

L-ASPARAGINASY A JEJICH POTENCIÁL V MEDICÍNĚ A POTRAVINÁŘSTVÍ

LUCIE PEJŠKOVÁ, KAROLÍNA LOUŽECKÁ, TOMÁŠ PODZIMEK a EVA BENEŠOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
eva.benesova@vscht.cz

Došlo 17.4.23, přijato 26.6.23.

L-Asparaginasa (EC 3.5.1.1) je klíčovým enzymem, který hydrolyzuje L-asparagin na L-asparagovou kyselinu a amoniak. Těto vlastnosti L-asparaginasy je využíváno v protinádorové terapii k inhibici syntézy proteinů v rakoviných buňkách. L-Asparaginasa je díky tomu základem pro chemoterapii využívanou k léčbě pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií v pediatrii. Komerční L-asparaginasy jsou pro aplikace ve zdravotnictví získávány především z *Escherichia coli* a *Erwinia chrysanthemi* (přejmenována na *Dickeya dadantii*). Nicméně, vysoká míra nežádoucích účinků komplikuje dlouhodobé klinické použití L-asparaginasy, a proto se současný výzkum zaměřuje na hledání enzymů nových či na modifikaci vlastností enzymů již známých. Zároveň se L-asparaginasa v posledních letech stala nepostradatelnou pro potravinářský průmysl, ve kterém je uznávána jako jeden z možných prostředků pro odstraňování L-asparaginu z potravin, u kterých hrozí vznik akrylamidu během tepelného zpracování. Tento článek poskytuje přehled informací o současném využití L-asparaginas a jejich úskalích.

Klíčová slova: L-asparaginasa, akutní lymfoblastická leukémie, akrylamid, biosenzor, biologická protinádorová léčba

Obsah

1. Úvod
2. Využití L-asparaginas v medicíně
 - 2.1. Léčba onkologických onemocnění
 - 2.2. Vedlejší účinky
 - 2.3. Další aplikace v medicíně
3. Využití L-asparaginas v potravinářství
4. Metody stanovení aktivity L-asparaginas
5. Závěr

1. Úvod

L-Asparaginasy (EC 3.5.1.1) (L-ASNasy) jsou enzymy řadící se mezi amidohydrolasy. Jejich hlavní funkcí je hydrolyza L-asparaginu za vzniku L-asparagové kyseliny a amoniaku (schéma 1). Přítomnost L-ASNasy byla potvrzena u mnoha mikroorganismů, rostlin i živočichů. Na základě aminokyselinové sekvence, biochemických vlastností a struktury jsou L-ASNasy děleny do tří rodin: bakteriální (typ I a typ II), rostlinné (typ III) a rhizobiální¹, nicméně toto dělení již neodpovídá všem současným poznatkům a lze předpokládat, že v budoucnu vznikne nomenklatura nová².

Právě díky schopnosti štěpit L-asparagin nacházejí L-ASNasy široké uplatnění jak při léčbě onkologických onemocnění, tak i v potravinářském průmyslu jako činidlo zabráňující vzniku akrylamidu. V poslední době je stále

větší pozornost věnována i jejich využití v biosenzorech³ a testována je i možnost jejich aplikace při léčbě infekčních onemocnění⁴.

2. Využití L-asparaginas v medicíně

Dosud největší uplatnění našla L-ASNasa v medicíně, a to při léčbě dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a dalších hematologických malignit⁵. V posledních letech se však objevují informace naznačující potenciál těchto enzymů i v dalších oblastech medicíny, a to konkrétně při léčbě některých autoimunitních⁶ a infekčních onemocnění^{7,8}.

2.1. Léčba onkologických onemocnění

L-ASNasa se používá v kombinaci s jinými léky především k léčbě různých lymfoproliferativních poruch,

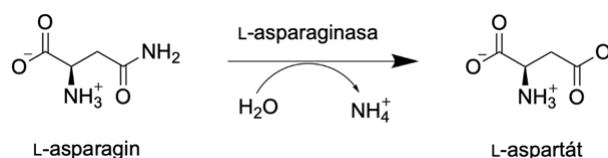


Schéma 1. L-Asparaginasa katalyzuje chemickou přeměnu L-asparaginu na L-asparagovou kyselinu a amoniak

především ALL. ALL je jednou z malignit, během kterých dochází k nadměrné produkci nezralých leukocytů, což má za následek potlačení vývoje ostatních krevních buněk a také šíření a ukládání těchto nádorových buněk do dalších orgánů, jako jsou játra, slezina a lymfatické uzliny⁵. Kromě terapie ALL je L-ASNasa využívána k léčbě Non-Hodgkinova lymfomu⁹, Hodgkinovy choroby¹⁰, chronické lymfocytární leukémie⁹, lymfosarkomu¹⁰, akutní myeloidní leukémie¹⁰ a akutní myelomonocytické leukémie⁹. Její účinnost byla zaznamenána i při léčbě solidních tumorů, jako je karcinom pankreatu¹¹, prostaty¹¹, sarkom retikula¹⁰, plicní adenokarcinom⁹, melanosarkom⁹, rakovina vaječníků¹¹ a některých nádorů mozku^{9,11}. Pro úplnost je možné doplnit, že tento enzym našel uplatnění i ve veterinární praxi, například při léčbě skotu s bovinní virovou leukosou¹². Během těchto terapií L-ASNasou je využito skutečnosti, že L-asparagin patří k proteinogenním aminokyselinám, nezbytným pro biosyntézu proteinů a další buněčné procesy. Přestože se jedná o neesenciální aminokyselinu a v lidském organismu je tato aminokyselina přímo syntetizována, mnoho typů leukemických nezralých buněk je citlivých na nízkou hladinu L-asparaginu ve vnějším prostředí^{13,14}. Důvodem je skutečnost, že neoplastické buňky, na rozdíl od zdravých buněk, mají nízkou produkci enzymu L-asparaginsynthetasy a postrádají tak schopnost syntetizovat L-asparagin v dostatečném množství na pokrytí potřeb rychlého růstu a nekontrolované proliferace a nedokáží dostatečně rychle reagovat na L-asparaginovou deprivaci^{15,16}. Je uváděno, že v krvi je nejběžněji udržována hladina L-asparaginu v rozmezí 40–80 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.¹⁷), může se však pohybovat od jednotek ke stovkám $\mu\text{mol l}^{-1}$ u zdravých jedinců. U pacientů s ALL neléčených L-ASNasou naopak hladina L-asparaginu stoupá k jednotkám až stovkám mmol l^{-1} (cit.^{18,19}). Účinkem vhodných L-ASNas může dojít ke snížení koncentrace L-asparaginu v krvi až na méně než 0,1–3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.^{17,20}), což vede k nutriční deprivaci, zastavení proteosyntézy a proliferace a následně k apoptóze leukemických buněk²¹.

