

Сравнительные методологические исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты

Д.В. Борсакова^{1,2}, М.Е. Плахотник^{1,3}, Л.Д. Колева^{1,2}, Е.А. Бовт^{1,2},
Ю.Г. Александрович^{1,2}, Ф.И. Атауллаханов^{1,2,4}, Е.И. Синауридзе^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН»;
Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 38А, к. 1;

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины;
Россия, 119192 Москва, Ломоносовский просп., 27, к. 1;

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет;
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

Контакты: Дарья Валерьевна Борсакова d.borsakova@gmail.com

Введение. L-аспарагиназа широко используется в терапии острого лимфобластного лейкоза у детей и взрослых, но применение препарата ограничено из-за широкого спектра побочных эффектов и анафилактических реакций. Для решения этих проблем в качестве лекарственной формы может быть использована L-аспарагиназа, загруженная в эритроциты. При этом фермент защищен эритроцитарной мембраной от иммунной системы и протеаз плазмы, но продолжает работать внутри клетки, так как ее мембрана проницаема для аспарагина. Это увеличивает время полувыведения препарата и снижает анафилактические реакции. Включить L-аспарагиназу в эритроциты можно различными осмотическими методами. Каждый из них характеризуется количеством включенного фермента, долей выживших клеток, а также показателями качества загруженных препаратом эритроцитов. Для применения данной лекарственной формы в клинике ключевую роль играет также возможность обеспечить стерильность препарата.

Цель работы – сравнить 3 осмотических метода включения L-аспарагиназы в эритроциты (гипоосмотический лизис, диализ и проточный диализ) с целью выбора наиболее перспективного метода для применения в клинике.

Материалы и методы. Суспензию эритроцитов здоровых доноров (гематокрит 60–70 %) смешивали с L-аспарагиназой из *E. coli* и подвергали в гипоосмотических условиях обратимому лизису, диализу в диализных мешках или проточному диализу с использованием педиатрических диализаторов. После процедуры эритроциты приводили к исходной осмоляльности добавлением гипертонического раствора и инкубировали 30 мин при температуре 37 °С, а затем отмывали в изотоничном фосфатно-солевом буфере с рН 7,4. В суспензиях эритроцитов до и после процедуры включения фермента измеряли объем, гематокрит и активность L-аспарагиназы, а также гематологические показатели и осмотическую резистентность клеток.

Результаты. Выбрана оптимальная осмоляльность гипотонического буфера для включения фермента, которая составила 90–110 мОсм/кг. Выходы инкапсуляции были равны $4,2 \pm 2,0$; $6,0 \pm 2,3$ и $16,2 \pm 2,2$ % для методов гипотонического лизиса, диализа и проточного диализа соответственно. Гематологические индексы полученных эритроцитов-носителей отличались от соответствующих показателей исходных эритроцитов, но не различались существенно для разных методов включения.

Заключение. Сравнение исследованных параметров позволяет сделать вывод, что наиболее перспективным для использования в клинике является включение L-аспарагиназы в эритроциты методом проточного диализа с использованием диализаторов.

Ключевые слова: эритроциты-носители, L-аспарагиназа, обратимый гипоосмотический лизис, гипоосмотический диализ, проточный диализ

Для цитирования: Борсакова Д.В., Плахотник М.Е., Колева Л.Д. и др. Сравнительные методологические исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты. Онкогематология 2018;13(3):91–101.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-3-91-101

Comparative methodological studies of L-asparaginase encapsulation into erythrocytes

D.V. Borsakova^{1,2}, M.E. Plakhotnik^{1,3}, L.D. Koleva^{1,2}, E.A. Bovt^{1,2},
Yu.G. Alexandrovich^{1,2}, F.I. Ataulkhanov^{1,2,4}, E.I. Sinauridze^{1,2}

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences;
38A, bldg. 1 Leninskiy Prospekt, Moscow 119991, Russia;

³Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine; 27, bldg. 1, Lomonosovskiy Prospekt, Moscow 119192, Russia;

⁴Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics; 1, bldg. 2 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. *L*-asparaginase is an enzyme, widely used in the therapy of acute lymphoblastic leukemia in children and adults, but its use is limited due to a wide range of side effects and anaphylactic reactions. *L*-asparaginase loaded into erythrocytes can solve these problems. This enzyme is protected from the immune system and plasma proteases due to erythrocyte membrane, but continues to work inside the cell because its membrane is permeable to *L*-asparagine. Thus, the half-life of the drug increases and anaphylactic reactions reduce. The encapsulation of *L*-asparaginase into erythrocytes can be performed by various osmotic methods. Each of them is characterized by the amount of encapsulated enzyme, the cell yield, as well as by the quality indices of the survived erythrocytes. An important parameter of each method is the possibility to provide sterility of this dosage form for the clinical use.

The aim of the study was the comparing of three osmotic methods of *L*-asparaginase encapsulation into erythrocytes (hypo-osmotic lysis, dialysis and flow dialysis) to select the most promising method for clinical use.

Materials and methods. A suspension of erythrocytes of healthy donors (hematocrit 60–70%) was mixed with *L*-asparaginase from *E. coli*. The procedures of hypotonic reversible lysis, dialysis in dialysis bags, or flow dialysis using pediatric dialyzers were performed. The physiological osmolality was restored in suspensions after the procedure by the addition of a hypertonic solution, and they were incubated for 30 min at 37 °C. Then the cells were washed in isotonic phosphate-buffered saline with pH 7.4. Activity of *L*-asparaginase, volume, hematocrit, hematological indices and osmotic cell fragility of erythrocytes were measured in the suspensions of erythrocytes before and after the enzyme encapsulation procedure.

Results. An optimal osmolality of the hypotonic buffer for each method was selected and was equal to 90–110 mOsm/kg. The yields of encapsulation were 4.2 ± 2.0 , 6.0 ± 2.3 and 16.2 ± 2.2 % for hypotonic lysis, dialysis and flow dialysis, respectively. The hematological indices of the obtained erythrocyte-carriers differed from the corresponding parameters of the initial erythrocytes, but did not differ significantly for different methods.

Conclusion. Comparative investigation of mentioned above parameters allowed choosing the method of flow dialysis as the most promising for clinical use.

Key words: erythrocytes-carriers, *L*-asparaginase, reversible hypo-osmotic lysis, hypo-osmotic dialysis, flow dialysis

For citation: Borsakova D.V., Plakhotnik M.E., Koleva L.D. et al. Comparative methodological studies of *L*-asparaginase encapsulation into erythrocytes. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(3):91–101

Введение

L-аспарагиназа является ферментом, который катализирует превращение *L*-аспарагина в *L*-аспарагиновую кислоту. Благодаря способности разрушать аспарагин, *L*-аспарагиназа из *E. coli* обладает цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам и широко применяется при лечении острого лимфобластного лейкоза и лимфосарком у взрослых и детей [1]. Препарат обладает рядом побочных эффектов, вызванных в основном нарушением синтеза белков из-за снижения концентрации аспарагина. Кроме того, у некоторых пациентов препарат вызывает острые аллергические реакции, вплоть до анафилактического шока [2]. Реакция иммунной системы также сильно укорачивает время пребывания препарата в кровотоке [3]. Эти проблемы частично были решены применением *L*-аспарагиназы, связанной с полиэтиленгликолем (ПЭГ-аспарагиназы) [4], и рекомбинантной аспарагиназы из другого источника (*Erwinia chrysanthemi*) [3]. Несмотря на то что ПЭГ-аспарагиназа обладает более долгим периодом пребывания в кровотоке и сниженной иммуногенностью, у пациентов все же развиваются побочные эффекты и аллергические реакции на полиэтиленгликоль. *L*-аспарагиназа из *Erwinia chrysanthemi* менее иммуногенна, но обладает более коротким периодом полувыведения, чем фермент из *E. coli* [3].

