так же как у крыс, препарат не оказывал влияния на функции почек и сердца, но при патоморфологическом исследовании были обнаружены повреждения тканей этих органов, которые у кроликов полностью не репарировались. Тем не менее и у кроликов удалось проследить зависимость изменений структуры внутренних органов от величины примененной дозы, что позволяет рекомендовать Was79 для дальнейшего изучения.

Результаты изучения хронической токсичности Was79 на кроликах указывают на то, что этот препарат при клиническом применении может проявить такое же побочное действие, как и L-аспарагиназы предыдущих поколений. Органы и системы, являющиеся мишенями L-аспарагиназа, в данном случае остаются теми же. Этот факт заставляет усомниться в прямой зависимости токсического действия L-аспарагиназа от их глутаминазной активности и наводит на мысль о существовании других факторов, влияющих на переносимость лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chan W.K., Lorenzi Ph. L., Anishkin A. et al. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* 2014;123(23):3596–606. DOI: 10.1182/blood-2013-10-535112. PMID: 24659632.

2. Covinia D., Tarditob S., Bussolatib O. et al. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2012;7(1): 4–13. PMID: 21854356.
3. Duval M., Suciuc S., Ferster A. et al. Comparison of *Escherichia coli* asparaginase

with *Erwinia asparaginase* in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* 2002;99(8):2734–9. PMID: 11929760.

4. 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):512–6. PMID: 3147904.
5. Reinert R.B., Oberle L.M., Wék S.A. et al. Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. *J Biol Chem* 2006;281(42):31222–33. DOI: 10.1074/jbc.M604511200. PMID: 16931516.
6. 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(1):273–8. PMID: 7044632.
7. Distasio J.A., Salazar A.M., Nadji M., Durden D.L. Glutaminase-free asparaginase from *Vibrio succinogenes*: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *Int J Cancer* 1982;30(3):343–7.
8. Durden D.L., Distasio J.A. Comparison of the immunosuppressive effects of asparaginases from *Escherichia coli* and *Vibrio succinogenes*. *Cancer Res* 1980;40(4):1125–9. PMID: 6986981.
9. Villa P., Corada M., Bartosek I. L-asparaginase effects on inhibition of protein synthesis and lowering of the glutamine content in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 1986;32(3):235–41. PMID: 3535170.
10. Покровский В.С. Новые подходы к созданию и экспериментальному изучению препаратов на основе противоопухолевых ферментов. Дис.... д-ра. мед. наук. М., 2015.
11. Покровский В.С., Залуниин И.А., Константинова Г.Е. и др. Гибридный белок на основе L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, штамм *Escherichia coli* – продуцент гибридного белка (варианты) и способ получения гибридного белка, обладающего противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2562166 от 09.10.2014.
12. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, ETS No. 123). 1986.
13. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44. PMID: 4957125.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М., 2012. С. 13–24.
15. FDA. Erwinaze. Pharmacology review. Application № 125359. Approval date: 10/27/2011. URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125359Orig1s000PharmR.pdf
16. Avramis V.I., Tiwari P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomed* 2006;1(3):241–54. PMID: 17717965.
17. FDA. Erwinaze. Clinical review. Application № 125359. Approval date: 11/18/2011. URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125359Orig1s000MedR.pdf
18. Medicines evaluation board. Public assessment report. Erwinase, powder for solution for injection 10,000 IU/vial. Procedure number L/H/3194/001/MR. September 2015, p. 1–17(5–6). URL: <http://db.cbg-meb.nl/Pars/h16986.pdf>
19. Product Information. Elspar (asparaginase). Merck & Co, Inc., West Point, PA.
20. Health Products Regulatory Authority. CRN 2126255. Erwinase 10,000 units powder for solution for injection. Date printed 10/07/2014. URL: http://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/LicenseSPC_PA1020-002-001_10072014123107.pdf
21. Lavine R.L., Dicintio D.M. L-Asparaginase-induced diabetes mellitus in rabbits. *Diabetes* 1980;29(7):528–31. PMID: 6991339.
22. Plourde P.V., Jeha S., Hijiya N. et al. Safety profile of asparaginase Erwinia chrysanthemi in a large compassionate-use trial. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(7):1232–8. DOI: 10.1002/pbc.24938. PMID: 24436152.
23. Chisari F.V., Hochstein H.D., Kirschstein R.L., Seligmann E.B. Parathyroid necrosis and hypocalcemic tetany induced in rabbits by L-asparaginase. *Am J Pathol* 1972;68(3):461–8. PMID: 5054253.
24. Pratt C.B., Johnson W.W. Duration and severity of fatty metamorphosis of the liver following L-asparaginase therapy. *Cancer* 1971;28(2):361–4. PMID: 5109448.
25. Raetz E.A., Salzer W.L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32(7):554–63. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181e6f003.
26. Storti E., Quaglini D. Dysmetabolic and neurologic complications in leukemic patients treated with L-asparaginase. *Recent Results Cancer Res* 1970;33:344–9. PMID: 5292723.
27. Haskel C.M., Canellos G.P., Leventhal B.G. et al. L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *N Engl J Med* 1969;281(19):1028–34. DOI: 10.1056/NEJM196911062811902. PMID: 4898857.
28. Fragasso G., Pastore M.R., Vicari A. et al. Myocardial infarction in a patient with acute lymphoblastic leukemia during L-asparaginase therapy. *Am J Hematol* 1995;48(2):136–7. PMID: 7847336.
29. Keung Y.K., Rizk R., Wu X.Y., Cobos E. Drug-induced hypertriglyceridemia with and without pancreatitis. *South Med J* 1999;92(9):912–14. PMID: 10498170.
30. Priest J.R., Ramsay N.K.C., Steinherz P.G. et al. A syndrome of thrombosis and hemorrhage complicating L-asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1982;100(6):984–9. PMID: 6953221.
31. Переверзева Э.Р., Трещалин И.Д., Возняковская Е.В. и др. Токсикологическая характеристика биомодифицированного ферментного препарата – L-аспарагиназы Was79. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(4):53–8.