Syntéza L-asparaginu *de novo* ve zdravých buňkách začíná pomocí enzymové transaminace (schéma 2). Prekurzorem biosyntézy L-asparaginu je oxalacetát, který v přítomnosti transaminasy reaguje s L-glutamátem za vzniku L-aspartátu a 2-oxoglutarátu. L-Aspartát poté reaguje s L-glutaminem za vzniku L-asparaginu v ATP-dependenční reakci, která je katalyzována L-asparaginsynthetasou²². Z výše uvedených informací vyplývá, že dostatečná aktivita L-asparaginsynthetasy také souvisí

s dostatečným zdrojem ATP (cit.^{14,23}). V této souvislosti je nutné vyzdvihnout selektivní působení L-ASNasy na nádorové buňky oproti neselektivnímu působení jiných terapeutik²⁰.

Z hlediska využití v lékařství jsou v současné době nejdůležitější bakteriální L-ASNasy typu II, které se typicky vyznačují vysokou afinitou k L-asparaginu a relativně nízkou afinitou k L-glutaminu². Ačkoli jsou tyto enzymy v léčbě nádorových onemocnění využívány již přes 40 let, dostupné jsou na farmaceutickém trhu preparáty obsahující L-ASNasy pouze ze dvou bakteriálních zdrojů, konkrétně se jedná o preparáty obsahující nativní L-ASNasu z *Escherichia coli* (nativní a pegylovaná forma) a z *Erwinia chrysanthemi* (dále zmiňovaná v tomto článku jako *Dickeya dadantii*, přejmenována v roce 2005 laboratoří Laboratory of Genetic Evolution at the University of Wisconsin²⁴). Vzhledem k bakteriálnímu původu těchto enzymů je jejich využití spojeno s řadou nežádoucích účinků, jak bude popsáno v následující kapitole.

Jednou z rozhodujících charakteristik pro možnost efektivního využití L-ASNas v léčbě ALL je afinita k substrátu. Zjednodušeně lze tedy říct, že je nutné, aby se hodnota jejich Michaelisovy konstanty (K_M) reakce využívající L-asparagin jako substrát pohybovala v řádech $\mu\text{mol l}^{-1}$ (viz koncentrace L-asparaginu v krvi). To splňují oba výše zmiňované enzymy, konkrétně byla hodnota K_M pro L-ASNasu z *E. coli* stanovena na 15 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.²⁵), u enzymu z *D. dadantii* pak na 58 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.²⁶).

Pro objev antineoplastických účinků L-ASNasy byl důležitý rok 1922 (cit.²⁷), ve kterém byla zjištěna přítomnost L-ASNasy v morčecím séru. Tato L-ASNasa byla poprvé úspěšně testována v roce 1966 u dětí trpících ALL (cit.²⁸). Prvním lékem na léčbu ALL schváleným americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) byl v roce 1978 Elspar[®], který obsahoval nativní L-ASNasu, izolovanou z *E. coli*^{29,30}. Dnes je však již nedostupný, neboť byl stažen z trhu v souvislosti s problémy s výrobou a novými přísnějšími podmínkami schvalování léčiv³¹. V roce 1985 bylo schváleno léčivo s nativní L-ASNasou z *D. dadantii* (Erwinase[®])³² a v roce 1994 bylo schváleno léčivo Oncaspar[®] obsahující L-ASNasu konjugovanou s polyethylenglykolem (PEG) (tzv. pegylovaná L-ASNasa). Tím bylo dosaženo nižší imunogenity tohoto enzymu a zároveň delšího biologického poločasu^{33–36}. Přehled dalších preparátů, se kterými je dnes možné se setkat na světovém trhu, je uveden v tabulce I.