Чтобы уменьшить побочные эффекты, а также увеличить время жизни препарата в кровотоке, некоторые авторы попытались включить *L*-аспарагиназу

в эритроциты человека [5–13]. Такая лекарственная форма фермента обладает рядом преимуществ по сравнению с другими системами доставки: эритроциты биосовместимы и биodeградируемы, их мембрана защищает фермент от протеолитической дегградации и реакций иммунной системы, а продолжительное время жизни эритроцита в организме позволяет препарату дольше циркулировать в крови [14]. При этом аспарагин, проникая внутрь эритроцитов, продолжает разрушаться [11]. Для включения препарата в эритроциты можно использовать как донорские, так и аутологичные эритроциты, которые обладают тем преимуществом, что не вызывают аллоиммунизации или агглютинации. Однако для приготовления лекарств, включенных в эритроциты-носители, у детей существуют ограничения, связанные с допустимым объемом забора крови. Это необходимо учитывать при разработке метода создания таких эритроцитов с лекарством внутри (фармакоцитов).

Для включения лекарств в эритроциты можно использовать различные методы, такие как электропорация, фармакологически вызванный эндоцитоз и различные варианты осмотического метода [14]. Самым распространенным для включения высокомолекулярных препаратов стал осмотический метод. Он достаточно прост, позволяет обработать большое количество эритроцитов и получить высокий процент включения препарата, а также фармакоциты, по характеристикам близкие к нативным эритроцитам. Основой любого осмотического метода является

инкубация эритроцитов в гипотонической среде, которая приводит к их сферуляции, т.е. набуханию, в результате чего форма эритроцита становится сферической. Клетки увеличиваются в объеме и достигают точки, когда в мембране эритроцитов образуются поры, через которые могут проходить высокомолекулярные соединения.

Для включения L-аспарагиназы в эритроциты применяли различные модификации осмотического метода:

– обратимый гипоосмотический лизис, при котором эритроциты прямо разводят водой или гипоосмотическим буфером, содержащим фермент, и после нескольких минут инкубации при 4 °С нормализуют осмоляльность суспензии добавлением гипертонического раствора. Затем фармакоциты запечатывают путем инкубации в этой среде в течение 30 мин при 37 °С [6, 11];

– гипоосмотический диализ, при котором эритроциты помещают в диализные мешки (пропускающие молекулы с молекулярной массой менее 12–15 кДа). Их погружают в гипоосмотический буфер и проводят диализ от 30 до 120 мин при 4 °С. После диализа также восстанавливают тоничность суспензии и запечатывают полученные фармакоциты (см. ранее) [7, 8];

– ступенчатый диализ – одна из разновидностей диализного метода. Его проводят как обычный диализ, но в процессе инкубации несколько раз меняют гипоосмотический раствор, постепенно снижая его осмоляльность, а запечатывают фармакоциты, диализуя их против изотонического буфера [15];

– метод предварительного набухания (сферуляция без лизиса). Эритроциты помещают в гипотонический буфер с высоким содержанием калия, в котором они подвергаются процессу сферуляции, а затем на суспензию наслаивают гемолизат эритроцитов и поверх этого слоя водный раствор L-аспарагиназы. Смесь центрифугируют при 500 g в течение 4 мин. Затем процесс добавления гемолизата, раствора L-аспарагиназы и центрифугирования повторяют несколько раз – до тех пор, пока не достигается точка лизиса (при этом на поверхности осадка визуально наблюдаются белые тени эритроцитов). Запечатывание и отмывание полученных фармакоцитов проводят описанным ранее стандартным методом [9];

– метод проточного диализа. Вместо диализного мешка используют диализатор, применяемый в аппаратах «искусственной почки». Он представляет собой пучок полых волокон из полупроницаемой мембраны, пропускающей молекулы с молекулярной массой менее 12–15 кДа, окруженный кожухом. По внутреннему контуру диализатора (в полости волокон) пропускают суспензию эритроцитов с добавленным препаратом, а по внешнему контуру (пространство снаружи волокон) противотоком – гипоосмотический буфер. После диализа к эритроцитам добавляют гипертонический

раствор. Фармакоциты запечатывают и отмывают стандартным образом [10, 13].

Для приготовления фармакоцитов в клинике необходимо выбрать наиболее оптимальный метод. Однако работ, где сравниваются свойства фармакоцитов, полученных разными методами, совсем мало. Так, в работе [12] проводили сравнение некоторых характеристик фармакоцитов, полученных методом обратимого гипоосмотического лизиса [11], диализа [8] и ступенчатого диализа [15]. Авторы исследовали концентрации аденозинтрифосфата (АТФ), восстановленного глутатиона, глюкозо-6-фосфата, скорость утилизации глюкозы, скорость утечки калия из эритроцита, а также скорость гемолиза и показали, что метод обратимого гипоосмотического лизиса характеризуется самой маленькой эффективностью включения и значительными изменениями биохимических характеристик эритроцитов после процедуры. Максимальная эффективность включения наблюдалась для метода диализа, а метод ступенчатого диализа, разработанный авторами, позволял на 20 % менее эффективно включить L-аспарагиназу в эритроциты, однако свойства полученных фармакоцитов были значительно ближе к свойствам нативных клеток, чем для других методов.

Кроме эффективности включения и биохимических характеристик фармакоцитов, для сравнения различных методов следует принимать во внимание также простоту технического исполнения метода в клинике, возможность соблюдения стерильности и требований к качеству и безопасности трансфузий, а также возможность работать в широком диапазоне объемов эритроцитов (чтобы использовать как донорские клетки, так и небольшие количества аутологичных эритроцитов). С этой точки зрения наиболее простым в реализации кажется метод обратимого гипоосмотического лизиса. Методы диализа также можно применять в клинике с использованием стерильных одноразовых расходных материалов. Об этом свидетельствуют успешные клинические исследования фармакоцитов с L-аспарагиназой, полученных методом проточного диализа [16, 17].

Таким образом, все перечисленные методы потенциально можно адаптировать для клинического применения. Для оптимального проведения процедуры необходимо найти компромисс между эффективностью инкапсуляции L-аспарагиназы и степенью повреждения эритроцитов, вызванного воздействием гипоосмотической среды [14].

Цель работы – выбрать наиболее перспективный для использования в клинике метод включения L-аспарагиназы в эритроциты, для чего провести подбор оптимальных условий включения фермента в клетки при использовании методов обратимого гипоосмотического лизиса, гипоосмотического диализа или проточного диализа и сравнить эффективность включения, а также гематологические показатели

и осмотическую резистентность фармакоцитов, полученных этими методами при оптимальных условиях включения.

Материалы и методы

Материалы

В работе были использованы лиофилизаты препарата L-аспарагиназы из *E. coli* Аспарагиназа Medac (Medac, Германия) и Веро-аспарагиназа (Верофарм, Россия) по 5000 и 10000 МЕ. Были использованы также глюкоза, АТФ, пируват, инозин, $MgCl_2$, одно- и двузамещенные фосфаты натрия, аспартат- β -гидроксамат, 8-гидроксихинолин, Na_2CO_3 и трихлоруксусная кислота фирмы Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США); одно- и двузамещенные фосфаты калия, NaCl, аденин фирмы AppliChem GmbH (Дармштадт, Германия); Трис (Tris) фирмы Reanal (Будапешт, Венгрия); забуференный фосфатом физиологический раствор (фосатно-солевой буфер, pH 7,4; PBS) фирмы Биолот (Санкт-Петербург, Россия) и бычий сывороточный альбумин (BSA) фирмы BioClot GmbH (Айденбах, Германия).

Выделение эритроцитов и подготовка растворов

Для получения фармакоцитов методами обратимого гипоосмотического лизиса и гипоосмотического диализа кровь здоровых доноров после пункции локтевой вены забирали в стандартные вакуумные пробирки фирмы Vacuette, содержащие 3,2 % (0,109 М) трехзамещенный цитрат натрия. Соотношение цитрат:кровь составляло 1:9. Эритроциты осаждали путем центрифугирования при 1000 g в течение 8 мин. Плазму и лейкоцитомбослой удаляли, а осевшие эритроциты отмывали 3 раза в четырехкратном объеме раствора PBS с последующим центрифугированием в течение 8 мин при 1000 g. Для получения эритроцитов-носителей методом проточного диализа использовали стандартную эритроцитную взвесь здоровых доноров, приготовленную в отделении трансфузиологии и хранившуюся не более 5 дней в растворе SAGM, содержащем хлорид натрия, аденин, глюкозу и маннитол (0,877; 0,017; 0,818 и 0,525 г на 100 мл раствора соответственно). Отмывали эритроциты однократно в четырехкратном объеме раствора PBS с тем же режимом центрифугирования. Все эритроцитные взвеси перед процедурой охлаждали до 4 °С в течение 1 ч. Заранее охлаждали также гипоосмотический раствор, содержащий 2 мМ $MgCl_2$; 34 мМ KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; 1,5 мМ АТФ; 5 мМ глюкозы и NaCl от 0 до 35 мМ в зависимости от целевой осмоляльности раствора (pH 7,4). Раствор L-аспарагиназы готовили путем разведения лиофилизата буфером (0,015 М Tris-HCl + 0,015 % BSA, pH 7,3) до конечной активности 2000 МЕ/мл.

Методы включения L-аспарагиназы в эритроциты

Все использованные в работе осмотические методы включения фермента в эритроциты существенно различались только в 1-й части процедуры (по воздействию гипоосмотической среды на эритроциты),

но почти совпадали в части запечатывания и отмывания полученных фармакоцитов, поэтому сначала будут отдельно рассмотрены процедуры гипоосмотической обработки клеток для каждого метода.

Процедура обратимого гипоосмотического лизиса.

К 1,7 мл гипотонического раствора добавляли 20 мкл предварительно разведенного в буфере препарата L-аспарагиназы с активностью 2000 МЕ/мл (см. ранее). К 100 мкл суспензии эритроцитов с гематокритом 78 ± 3 % добавляли 400 мкл смеси гипотонического раствора и L-аспарагиназы и инкубировали 3 мин при 4 °С. После этого фармакоциты запечатывали (см. далее).

Процедура гипоосмотического диализа. В диализный мешок (Dialysis tubing cellulose membrane D9777, Sigma-Aldrich) помещали 1 мл эритроцитной взвеси с гематокритом 70 % и 20 мкл раствора L-аспарагиназы. Диализ суспензии эритроцитов проводили против гипоосмотического буфера (5 мМ KH_2PO_4 ; 2 мМ $MgCl_2$; 5 мМ глюкозы; 1,5 мМ АТФ, pH 7,4) в течение 2 ч при 4 °С. Соотношение объема суспензии и объема гипоосмотического раствора составляло 1:100. Равномерное перемешивание раствора в течение процедуры диализа обеспечивали с помощью магнитной мешалки.

Процедура проточного диализа. К 45 мл суспензии эритроцитов с гематокритом 60 % добавляли 360 мкл раствора L-аспарагиназы (с активностью 2000 МЕ/мл). Диализ проводили в системе, состоящей из педиатрического диализатора FX Paed фирмы Fresenius (Бад-Хомбург, Германия), стерильных мешков и магистралей, которые перед процедурой промывали физиологическим раствором в течение 10 мин (рис. 1). Гипоосмотический раствор по магистрали внешнего контура прокачивали с помощью перистальтического насоса со скоростью 20 мл/мин, а эритроцитную взвесь по магистрали внутреннего контура прокачивали противотоком с помощью другого перистальтического насоса со скоростью 3 мл/мин. Во время диализа мешок с эритроцитной взвесью перемешивали на шейкере (с частотой 150 мин⁻¹). После того как эритроцитная взвесь полностью проходила внутренний контур, по нему пропускали физиологический раствор в объеме 20 мл.

Запечатывание и отмывка эритроцитов. Запечатывающий гиперосмотический раствор, содержащий 55 мМ NaCl; 30 мМ NaH_2PO_4 ; 458 мМ KCl; 20 мМ АТФ; 3 мМ $MgCl_2$; 1,5 мМ аденина; 8,4 мМ глюкозы; 1,5 мМ пирувата и 30 мМ инозина (pH 7,4; 2000 мОсм/кг) добавляли в следующих пропорциях:

- после процедуры гипоосмотического лизиса – по 90 мкл в каждую пробу;
- после процедуры гипоосмотического диализа – в объеме 1/3 объема суспензии эритроцитов после диализа;
- после процедуры проточного диализа объем раствора рассчитывали по формуле

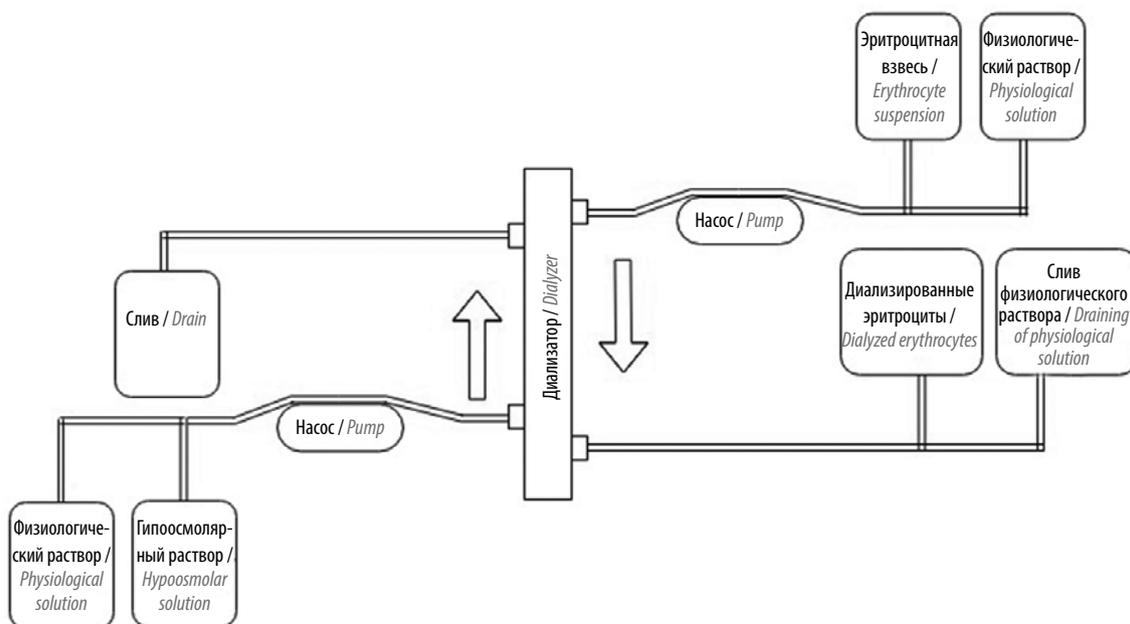


Рис. 1. Схема установки для проточного диализа. Справа от диализатора – внутренний контур (контур крови), слева – внешний контур. Стрелками указаны направления потоков
Fig. 1. Scheme of the apparatus for flow dialysis. To the right of the dialyzer is the inner circuit (blood contour), to the left – the outer circuit. The arrows indicate the flow directions