V současné době je léčba ALL velmi komplexním procesem, který zahrnuje, v rámci chemoterapie, 6 a více

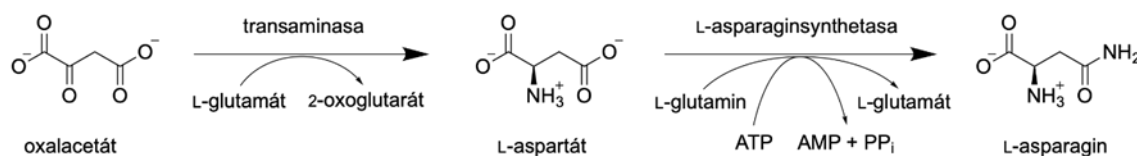


Schéma 2. Schéma mechanismu *de novo* syntézy L-asparaginu

Tabulka I
Přehled komerčních léčiv obsahujících L-asparinasu

Původ enzymu	Obchodní název preparátu (forma)	Schválení rok, instituce, region	Poznámka
<i>Escherichia coli</i>	Elspar [®] (cit. ³⁰) (nativní)	1978, FDA, USA	V roce 2012 ukončena výroba
	Kidrolase [®] (cit. ⁷⁷) (nativní)	1974, Francie	Generická forma přípravku Elspar [®]
	Oncaspar [®] (cit. ³⁵) (peglyvaná)	1994, FDA, USA 2016, EMA, Evropa ^a	Od 2006 doporučena FDA k užívání v první linii
	Leunase [®] (cit. ⁷⁸) (nativní)	1971, PMDA (od roku 2004), Japonsko	Generická forma přípravku Elspar [®] , od roku 2013 produkována v upraveném kmeni <i>E. coli</i> ⁷⁹
	Spectrila [®] (cit. ⁸⁰) (nativní, rekombinantní)	2015, EMA, Evropa ^a	
<i>Dickeya dadantii</i>	Asparlas [®] (cit. ⁸¹) (peglyvaná)	2018, FDA, USA	
	Erwinase [®] (cit. ^{82,83}) (nativní)	1985, MHRA, UK 2011, FDA, USA	Pro pacienty vykazující hypersenzitivitu na L-ASNasu z <i>E. coli</i>
	Rylaze [®] (cit. ⁸⁴) (nativní, rekombinantní)	2021, FDA, USA	Produkována v <i>Pseudomonas fluorescens</i>

^a Pro zjednodušení je v tabulce použit jako region pro Evropskou agenturu pro léčivé přípravky (EMA) Evropa, ovšem EMA má ve skutečnosti platnost pro státy Evropské unie a jmenovitě Island, Lichtenštejnsko a Norsko

léčivých přípravků³⁷. Terapie zahrnuje aplikaci L-ASNasy z *E. coli* či *D. dadantii*³⁸ v kombinaci s jinými léky, jako je vinkristin nebo dexamethason (v závislosti na fázi léčby)³⁹, a v kombinaci s radioterapií⁴⁰.

2.2. Vedlejší účinky

Léčba pomocí L-ASNasy může vést k mnoha závažným vedlejším účinkům. Závažnost vedlejších účinků se může u jednotlivých pacientů výrazně lišit a závisí mimo jiné i na tom, jestli je simultánně podstupována léčba i jinými léky či radioterapií. Mezi nejběžnější vedlejší účinky je zahrnována alergická reakce, nevolnost, horečka a toxicita pro centrální nervový systém^{38,41}.

Řada těchto nežádoucích účinků je připisována skutečnosti, že jsou tyto enzymy schopné kromě L-asparaginu využívat jako substrát i L-glutamin^{1,42}. L-Glutamin je majoritním transportním zdrojem amoniaku pro mnoho biosyntetických reakcí, a tak dlouhodobý pokles hladiny L-glutaminu v plasmě narušuje biochemické funkce, zejména jater²⁵. Tyto vedlejší účinky často znemožňují dokončení celého léčebného procesu vedoucího k remisi⁴³. Vystává však otázka, zda by terapeutický index (poměr dávky léčiva vyvolávající toxicitu ku dávce léčiva vyvolávající léčebný efekt) L-ASNasy mohl být zvýšen snížením či úplným odstraněním L-glutaminasové aktivity použitého enzymu, nebo zda by se tím úměrně také snížil protirako-

vinný účinek. V odborné literatuře je totiž možné vysledovat i teorie, které naopak hovoří o podporujícím terapeutickém účinku L-glutaminasové aktivity, neboť při působení L-asparaginsynthetasy je L-glutamin nezbytným donorem aminoskupiny pro syntézu L-asparaginu²². Chan W. K. a spol.⁴³ formulovali ve své publikaci teorii, podle které některé rakovinné buňky jsou citlivé na absenci L-asparaginu kvůli nepřítomnosti L-asparaginsynthetasy, tudíž L-glutaminasová aktivita nepodporuje antineoplastický účinek a je vhodné použít L-ASNasu s co nejnižší L-glutaminasovou aktivitou. Pokud se však jedná o typ nádoru, u kterého buňky aktivní L-asparaginsynthetasy mají, ale jsou citlivé na nepřítomnost L-asparaginu, L-glutaminasová aktivita antineoplastický účinek L-ASNasy podpoří⁴³.

Pro úplnost je nutné dodat, že enzymy využívané v současné praxi vykazují kromě L-asparaginasové aktivity též aktivitu L-glutaminasovou (hodnota K_M L-ASNasy z *E. coli* pro reakci využívající L-glutamin jako substrát je $3,7 \text{ mmol l}^{-1}$, L-ASNasy z *D. dadantii* $10,3 \text{ mmol l}^{-1}$ (cit.⁴⁴)). Koncentrace L-glutaminu v krvi je přibližně $0,5\text{--}0,8 \text{ mmol l}^{-1}$ (cit.⁴⁵). Nicméně, pro jasný závěr o přítomnosti L-glutaminasové aktivity v léčivech je bezpochyby nezbytný další výzkum.