$V_{\text{раствора}} = V_{\text{сусп}} \times (\text{Осм}_{\text{целев}} - \text{Осм}_{\text{исх}}) / (\text{Осм}_{\text{раствора}} - \text{Осм}_{\text{целев}})$, где $V_{\text{сусп}}$ – объем суспензии эритроцитов после диализа; $\text{Осм}_{\text{исх}}$ – исходная осмоляльность диализированной суспензии, которую принимали равной осмоляльности гипотонического раствора; $\text{Осм}_{\text{целев}}$ – конечная осмоляльность суспензии, которой необходимо достичь, равная 350 мОсм/кг, и $\text{Осм}_{\text{раствора}}$ – осмоляльность гипертонического раствора, равная 2000 мОсм/кг.

Далее все пробы инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации клетки отмывали путем пятикратного центрифугирования в четырехкратном объеме буфера PBS в течение 8 мин при 1000 g. После процедуры проводили измерение объема и гематокрита полученных суспензий фармакоцитов.

Измерение активности L-аспарагиназы

Пробы для измерения активности L-аспарагиназы в суспензиях клеток до и после процедур лизиса/диализа/проточного диализа готовили, добавляя 10 мкл суспензии эритроцитов к 990 или 90 мкл дистиллированной воды (mQ) соответственно. Измерение проводили по методике, описанной в [18]. К лизатам суспензий эритроцитов объемом 10 мкл добавляли по 90 мкл 10 мМ раствора аспарат-β-гидроксамата (АНА) в буфере, содержащем Tris-HCl 15 мМ и 0,015 % BSA (pH 7,3), инкубировали 30 мин при 37 °С и добавляли по 125 мкл трихлоруксусной кислоты (24,5 % по массе). Затем пробы центрифугировали 10 мин при 2500 g, отбирали по 20 мкл надосадка и добавляли к нему по 200 мкл хромофора (1 часть 2 % раствора 8-гидроксихинолина в этаноле и 3 части 1М

карбоната натрия). Смеси нагревали для полного развития окраски при 99 °С в течение 5 мин и измеряли оптическую плотность на 710 нм на микропланшетном ридере VersaMax (Molecular Devices, Калифорния, США). Активность фермента в пробах вычисляли относительно калибровочных стандартных растворов L-аспарагиназы в диапазоне от 15 до 1000 МЕ/л, растворенных в буфере, содержащем Tris-HCl 15 мМ и 0,015 % BSA (pH 7,3), которые были измерены параллельно с образцами.

Измерение эритроцитарных индексов

Все пробы для определения гематологических показателей эритроцитов готовили разведением 20 мкл исходной суспензии эритроцитов или полученных фармакоцитов в 40 мкл PBS. Измерения среднего объема эритроцитов (MCV, фл), среднего содержания гемоглобина в клетке (MCH, пг) и средней концентрации гемоглобина в клетке (MCHC, г/дл) проводили на гематологическом анализаторе Micros 60 фирмы Horiba ABX (Франция).

Измерение осмотической резистентности эритроцитов

Для измерения осмотической резистентности пробы исходной суспензии или полученных фармакоцитов разводили в PBS до гематокрита 5 %. Измерения проводили по методике, описанной в [19]. В кюветы 96-луночного планшета вносили по 300 мкл гипоосмотических растворов с pH 7,4 и различной осмоляльностью от 0 (вода) до 297 мОсм/кг. В каждую кювету добавляли по 6 мкл пробы и инкубировали взвеси 30 мин при комнатной температуре. Затем в кюветы вносили 40 мкл гипертонического раствора, содержащего 96,2 мМ Na₂HPO₄; 15,6 мМ NaH₂PO₄; 1,54 М NaCl

(рН 7,4). Измерение оптической плотности проб проводили на длине волны 620 нм на планшетном ридере Anthos Zenyth 340rt (Biochrom, Кембридж, Англия). Процент нелизированных клеток определяли как отношение (%) оптической плотности, измеренной в конкретной пробе, к оптической плотности той же пробы при нулевом лизисе (в растворе с физиологической осмоляльностью). Величину осмотической резистентности характеризовали значением осмоляльности раствора, при котором 50 % исходных клеток было лизировано (H_{50}), а также значением ширины распределения кривой осмотической резистентности (W), т.е. разности осмоляльностей растворов, при которых наблюдалось 10 и 90 % лизиса.

Осмоляльность всех растворов измеряли на осмометре ОСКР-1М (КИВИ Осмометрия, Санкт-Петербург, Россия).

Расчет процента инкапсуляции L-аспарагиназы и выхода клеток

Для оценки эффективности процедуры включения фермента были рассчитаны выходы инкапсуляции,

представляющие собой процент фермента, оказавшегося включенным в фармакоциты после процедуры, и выход клеток, характеризующий процент клеток, сохранившихся после процедуры включения. Эти показатели были рассчитаны по следующим формулам:

$$\text{Выход клеток (\%)} = V_{\text{конеч}} \times \text{Ht}_{\text{конеч}} \times 100 / (V_{\text{исх}} \times \text{Ht}_{\text{исх}});$$

$$\text{Инкапсуляция L-аспарагиназы (\%)} = A_{\text{конеч}} \times V_{\text{конеч}} \times 100 / (A_{\text{исх}} \times V_{\text{исх}}),$$

где $A_{\text{исх}}$ и $A_{\text{конеч}}$ – активности фермента в исходной суспензии эритроцитов до процедуры и конечной суспензии фармакоцитов с включенной L-аспарагиназой соответственно; $V_{\text{исх}}$ и $V_{\text{конеч}}$ – объемы; $\text{Ht}_{\text{исх}}$ и $\text{Ht}_{\text{конеч}}$ – гематокриты этих суспензий соответственно.

Результаты

Зависимость эффективности инкапсуляции и выхода эритроцитов от осмоляльности гипоосмотического буфера
На рис. 2 представлены усредненные результаты

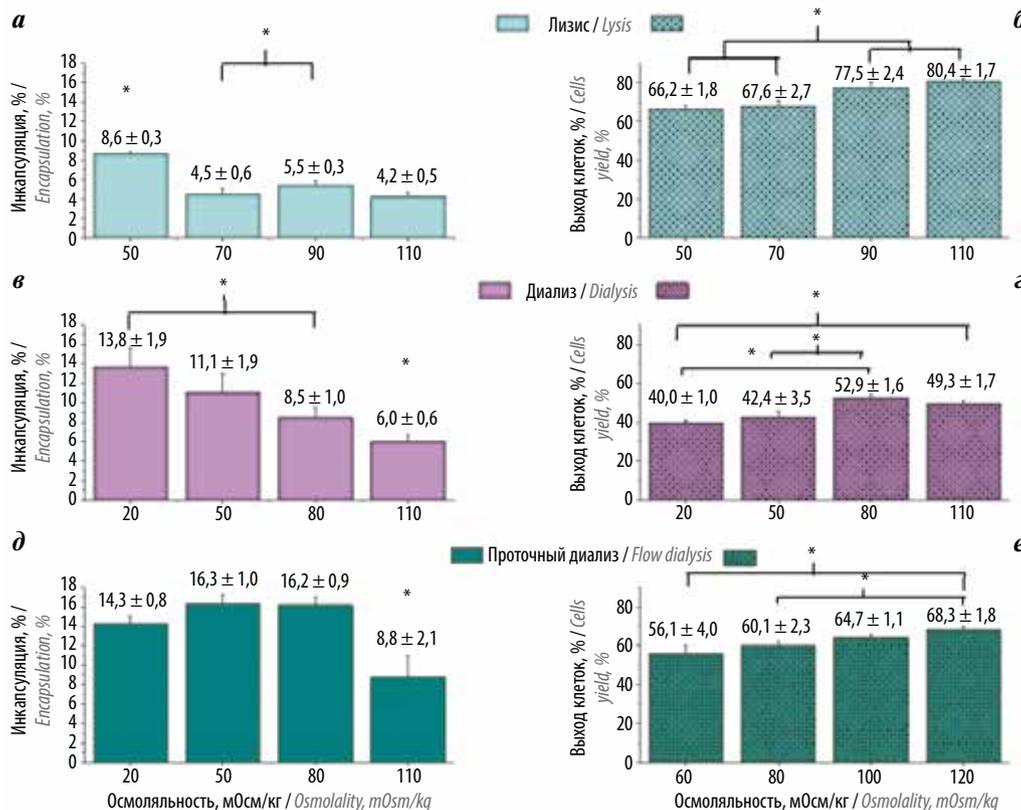


Рис. 2. Зависимости эффективности включения L-аспарагиназы в эритроциты (а, в, д) и выхода клеток (б, г, е) от осмоляльности гипоосмотического буфера: а, б – эритроциты получены методом обратимого гипоосмотического лизиса при осмоляльностях 50 (n = 12), 70 (n = 17), 90 (n = 17) и 110 мОсм/кг (n = 17); в, г – эритроциты получены методом гипоосмотического диализа при осмоляльностях 20 (n = 6), 50 (n = 6), 80 (n = 12) и 110 мОсм/кг (n = 12); д, е – эритроциты получены методом проточного диализа при осмоляльностях буфера 60, 80, 100, 120 мОсм/кг (для каждой осмоляльности n = 6). Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего. *Отличие отмеченной группы от всех других достоверно либо различия между указанными группами достоверны (ANOVA, p < 0,05)

Fig. 2. Dependence of L-asparaginase incorporation efficiency (a, в, д) and cell yield (б, г, е) on osmolality of the hypoosmotic buffer: а, б – erythrocytes were obtained by reversible hypo-osmotic lysis with osmolality of 50 (n = 12), 70 (n = 17), 90 (n = 17) and 110 mOsm/kg (n = 17); в, г – erythrocytes were obtained by hypoosmotic dialysis with osmolality of 20 (n = 6), 50 (n = 6), 80 (n = 12) and 110 mOsm/kg (n = 12); д, е – erythrocytes were obtained by flow dialysis with osmolality of buffer 60, 80, 100, 120 mOsm/kg (for each osmolality n = 6). The mean values ± the standard error are presented. *The difference of the noted group from all others is statistically significant, or the differences between these groups are statistically significant (ANOVA, p < 0.05)

измерения процента инкапсуляции и выхода клеток при различных осмоляльностях гипосмотического буфера, полученные для разных методов включения L-аспарагиназы в эритроциты. При проведении процедуры гипосмотического лизиса инкапсуляция резко снижалась при осмоляльности буфера выше 50 мОсм/кг (см. рис. 2а). Выход клеток для этой процедуры, наоборот, возрастал с увеличением осмоляльности лизирующего буфера от 70 до 90 мОсм/кг (см. рис. 2б). При гипосмотическом диализе инкапсуляция L-аспарагиназы также снижалась с ростом осмоляльности диализирующего буфера (см. рис. 2в), а выход клеток, наоборот, увеличивался (см. рис. 2г). В результате процедуры проточного диализа инкапсуляция L-аспарагиназы оставалась постоянной в диапазоне осмоляльностей 60–100 мОсм/кг, но выше этого диапазона достоверно снижалась (см. рис. 2д). Выход клеток в этом методе при увеличении осмоляльности диализующего раствора постепенно увеличивался (см. рис. 2е).

Для метода проточного диализа осмоляльность 100 мОсм/кг является пороговой, после которой инкапсуляция L-аспарагиназы снижается. При этом выход клеток выше этой осмоляльности практически не увеличивается. Для методов лизиса и диализа максимальное включение было достигнуто при самой низкой осмоляльности диализующего раствора (50 и 20 мОсм/кг соответственно), но выход клеток при этом был минимален (66,2 и 40,0 % для метода лизиса и диализа соответственно). С учетом того, что во всех исследованных методах выход клеток достоверно увеличивается начиная с осмоляльности 80–90 мОсм/кг, по-видимому, для всех этих методов (включая метод проточного диализа) оптимумом можно считать осмоляльность гипосмотического буфера 80–110 мОсм/кг.

Изменение гематологических показателей эритроцитов после процедуры включения фермента разными методами в зависимости от осмоляльности гипосмотического буфера

Эритроцитарные индексы исходных эритроцитов и полученных фармакоцитов были измерены для всех исследованных методов включения фермента при различных осмоляльностях гипосмотического раствора. Полученные результаты представлены на рис. 3.

Средний объем фармакоцитов был меньше соответствующего объема нативных клеток (на 15–30 %), но практически не изменялся при различных осмоляльностях гипосмотического буфера для всех исследованных методов включения (см. рис. 3а, б, в).

Среднее количество гемоглобина в эритроцитах в ходе проведения процедуры обратимого лизиса при осмоляльностях 50–90 мОсм/кг снижалось значительно (примерно на 60–70 %), в то время как при осмоляльности 110 мОсм/кг количество остаточного гемоглобина в эритроците возросло до 50 % от первоначального значения (см. рис. 3г).

После процедуры диализа количество гемоглобина в эритроцитах снижалось не так значительно (примерно на 40 % при самой низкой использованной осмоляльности – 20 мОсм/кг) и постепенно увеличивалось с ростом осмоляльности буфера. При осмоляльности 110 мОсм/кг это количество уже составляло 75 % от первоначального значения (см. рис. 3д). После процедуры проточного диализа количество гемоглобина в эритроцитах падало примерно на 50 % от исходного при любой осмоляльности гипосмотического буфера в области 60–120 мОсм/кг (см. рис. 3е).

Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах после гипосмотического воздействия также падала. При лизисе в диапазоне осмоляльностей 50–110 мОсм/кг концентрация гемоглобина падала на 50–60 % (см. рис. 3ж), после диализа эта концентрация падала не больше чем на 30 % при самой низкой исследованной осмоляльности (см. рис. 3з), а после проточного диализа падение концентрации гемоглобина в клетках составляло примерно 30–40 % (см. рис. 3и). Таким образом, по гематологическим показателям также можно заключить, что оптимум осмоляльности гипосмотического буфера для всех методов лежит в области 90–100 мОсм/кг. При этих осмоляльностях начинается достоверное увеличение среднего содержания гемоглобина в клетке и приближение среднего объема эритроцита к нормальному значению.