Dalším hojně diskutovaným problémem použití výše zmiňovaných L-ASNas v medicíně je jejich cizorodý původ. Všechna léčiva na trhu obsahují L-ASNasu pocházející z bakteriálních zdrojů, a proto mohou v lidském orga-

nismu vyvolat nežádoucí reakci imunitního systému, vedoucí k nemožnosti užívat L-ASNasu dlouhodobě či v některých případech dokonce dokončit zahájenou léčbu. Jednou z již dříve zmíněných možností snížení imunogenity nativní L-ASNasy je zastínění její struktury pro imunitní systém připojením molekul PEG, které snižují schopnost rozpoznání enzymu makrofágy a navíc vedou ke zpomalení degradace podaného enzymu^{44,46}. Reakce protilátek s antigenními strukturami proteinu nemusí vyvolat jen přehnanou reakci imunitního systému, nýbrž pouze protein tiše deaktivovat, čímž se stává léčba pomocí L-ASNasy neúčinnou a vzniká tak rezistence vůči dané L-ASNase (cit.⁴⁷). Navíc jsou komerčně schváleny pouze dva zdroje L-ASNas (viz výše), což představuje značně omezený výběr, který by měl být do budoucna rozšířen o nové L-ASNasy z jiných zdrojů, případně jejich řízeně mutované formy s vyhovujícími vlastnostmi.

2.3. Další aplikace v medicíně

Kromě dlouhodobě využívané protinádorové aktivity byly nedávno u L-ASNas popsány možnosti využití i v dalších medicínských aplikacích¹⁰. Publikovány byly například studie upozorňující na potenciál L-ASNasy v léčbě infekčních a autoimunitních onemocnění⁴⁸.

V souvislosti s možným využitím při terapii infekčních onemocnění byla studována bakterie *Streptococcus pyogenes* patřící do skupiny označované jako „Group A *Streptococcus*“ (GAS). Tato bakterie způsobuje onemocnění s různě závažným průběhem⁷. GAS po přilnutí k hostitelské buňce produkuje toxiny (streptolysiny) způsobující stres endoplasmatického retikula, což se mimo jiné projevuje zvýšenou expresí genu pro L-asparagin-synthetasu, čímž dojde ke zvýšení produkce aminokyseliny L-asparaginu, která indukce proliferaci a růst GAS. Bez této aminokyseliny se neexprimuje zhruba 17 % genů GAS (cit.⁴⁹). Zde se nabízí využití léčivého přípravku obsahujícího L-ASNasu, u které byla prokázána schopnost potlačit růst patogenu GAS v myším modelu lidské bakteriémie (bakterie přítomné v krevním řečišti) a také v lidské krvi⁴⁹. I další patogenní bakterie, například *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* nebo *Staphylococcus aureus*, obsahují toxiny podobné streptolysinům. Není tedy vyloučeno, že by přípravky s L-ASNasou mohly být účinné i při terapii dalších infekčních onemocnění⁴.

Rada studií již potvrdila i schopnost bakteriálních L-ASNas ovlivňovat imunitní odpověď lidského organismu. Konkrétně se jedná o imunosupresivní a protizánětlivý účinek⁵⁰. Proběhly již i první testy naznačující možnost využití pegylované L-ASNasy z *E. coli* při léčbě autoimunitních onemocnění. V tomto případě se jednalo o revmatoidní artritidu, jejíž léčba byla testována na myším modelu s artritidou indukovanou kolagenem⁶. Ukázalo se, že podání této L-ASNasy potlačilo buněčnou imunitní odpověď B-lymfocytů zprostředkovanou pomocnými T-lymfocyty. U humorální imunitní odpovědi bylo zaznamenáno nižší množství protilátek tvořených B-lymfocyty¹⁰. Toto je v souladu se zjištěním, že na virulenci bakte-

rie *Salmonella typhimurium* se podílí její L-ASNasa, jejíž mechanismus nebyl doposud zcela objasněn. Extracelulární doména receptoru T-lymfocytu obsahuje variabilní část odpovídající antigenní struktuře, která je nejčastěji složena z heterodimeru alfa a beta řetězce. Bylo zjištěno, že L-ASNasa ze *S. typhimurium* brání modulaci beta řetězce, čímž se snižuje odpověď T-lymfocytů⁵¹.

V jedné studii byly popsány dokonce i antivirové účinky L-ASNasy, konkrétně u viru Coxsackie B3, kde L-ASNasa izolovaná z řasy *Spirulina maxima* nevysvětleným mechanismem bránila adsorpci viru na povrch buňky a jeho penetraci dovnitř⁸.

3. Využití L-asparinas v potravinářství

Své využití našly L-ASNasy i v potravinářském průmyslu, a to konkrétně při snižování množství akrylamidu v tepelně zpracovaných potravinách. Již více než půl století se ví o neurotoxických účincích akrylamidu⁵² a desítky let je také označován jako potenciální karcinogen^{53,54}. Avšak do havárie ve Švédsku (r. 1997), během níž bylo do životního prostředí během výstavby železničního tunelu nešťastně vypuštěno velké množství akrylamidu, nebyl akrylamid spojován s potravinami. Kontaminace vody, úhyn velkého množství zvířat, mediální zájem a panika mezi veřejností vedly nejprve ke stažení potravin z dané lokality a následně k vzbuzení zájmu o monitoring akrylamidu v potravinách. Tím však bylo zjištěno, že některé potraviny i mimo danou oblast obsahují vyšší hladiny akrylamidu. Postupně se díky vědeckému zkoumání objasnily mechanismy, kterým akrylamid v potravinách vzniká, a od roku 2002 je snaha ve spolupráci s organizacemi, jako je WHO (World Health Organization), EFSA (European Food Safety Authority) či FAO (Food and Agriculture Organization), omezit množství akrylamidu v potravinách pomocí legislativy, v níž se ke každé komoditě vztahují různá doporučení k postupu zpracování surovin a specifické limity k obsahu akrylamidu⁵⁵.