Изменение осмотической резистентности эритроцитов после процедуры обратимого гипосмотического лизиса, диализа или проточного диализа

Осмотическая резистентность эритроцитов изменяется после воздействия на них осмотической нагрузки. Кривые осмотической резистентности фармакоцитов, полученных всеми исследованными методами при одинаковой осмоляльности буфера (100–110 мОсм/кг), имеют общую тенденцию сдвига в сторону большей резистентности, чем исходные эритроциты (50 % фармакоцитов в этих суспензиях было лизировано при более низкой осмоляльности буфера) (рис. 4). Наиболее выражен сдвиг кривой в сторону увеличения резистентности у эритроцитов после проточного диализа. Чуть более резистентными, чем нативные эритроциты, оказались фармакоциты, полученные методом обратимого гипотонического лизиса, а ближе всех к нативным эритроцитам оставались фармакоциты, полученные методом диализа. Меняется также форма кривой осмотической резистентности. После гипосмотического воздействия она становится более полой. Это значит, что эритроциты становятся более разнородными по способности противостоять гипосмотической среде.

В таблице суммированы параметры, характеризующие эффективность включения и характеристики фармакоцитов, полученные для 3 исследованных методов включения L-аспарагиназы в эритроциты при проведении процедур в оптимальных условиях (при осмоляльности гипосмотического буфера

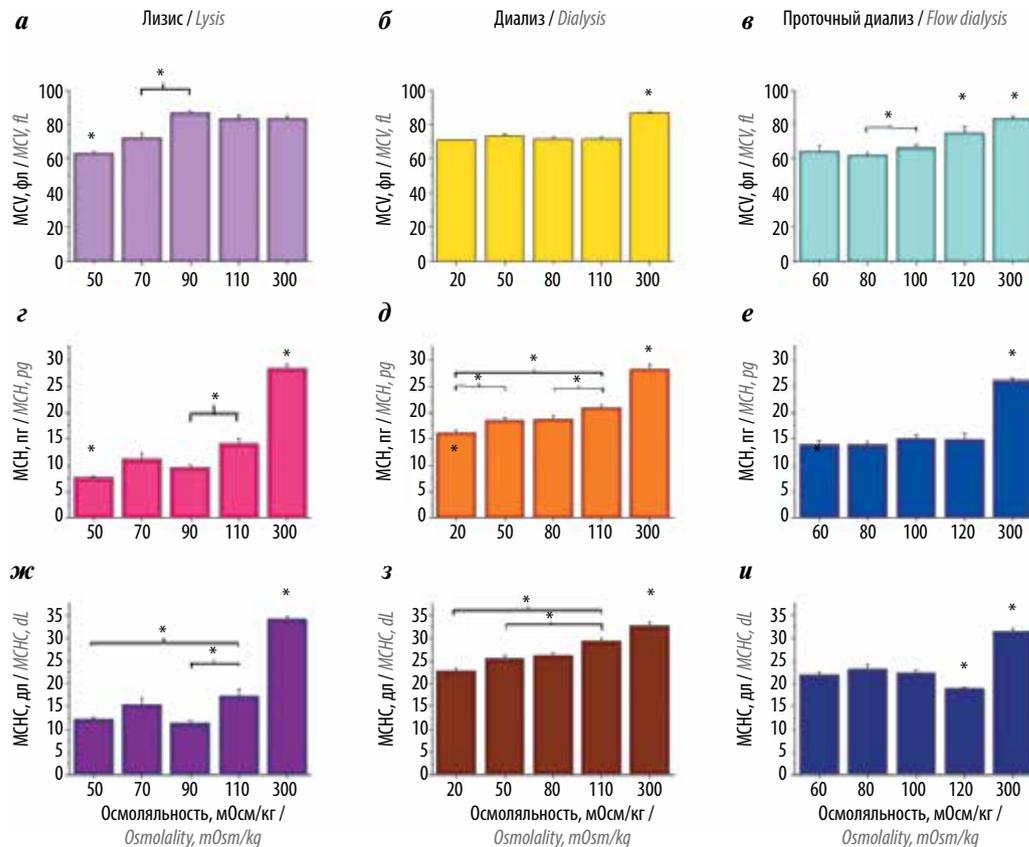


Рис. 3. Изменения среднего объема эритроцита (MCV) (а, б, в), среднего содержания гемоглобина (MCH) (з, д, е) и средней концентрации гемоглобина в клетке (MCHC) (ж, з, и) по сравнению с аналогичными показателями исходных эритроцитов (при осмоляльности буфера 300 мОсм/кг) в зависимости от осмоляльности гипоосмотического буфера, использованного при включении L-аспарагиназы в эритроциты методом обратимого гипоосмотического лизиса, гипоосмотического диализа и проточного диализа; а, з, ж – эритроциты после процедуры обратимого гипоосмотического лизиса при осмоляльности 50 (n = 12), 70 (n = 19), 90 (n = 12), 110 мОсм/кг (n = 25) и исходные эритроциты (300 мОсм/кг, n = 19); б, д, з – эритроциты после процедуры гипоосмотического диализа при осмоляльности 20 (n = 8), 50 (n = 9), 80 (n = 12), 110 мОсм/кг (n = 14) и исходные эритроциты (300 мОсм/кг, n = 18); в, е, и – эритроциты после процедуры проточного диализа при осмоляльности 60 (n = 7), 80 (n = 10), 100 (n = 5), 120 мОсм/кг (n = 6) и исходные эритроциты (300 мОсм/кг, n = 22). Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего. *Отличие группы от всех других достоверно либо различия между указанными группами достоверны (ANOVA, p < 0,05)

Fig. 3. Changes in the mean erythrocyte volume (MCV) (a, б, в), mean hemoglobin content (MCH) (з, д, е) and mean hemoglobin concentration (MCHC) (ж, з, и) compared to those of the original erythrocytes (with buffer osmolality of 300 mOsm/kg) depending hypo-osmotic buffer osmolality used when L-asparaginase was encapsulated into erythrocytes by reversible hypo-osmotic lysis, hypo-osmotic dialysis and flow dialysis; а, з, ж – erythrocytes after reversible hypo-osmotic lysis with osmolality of 50 (n = 12), 70 (n = 19), 90 (n = 12), 110 mOsm/kg (n = 25) and initial erythrocytes (300 mOsm/kg, n = 19); б, д, з – erythrocytes after hypoosmotic dialysis with osmolality of 20 (n = 8), 50 (n = 9), 80 (n = 12), 110 mOsm/kg (n = 14) and initial erythrocytes (300 mOsm/kg, n = 18); в, е, и – erythrocytes after flow dialysis with osmolality 60 (n = 7), 80 (n = 10), 100 (n = 5), 120 mOsm/kg (n = 6) and initial erythrocytes (300 mOsm/kg, n = 22). The mean values ± the standard error are presented. *The difference of the group from all others is statistically significant, or the differences between these groups are statistically significant (ANOVA, p < 0.05)

100–110 мОсм/кг). Выход инкапсуляции оказался самым высоким для метода проточного диализа. Для этого метода также лучше всего сохранилась ширина распределения клеток по осмотической резистентности, хотя сама кривая была сдвинута в сторону увеличения этой резистентности сильнее, чем для других методов инкапсуляции (см. таблицу).

Выходы клеток в разных методах достоверно различались, снижаясь в ряду обратимый гипоосмотический лизис > проточный диализ > гипоосмотический диализ. Эритроцитарные индексы фармакоцитов всегда отличались от нормальных показателей исходных эритроцитов, однако разные показатели в ходе различных процедур включения варьировали по-разному. Так, средний объем эритроцита был ближе всего

к нормальному значению после процедуры лизиса, а количество и концентрация остаточного гемоглобина – после процедуры диализа (см. таблицу).

Обсуждение

При сравнении 3 методов по показателю инкапсуляции L-аспарагиназы можно сделать вывод о том, что только метод проточного диализа дает эффективное включение фермента в эритроциты (в 3 раза выше, чем метод диализа, и в 4 раза выше, чем метод лизиса) (см. таблицу). Выход клеток выше всего после процедуры лизиса, что связано, по-видимому, с отсутствием технологических потерь клеток, не связанных непосредственно с лизисом, тогда как в методах диализа и проточного диализа выход клеток связан с частич-

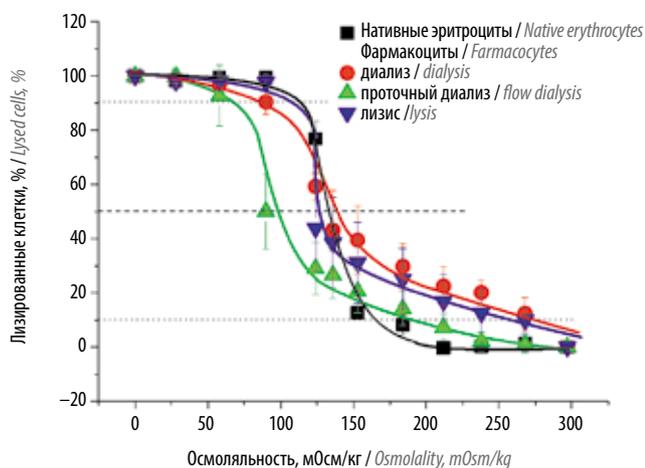


Рис. 4. Кривые осмотической резистентности исходных эритроцитов и фармакоцитов, полученных методом обратимого гипоосмотического лизиса, диализа и проточного диализа при осмоляльности буфера 100–110 мОсм/кг. Представлены средние значения ± стандартное отклонение

Fig. 4. Osmotic resistance curves of initial erythrocytes and pharmacocytes obtained by reversible hypo-osmotic lysis, dialysis and flow dialysis with buffer osmolality 100–110 mOsm/kg. The mean values ± the standard deviation are presented

Сравнение выхода клеток, процента инкапсуляции фермента и показателей качества фармакоцитов после процедур обратимого гипоосмотического лизиса, гипоосмотического диализа и проточного диализа

Comparison of cell yield, percentage of enzyme encapsulation and pharmacocytes quality indicators after reversible hypoosmotic lysis, hypoosmotic dialysis and flow dialysis

Параметр Parameter	Нативные эритроциты Native erythrocytes	Лизис Lysis	Диализ Dialysis	Проточный диализ Flow dialysis
Инкапсуляция L-аспарагиназы, % Encapsulation of L-asparaginase, %	—	4,2 ± 2,0 (n = 17)	6,0 ± 2,3 (n = 12)	16,2 ± 2,2* (n = 6)
Выход клеток, % Cell yield, %	—	80,4 ± 6,9* (n = 17)	49,3 ± 5,8* (n = 12)	64,7 ± 2,6* (n = 6)
MCV, фл MCV, fL	83,3 ± 5,8 (n = 61)	83,4 ± 9,4* (n = 25)	71,5 ± 3,9* (n = 14)	66,0 ± 5,1* (n = 6)
МСН, пг MCH, pg	27,8 ± 3,2 (n = 61)	14,0 ± 5,0 (n = 25)	21,0 ± 2,2* (n = 14)	15,1 ± 1,6 (n = 6)
МСНС, г/дл MCHC, g/dL	33,4 ± 3,7 (n = 61)	17,8 ± 7,0 (n = 25)	29,2 ± 2,2* (n = 14)	22,23 ± 1,9 (n = 6)
Осмотическая резистентность (H ₅₀), мОсм/кг Osmotic resistance (H ₅₀), mOsm/kg	133,3 ± 10,6 (n = 16)	125,3 ± 21,7 (n = 5)	140,8 ± 16,9* (n = 8)	93,7 ± 13,1 (n = 14)
Осмотическая резистентность (W), мОсм/кг Osmotic resistance (W), mOsm/kg	52,4 ± 14,7 (n = 16)	148,8 ± 29,1 (n = 5)	185,5 ± 15,0* (n = 8)	138,1 ± 18,9 (n = 14)

Примечание. Представлены средние значения ± стандартное отклонение; n — количество экспериментов; MCV — средний объем эритроцита; МСН — среднее содержание гемоглобина в клетке; МСНС — средняя концентрация гемоглобина в клетке; H₅₀ — осмоляльность, при которой 50 % клеток лизировано; W — ширина распределения клеток по осмотической резистентности, равная разности осмоляльностей, при которых лизировано 10 и 90 % клеток.

*Отличие отмеченной группы (метода) от 2 других достоверно (ANOVA, p < 0,05).

Note. The mean ± standard deviation is presented; n — the number of experiments; MCV — mean erythrocyte volume; MCH — mean hemoglobin content in the cell; MCHC — mean hemoglobin concentration in the cell; H₅₀ — osmolality in which 50% of the cells are lysed; W — width of cells distribution according to osmotic resistance equal to the difference of osmolality at which 10 and 90% of cells are lysed.

*The difference of the marked group (method) from the two other is statistically significant (ANOVA, p < 0.05).

ной потерей эритроцитов в диализном мешке или внутри диализатора. При этом в проточном диализе потери клеток оказались меньше, чем в методе обычного диализа, так как задержавшиеся в диализаторе клетки были вымыты из него физиологическим раствором.

По качеству эритроцитов, получаемых после процедуры, ближе всего к норме оказались эритроциты, полученные методом гипоосмотического диализа, за ними идут фармакоциты, полученные проточным диализом и лизисом. Тот факт, что средний объем эритроцита ближе всего к нативному у эритроцитов после лизиса и что в этих клетках осталось чуть меньше половины исходного гемоглобина, а включение L-аспарагиназы составляет всего 4 % от исходного количества, заставляет задуматься. Возможно, эритроциты после лизиса склонны к сферуляции из-за слишком жесткого воздействия лизирующего буфера и неспособности восстановить свою прежнюю форму после запечатывания. Об этом говорит и тенденция к увеличению среднего объема эритроцита относительно нативных клеток после процедуры лизиса при осмоляльности 90 мОсм/кг (см. рис. 3а).

Сравнивая осмотическую резистентность эритроцитов, стоит отметить, что после метода диализа получают эритроциты, которые ближе всего по показателю H_{50} к нативным клеткам, но в то же время имеют самое широкое распределение по резистентности (W). После процедуры проточного диализа показатель H_{50} сдвигается в сторону большей резистентности, однако при этом сохраняется некоторая однородность популяции (ширина распределения W минимальна среди всех исследованных методов). Это связано, возможно, с тем, что эритроцит, потеряв какое-то количество гемоглобина, обладает более низким внутренним онкотическим давлением, и ему легче противостоять снижению осмоляльности внешней среды.