Podstatou využití L-ASNasy v potravinářství je tedy snížení koncentrace L-asparaginu, který se v potravinách přirozeně vyskytuje a může (za určitých podmínek) sloužit jako prekurzor pro vznik akrylamidu – neurotoxinu a potenciálního karcinogenu^{21,56,57}. Nebezpečí vzniku akrylamidu hrozí u potravin bohatých na sacharidy zpracovávaných při vysokých teplotách (obvykle se udává teplota vyšší než 120 °C) a nízké vlhkosti, jako jsou hranolky, bramborové lupínky, pečárenské výrobky, snídanové cereálie či pražená káva^{5,58}. V procesu nazývaném Maillardova reakce dochází k reakci L-asparaginu s redukcujícími sacharidy a výsledkem sledu několika reakcí je vznik akrylamidu. Zároveň však Maillardova reakce slouží ke vzniku řady dalších sloučenin, které jsou naopak žádáné vzhledem k jejich senzoryckým vlastnostem⁵⁸.

V současné době jsou provozovatelé potravinářských podniků v Evropě povinni se řídit nařízením Komise EU 2017/2158, které stanovuje opatření pro snížení přítomnosti akrylamidu v potravinách⁵⁸. Existuje celá řada pří-

stupů, díky kterým je možné snižovat množství akrylamidu ve finálních výrobcích. Patří mezi ně výběr vhodných surovin, přidávání řady různých aditiv či změna výrobních podmínek, například teploty či pH. Nicméně použití těchto metod má často za následek změnu kvality konečného výrobku, která je patrná na jeho chuti či vzhledu. Výhodu využití L-ASNas vidí řada odborníků právě ve skutečnosti, že při využití této enzymové metody nedochází k negativnímu ovlivnění požadovaných vlastností výrobku. Zároveň byla prokázána možnost redukce množství akrylamidu pomocí L-ASNas v některých případech až o 90 % (cit.⁵⁹).

Jako příklady praktického využití L-ASNas v potravinářství bychom rádi zmínili na trhu dostupné přípravky řady PreventAse[®] a Acrylaway[®], které obsahují L-ASNasy původem z *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*²¹.

Produkty pod označením PreventAse[®] vyrábí firma DSM z Nizozemí. Optimální pH pro aktivitu těchto přípravků se pohybuje v kyselejší oblasti (pH 4–5), teplotní optimum preparátu je přibližně 50 °C. Schopnost přípravku štěpit L-asparagin a tím snížit množství vzniklého akrylamidu byla popsána v několika studiích s různými potravinářskými výrobky^{60–62}. Ošetření pšenično-ovesného bochníku chleba pomocí tohoto přípravku po dobu 15 min při 32 °C před pečením vedlo ke snížení vzniklého množství akrylamidu o 46 % (cit.⁶⁰). Rotmann a spol.⁶¹ se rozhodli studovat použití L-ASNasy pro snížení množství L-asparaginu při přípravě smažených hranolků podle průmyslových standardů. Nejlepší vlastnosti pro daný postup vykazoval přípravek PreventAse L[®]. Přípravek byl aplikován po blanširovacím kroku v různých koncentracích a ponechán působit po dobu 1 min při 60 °C. Ve výsledku došlo ke snížení akrylamidu až o 59 % (cit.⁶¹). Potenciál přípravku z Nizozemí byl nově studován také při přípravě těsta na pizzu⁶². V práci byly použity různé formulace přípravku PreventAse[®] pod označeními M, W a XR-BG, které byly přidány do těsta. V tomto případě L-ASNasa působila po celou dobu hnětení těsta (řádově v hodinách). Při aplikaci formulace XR-BG (vyvinuta pro použití v prostředí o vyšších hodnotách pH) došlo vlivem štěpení L-asparaginu ke snížení vzniku akrylamidu asi o 89 % a po přidání přípravků M a W byl snížen obsah akrylamidu dokonce pod detekovatelnou mez⁶².

Přípravky řady Acrylaway[®] vyrábí firma Novozymes A/S z Dánska. Enzymy obsažené v těchto přípravcích vykazují nejvyšší aktivitu při pH 6–7 a teplotě kolem 60 °C. Účinky těchto přípravků byly také popsány v několika studiích^{63–65}. Podobně jako u produktu PreventAse[®], i zde byl přípravek testován při přípravě smažených hranolků po blanširovacím kroku⁶³. V této studii bylo dosaženo 60% snížení množství vznikajícího akrylamidu po působení enzymového přípravku při 40 °C po dobu 20 min. Jako příklad studie zabývající se účinkem přípravku Acrylaway[®] na množství L-asparaginu v kávových bobech může sloužit práce autorů Porto a spol. (cit.⁶⁴). Ošetřením kávových bobů bylo dosaženo snížení obsahu L-asparaginu asi o 30 %. Díky experimentům v jiné studii zaměřené také na snížení obsahu L-asparaginu v kávových bobech bylo dosaženo poklesu obsahu akrylamidu po pražení kávy až

o 77 % (cit.⁶⁵). Z obou těchto studií vyplývá, že je možné snížit obsah L-asparaginu i v takto pevných maticích, jako jsou kávové boby, ale je nutné předřadit krok, kterým se zvýší dostupnost L-asparaginu pro L-ASNasu (byla zvolena předúprava bobů horkou párou).

Kromě aplikace volného izolovaného enzymu byl navržen i přístup založený na použití celých buněk. Firma Kerry přišla ve spolupráci s Renaissance BioScience Corp. v roce 2019 na trh s výrobkem Acryleast[®], který obsahuje pekařské kvasinky⁶⁶. V roce 2022 firma uvedla na trh produkt pod názvem Acryleast Pro[®] vykazující více než dvojnásobnou L-asparaginasovou aktivitu oproti původnímu produktu⁶⁷. Tyto kvasinky byly šlechtěny pomocí adaptivní evoluce za účelem získání varianty s L-ASNasou, která by fungovala i za podmínek přípravy potravin (např. kynutí těsta). Běžně totiž kvasinky L-asparagin přítomný v surovinách neštěpí, neboť využívají dostupnější zdroje dusíku⁶⁸. Využití aktivity tohoto přípravku obsahujícího celé buňky je samozřejmě možné pouze pro přípravu potravinářských výrobků, u kterých se využívá činnosti pekařských kvasinek. Zároveň však jde o velmi elegantní způsob, který nevyžaduje změny ve výrobním procesu a zároveň neovlivňuje chuť ani další vlastnosti konečného výrobku.

Z výše zmíněných informací lze vyvodit, že kromě dříve vyjmenovaných faktorů (pH, teplota atd.), které ovlivňují výsledné snížení obsahu akrylamidu v konečném výrobku, je nutné přihlídnout i k technologickému postupu, který je pro přípravu konkrétního výrobku využíván.

4. Metody stanovení aktivity L-asparaginas

Popsaná technologická využití L-ASNas se neobejdou bez stanovení aktivity enzymových preparátů a také koncentrace volného L-asparaginu. Pro měření aktivity L-ASNasy byly vyvinuty a popsány různé metody, přičemž tyto metody spočívají hlavně ve stanovení množství produktů reakce katalyzované těmito enzymy, tedy amoniaku nebo kyseliny L-asparagové¹. Amoniak uvolněný během asparaginasové reakce lze stanovit Berthelotovou metodou, reakcí s Nesslerovým činidlem, s indofenolem⁶⁹ nebo je možné detekovat amoniak iontově selektivní elektrodou⁷⁰. Vzniklou L-asparagovou kyselinu lze stanovit např. pomocí HPLC (cit.⁷¹), cirkulárního dichroismu⁷² nebo reakcí s hydroxylaminem a chloridem železitým⁷³. Jiné metody stanovení L-asparaginasové aktivity využívají alternativních substrátů: 5-diazo-4-oxo-L-norvalinu, L-asparagová kyselina-β-7-amido-4-methylkumarinu a β-hydroxamátu kyseliny L-asparagové⁷⁴.

Při využití L-ASNas v medicíně i v potravinářství je hodnocena nejen aktivita enzymového preparátu, ale i množství nerozštěpeného L-asparaginu po aplikaci preparátu, což určuje jeho efektivitu a tedy použitelnost. K analýze množství přítomného L-asparaginu se v současné době využívá vysokotlaká chromatografie, což je ale přístrojově i časově náročná metoda⁷⁵.

Nalezení jednoduché, rychlé, snadno kvantifikovatelné a dostatečně citlivé metody, nejlépe za použití netoxických sloučenin, by nepochybně vedlo k rozvoji další oblasti využití L-ASNas, a to konkrétně při konstrukci biosenzorů^{18,76}. Řada vědeckých týmů se zabývá možností vytvoření biosenzorů obsahujících L-ASNasu, pomocí kterých by bylo možné sledovat hladinu L-asparaginu v krvi v průběhu onkologické léčby³. Zároveň by obdobné využití mohly nalézt tyto biosenzory i v potravinářském průmyslu, kde by sloužily k rychlému ověření množství volného L-asparaginu ve vstupních surovinách, u nichž hrozí riziko vzniku akrylamidu během zpracování³.

5. Závěr

V tomto krátkém přehledovém článku jsme se snažili přiblížit a shrnout možnosti využití L-ASNasy ve zdravotnictví i potravinářském průmyslu. Jak je patrné, tyto enzymy mají velký potenciál pro různé obory, který se dosud nepodařilo plně využít. Současný výzkum se proto zaměřuje hlavně na optimalizaci parametrů rekombinantní produkce a purifikace těchto enzymů a zároveň na charakterizaci L-ASNas z nových zdrojů, které by mohly poskytnout enzymy s vlastnostmi výhodnějšími pro medicínskou či biotechnologickou aplikaci. Pozadu nezůstávají ani moderní techniky genového inženýrství, díky kterým je možné modifikovat vlastnosti již známých enzymů uměle, případně přiblížit jejich strukturu lidské L-ASNase a snížit tak nežádoucí vedlejší účinky vznikající v důsledku cizorodého původu enzymů využívaných v současné době.

Zkratky

L-ASNasa	L-asparaginasa
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
GAS	„Group A Streptococcus“
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
K_M	Michaelisova konstanta
MHRA	Regulační úřad pro léky a zdravotnictví
PEG	polyethylenglykol
PMDA	Agentura pro léčiva a zdravotnické přípravky