Заключение

Проанализировав результаты, можно сказать, что наиболее подходящим методом для получения эритроцитов – носителей L-аспарагиназы в клинике является метод проточного диализа. Эффективность этого метода включения гораздо выше, чем у остальных методов, что может быть важным для включения терапевтических доз лекарства в клинической практике. По качеству получаемых фармакоцитов (их гематологическим индексам) он немного уступает обычному диализу, однако если учесть, что после переливания пациенту гематокрит этих клеток

составляет всего 10 % и их основная функция состоит не в переносе кислорода (с этой задачей легко справляются другие эритроциты в кровотоке), то становится ясно, что незначительное снижение MCV, MCH и MCHC не ухудшает существенно функцию фармакоцитов как биореакторов с L-аспарагиназой внутри. Снижение концентраций гликолитических ферментов после процедуры не должно сильно превышать снижение концентрации гемоглобина (которое составляет примерно 33 %). Согласно математической модели такое снижение не должно сильно ухудшать эффективность гликолиза и укорачивать срок выживания клеток в кровотоке [20]. Это подтверждает также работа [13], авторы которой измеряли концентрации основных метаболитов гликолиза (АТФ и 2,3-дифосфоглицерата) в фармакоцитах, полученных процедурой проточного диализа, и показали, что эти концентрации существенно не меняются. Кроме того, реализовать стерильное получение эритроцитов-носителей методом проточного диализа намного легче, чем другими методами. Метод обратного гипоосмотического лизиса прост, но является самым жестким и дает низкое включение фермента в эритроциты. Метод диализа является по большей части лабораторной методикой, требующей сложных манипуляций, что может стать затруднением при переходе к постоянному производству таких эритроцитов медицинским персоналом в клинике.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Verma N., Kumar K., Kaur G. et al. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Crit Rev Biotechnol* 2007;27(1):45–62. DOI: 10.1080/07388550601173926. PMID: 17364689.
2. van den Berg H. Asparaginase revisited. *Leuk Lymphoma* 2011;52(2):168–78. DOI: 10.3109/10428194.2010.537796. PMID: 21281233.
3. Müller H.J., Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998;28(2):97–113. DOI: 10.1016/S1040-8428(98)00015-8. PMID: 9768345.
4. Graham M.L. Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv Drug Del Rev* 2003;55(10):1293–302. DOI: 10.1016/S0169-409X(03)00110-8. PMID: 14499708.
5. Alpar H.O., Lewis D.A. Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 1985;34(2):257–61. DOI: 10.1016/0006-2952(85)90133-9. PMID: 3966927.
6. Kwon Y.M., Chung H.S., Moon C. et al. L-Asparaginase encapsulated intact erythrocytes for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Control Release* 2009;139(3):182–9. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.06.027. PMID: 19577600.
7. Updike S.J., Wakamiya R.T. Infusion of red blood cell-loaded asparaginase in monkey. *J Lab Clin Med* 1983;101(5):679–91. PMID: 6187874.
8. Naqi A., DeLoach J.R., Andrews K. et al. Determination of parameters for enzyme therapy using L-asparaginase entrapped in canine erythrocytes. *Biotechnol Appl Biochem* 1988;10(4):365–72. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1988.tb00026.x. PMID: 3219195.
9. De Loach J., Ihler G. A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids. *Biochim Biophys Acta* 1977;496(1):136–45. DOI: 10.1016/0304-4165(77)90121-0. PMID: 836891.
10. Kravtsoff R., Ropars C., Laguerre M. et al. Erythrocytes as carriers for L-asparaginase. Methodological and mouse in vivo studies. *J Pharm Pharmacol* 1990;42(7):473–6. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1990.tb06598.x. PMID: 1980286.
11. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М. и др. Проницаемость эритроцитов человека для аспа-рагина. *Биохимия* 1985;50(10):1733–7. [Ataullakhanov F.I., Vitvitskiy V.M., Zhabotinskiy A.M. et al. Permeability of human erythrocytes for asparagine. *Biokhimiya = Biochemistry* 1985;50(10):1733–7 (In Russ.)].
12. Sinauridze E.I., Vitvitskiy V.M., Pichugin A.V. et al. A new chemotherapeutic agent: L-asparaginase entrapped in red blood cells. In: Magnani M., DeLoach J.R. (eds). *The Use of Resealed Erythrocytes as Carriers and Bioreactors*. *Adv Exp Med Biol* 1992;326:203–6. DOI: 10.1007/978-1-4615-3030-5_25.
13. Kravtsoff R., Desbois I., Lamagnere J.P., et al. Improved pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells. *Eur J Clin Pharm* 1996;49(6):465–70. PMID: 8706771.
14. Millán C.G., Marinero M.L., Castañeda A.Z. et al. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J Control Release* 2004;95(1):27–49. DOI: 10.1016/j.jconrel.2003.11.018. PMID: 15013230.
15. Синауридзе Е.И. Способ получения эритроцитов, заполненных лекарственным веществом: авторское свиде-

- тельство СССР № 1469609, 1 декабря 1988 г. [Sinauridze E.I. Method for erythrocytes producing filled with a drug substance. USSR Author's Certificate N 1469609. December 1, 1988 (In Russ.)].
16. Domenech C., Thomas X., Chabaud S. et al. L-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. *Br J Haematol* 2011;153(1):58–65. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08588.x. PMID: 21332712.
17. Hunault-Berger M., Leguay T., Huguet F. et al. A phase 2 study of L-asparaginase encapsulated in erythrocytes in elderly patients with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia: The GRASPALL/GRAALL-SA2-2008 study. *Am J Hematol* 2015;90(9):811–8. DOI: 10.1002/ajh.24093. PMID: 26094614.
18. Lanvers C., Vieira Pinheiro J.P., Hempel G. et al. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Anal Biochem* 2002;309(1):117–26. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00232-4. PMID: 12381370.
19. Shcherbachenko I.M., Lisovskaya I.L., Tikhonov V.P. Oxidation-induced calcium-dependent dehydration of normal human red blood cells. *Free Radical Res* 2007;41(5):536–45. DOI: 10.1080/10715760601161452. PMID: 17454136.
20. Martinov M.V., Plotnikov A.G., Vitvitsky V.M. et al. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta* 2000;1474(1):75–87. DOI: 10.1016/S0304-4165(99)00218-4. PMID: 10699493.

Вклад авторов

Д.В. Борсакова: написание статьи, сбор и анализ данных, выполнение исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты различными методами;

М.Е. Плахотник, Ю.Г. Александрович: выполнение исследований включения L-аспарагиназы в эритроциты методом диализа и гипоосмотического лизиса;

Л.Д. Колева, Е.А. Бовт: выполнение исследований включения L-аспарагиназы в эритроциты методом проточного диализа;

Ф.И. Атауллаханов, Е.И. Синауридзе: концепция, участие в написании статьи, окончательное одобрение рукописи.

Authors' contributions

D.V. Borsakova: article writing, data collection and analysis; study of L-asparaginase encapsulation into erythrocytes by various methods;

M.E. Plakhotnik, Yu.G. Aleksandrovich: study of L-asparaginase encapsulation into erythrocytes by dialysis and hypoosmotic lysis;

L.D. Koleva, E.A. Bovt: study of L-asparaginase encapsulation into erythrocytes by flow dialysis;

F.I. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze: concept, article writing, final approval of the article.

ORCID авторов/ORCID of authors

Д.В. Борсакова / D.V. Borsakova: <https://orcid.org/0000-0003-4669-977X>

М.Е. Плахотник / M.E. Plakhotnik: <https://orcid.org/0000-0001-6281-3152>

Л.Д. Колева / L.D. Koleva: <https://orcid.org/0000-0001-8803-5694>

Е.А. Бовт / E.A. Bovt: <https://orcid.org/0000-0003-4724-8647>

Ю.Г. Александрович / Yu.G. Aleksandrovich: <https://orcid.org/0000-0001-8119-9194>

Ф.И. Атауллаханов / F.I. Ataulakhanov: <https://orcid.org/0000-0003-3403-181X>

Е.И. Синауридзе / E.I. Sinauridze: <https://orcid.org/0000-0002-5948-3444>

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ-офи 15-29-01 228 и грантом Президиума Российской академии наук по Программе фундаментальных исследований «Основы технологии физиологических адаптаций».

Financing. The study was supported by Russian Foundation for Basic Research, grant No офи 15-29-01 228 and by Presidium of the Russian Academy of Sciences in the Basic Research Program «Fundamentals of Technology of Physiological Adaptations».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.