LITERATURA

- Batool T., Makky E. A., Jalal M., Yusoff M. M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178, 900 (2016).
- da Silva L. S., Doonan L. B., Pessoa A. Jr., de Oliveira M. A., Long P. F.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69, 503 (2022).
- Nunes J. C., Cristóvão R. O., Santos-Ebinuma V. C., Faria J. L., Silva C. G., Neves M. C., Freire M. G., Tavares A. P.: *Encyclopedia* 1, 848 (2021).
- Vimal A., Kumar A.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 33, 40 (2017).
- Izadpanah Qeshmi F., Homaei A., Fernandes P., Javadpour S.: *Microbiol. Res.* 208, 99 (2018).
- Reiff A., Zastrow M., Sun B. C., Takei S., Mitsuha H., Bernstein B., Durden D.: *Clin. Exp. Rheumatol.* 19, 639 (2001).
- Carapetis J. R., Steer A. C., Mulholland E. K., Weber M.: *Lancet Infect. Dis.* 5, 685 (2005).
- Abd El-Baky H. H., El-Baroty G. S.: *Recent Pat. Biotechnol.* 14, 154 (2020).
- Chen Q., Ye L., Fan J., Zhang X., Wang H., Liao S., Song P., Wang Z., Wang S., Li Y.: *Oncotarget* 8, 91052 (2017).
- Vimal A., Kumar A.: *3 Biotech* 8, 278 (2018).
- Panosyan E. H., Wang Y., Xia P., Lee W.-N. P., Pak Y., Laks D. R., Lin H. J., Moore T. B., Cloughesy T. F., Kornblum H. I.: *Mol. Cancer Res.* 12, 694 (2014).
- Masterson M., Hull B., Vollmer L.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1301 (1988).
- Broome J.: *J. Exp. Med.* 127, 1055 (1968).
- Haskell C., Canellos G., Leventhal B., Carbone P., Block J., Serpick A., Selawry O.: *N. Engl. J. Med.* 281, 1028 (1969).
- Chiu M., Taurino G., Bianchi M. G., Kilberg M. S., Bussolati O.: *Front. Oncol.* 9, 1480 (2020).
- Seeman P.: *J. Med. Biogr.* 22, 90 (2014).
- Boos J., Werber G., Ahlke E., Schulze-Westhoff P., Nowak-Göttl U., Würthwein G., Verspohl E., Ritter J., Jürgens H.: *Eur. J. Cancer* 32, 1544 (1996).
- Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S.: *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 35, 449 (2007).
- Punia S., Kumar R., Kumar K.: *Int. J. Appl. Biol.* 6, 40 (2015).
- de Moraes S. B., de Souza T. D. A. C. B.: *Int. J. Clin. Oncol.* 58, 11 (2021).
- Nunes J. C., Cristóvão R. O., Freire M. G., Santos-Ebinuma V. C., Faria J. L., Silva C. G., Tavares A. P.: *Molecules* 25, 5827 (2020).
- Richards N. G., Kilberg M. S.: *Annu. Rev. Biochem.* 75, 629 (2006).
- Horowitz B., Madras B. K., Meister A., Old L. J., Boyse E. A., Stockert E.: *Science* 160, 533 (1968).
- Samson R., Legendre J. B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1415 (2005).
- Derst C., Henseling J., Röhm K. H.: *Protein Sci.* 9, 2009 (2000).
- Kotzia G. A., Labrou N. E.: *J. Biotechnol.* 127, 657 (2007).
- Clementi A.: *Arch. Int. Physiol.* 19, 369 (1922).
- Dolowy W. C., Henson D., Cornet J., Sellin H.: *Cancer* 19, 1813 (1966).
- Lew G.: *Clin. Cancer Res.* 26, 325 (2020).
- https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/101063s5169lbl.pdf, staženo 19. 10. 2022.
- <https://www.fiercepharma.com/m-a/lundbeck-to-stop-making-cancer-drug>, staženo 13. 10. 2022.
- <https://www.medicines.org.uk/emc/product/12340#gref>, staženo 12. 3. 2023.
- Ho D., Brown N., Yen A., Holmes R., Keating M., Abuchowski A., Newman R., Krakoff I.: *Drug Metab.*

- Dispos. 14, 349 (1986).
34. Kurtzberg J., Asselin B., Bernstein M., Buchanan G. R., Pollock B. H., Camitta B. M.: *J. Pediatr. Hematol./Oncol.* 33, 610 (2011).
 35. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/103411s5126lbl.pdf, staženo 19. 10. 2022.
 36. Jiang J., Batra S., Zhang J.: *Metabolites* 11, 402 (2021).
 37. Avramis V. I., Tiwari P. N.: *Int. J. Nanomed.* 1, 241 (2006).
 38. Shrivastava A., Khan A. A., Khurshid M., Kalam M. A., Jain S. K., Singhal P. K.: *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 100, 1 (2016).
 39. Hunger S. P., Mullighan C. G.: *N. Engl. J. Med.* 373, 1541 (2015).
 40. Chabard S. a 24 spoluautorů: *Br. J. Haematol.* 201, 673 (2023).
 41. Raetz E. A., Salzer W. L.: *J. Pediatr. Hematol./Oncol.* 32, 554 (2010).
 42. Ramya L. N., Doble M., Rekha V. P. B., Pulicherla K. K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 2144 (2012).
 43. Chan W. K., Lorenzi P. L., Anishkin A., Purwaha P., Rogers D. M., Sukharev S., Rempe S. B., Weinstein J. N.: *Blood* 123, 3596 (2014).
 44. Lanvers-Kaminsky C.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 79, 439 (2017).
 45. Cruzat V., Macedo Rogero M., Noel Keane K., Curi R., Newsholme P.: *Nutrients* 10, 1564 (2018).
 46. Avramis V. I. a 12 spoluautorů: *Blood* 99, 1986 (2002).
 47. Strullu M., Corradini N., Audrain M., Orsonneau J. L., Bouige D., Thomare P., Vermot-Desroches C., Mansuy A., Legrand A., Rozé J. C.: *Leuk. Lymphoma* 51, 1464 (2010).
 48. Vimal A., Kumar A.: *Int. J. Pept. Res. Ther.* 28, 9 (2022).
 49. Baruch M., Belotserkovsky I., Hertzog B. B., Ravins M., Dov E., McIver K. S., Le Breton Y. S., Zhou Y., Cheng C. Y., Hanski E.: *Cell* 156, 97 (2014).
 50. Geldanowski J.: *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 24, 243 (1976).
 51. Kullas A. L., McClelland M., Yang H. J., Tam J. W., Torres A., Porwollik S., Mena P., McPhee J. B., Bogomolnaya L., Andrews-Polymeris H.: *Cell Host Microbe* 12, 791 (2012).
 52. McCollister D., Oyen F., Rowe V.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 172 (1964).
 53. Butterworth B. E., Eldridge S. R., Sprankle C. S., Working P. K., Bentley K. S., Hurtt M. E.: *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 148 (1992).
 54. Bull R., Robinson M., Stober J.: *Cancer Lett.* 24, 209 (1984).
 55. Reynolds T.: *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 876 (2002).
 56. Shakambari G., Ashokkumar B., Varalakshmi P.: *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17, 213 (2019).
 57. Wang Y., Xu W., Wu H., Zhang W., Guang C., Mu W.: *Int. J. Biol. Macromol.* 186, 975 (2021).
 58. <https://www.szpi.gov.cz/clanek/informace-k-nove-povinnosti-provozovatelu-prijmout-opatreni-ke-snizeni-obsahu-akrylamidu-v-potravinach.aspx>, staženo 8. 3. 2023.
 59. Hendriksen H. V., Kornbrust B. A., Østergaard P. R., Stringer M. A.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 4168 (2009).
 60. Ciesarová Z., Kukurová K., Mikušová L., Basil E., Polakovičová P., Duchoňová L., Vlček M., Šturdík E.: *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* 6, 327 (2014).
 61. Rottmann E., Hauke K. F., Krings U., Berger R. G.: *Food Control* 123, 107739 (2021).
 62. Covino C., Sorrentino A., Di Piero P., Aiello A., Romano R., Masi P.: *Food Chem. Adv.* 2, 100206 (2023).
 63. Pedreschi F., Kaack K., Granby K.: *Food Chem.* 109, 386 (2008).
 64. Porto A. C. V., Freitas-Silva O., de Souza E. F., Gottschalk L. M. F.: *Beverages* 5, 32 (2019).
 65. Corrêa C. L. O., das Mercês Penha E., Dos Anjos M. R., Pacheco S., Freitas-Silva O., Luna A. S., Gottschalk L. M. F.: *Food Chem.* 338, 128045 (2021).
 66. <https://www.kerry.com/products/functional-ingredients/acrylamide-reduction/acryleast.html>, staženo 20. 6. 2023.
 67. <https://www.nutritionaloutlook.com/view/kerry-launches-next-generation-of-acrylamide-reducing-yeast-called-acryleast-pro>, staženo 20. 6. 2023.
 68. <https://www.renaissanceingredients.com/solution#evolution>, staženo 20. 6. 2023.
 69. Scheiner D.: *Water Res.* 10, 31 (1976).
 70. Zhou L., Boyd C. E.: *Aquaculture* 450, 187 (2016).
 71. Nath C. E., Dallapozza L., Eslick A. E., Misra A., Carr D., Earl J. W.: *Biomed. Chromatogr.* 23, 152 (2009).
 72. Kudryashova E. V., Sukhoverkov K. V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 1183 (2016).
 73. Grossowicz N., Wainfan E., Borek E., Waelsch H.: *J. Biol. Chem.* 187, 111 (1950).
 74. Lanvers C., Pinheiro J. P. V., Hempel G., Wuerthwein G., Boos J.: *Anal. Biochem.* 309, 117 (2002).
 75. Rizzari, C. a 28 spoluautorů: *Haematologica* 104, 1812 (2019).
 76. Fraticelli Y., Meyerhoff M.: *Anal. Chem.* 55, 359 (1983).
 77. https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00053021.pdf, staženo 27. 3. 2023.
 78. <https://www.kyowakirin.com/history/index.html>, staženo 25. 3. 2023.
 79. <https://www.pmda.go.jp/files/000232773.pdf>, staženo 25. 3. 2023.
 80. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spectrila-epar-public-assessment-report_en.pdf, staženo 18. 8. 2022.
 81. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/761102s0001bl.pdf, staženo 27. 9. 2022.
 82. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/125359s088lbl.pdf, staženo 19. 10. 2020.

83. <https://portonbiopharma.com/products/erwinase/>, staženo 26. 3. 2023.
84. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/761179s000lbl.pdf, staženo 18. 8. 2022.

L. Pejšková, K. Loužecká, T. Podzimek, and E. Benešová (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **L-Asparaginases and Their Potential in Biotechnology and Medicine**

L-Asparaginase (EC 3.5.1.1) is a key enzyme that hydrolyzes L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia. This feature of L-asparaginase is used in anti-cancer therapy to inhibit protein synthesis in cancer cells. Therefore, L-asparaginase is used as a basis for chemotherapy to treat patients with acute lymphoblastic leukemia in pediatrics. Commercial L-asparaginases for healthcare applications

are mainly obtained from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* (renamed to *Dickeya dadantii*). However, the high prevalence of adverse effects complicates the long-term clinical use of L-asparaginase, and therefore current research focuses on the search for new enzymes or on modifying the properties of enzymes already known. At the same time, L-asparaginase has become indispensable for the food industry in recent years, when it had been recognized as one of the possible tools for removing L-asparagine from foods that are at risk of acrylamide formation during thermal processing. This review provides an overview of the current use of L-asparaginase and its pitfalls.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia, acrylamide, biosensor, biological anti-cancer treatment