

Teorie k úloze 1 a úloze 5

Úloha 1 – Barevné reakce aminokyselin a bílkovin

Pro aminokyseliny je charakteristická současná přítomnost karboxylové skupiny $-\text{COOH}$ a aminoskupiny $-\text{NH}_2$. Některé aminokyseliny v postranním řetězci obsahují další funkční skupiny jako např. $-\text{SH}$, $-\text{OH}$, guanidinovou skupinu nebo aromatické jádro. Přítomnost těchto struktur podmiňuje různé barevné reakce, které lze použít k orientačnímu stanovení aminokyselin. Pro volnou α -amino-skupinu všech aminokyselin je společná **ninhydrinová reakce**. Aromatické jádro ve struktuře tyrosinu, fenylalaninu nebo tryptofanu poskytuje **xantoproteinovou reakci**. Fenolová (tyrosin) a imidazolová (histidin) skupina mohou reagovat s **diazoniovými solemi**. Sulfhydrylovou ($-\text{SH}$) skupinu cysteinu lze prokázat reakcí s **Pb^{2+} ionty**.

Aminokyseliny se spojují peptidovou vazbou a vytvářejí peptidy a bílkoviny. Průkaz peptidové vazby **biuretovou reakcí** s Cu^{2+} ionty se využívá pro stanovení koncentrace celkové bílkoviny v séru.

Funkční skupiny v postranních řetězcích aminokyselin v polypeptidovém řetězci reagují obdobně jako volné aminokyseliny. Reakce specifické pouze pro určité aminokyseliny lze tedy využít i k orientačnímu zjištění, zda určitý peptid nebo protein danou specifickou aminokyselinu obsahuje či nikoliv. V našem praktickém cvičení budeme takto srovnávat reaktivitu dvou bílkovin: **vaječného albuminu** a **želatiny**. Vaječný albumin je příkladem plnohodnotné bílkoviny, obsahující všechny aminokyseliny. Želatina je produkt denaturace a částečné hydrolýzy kolagenu, z aminokyselin převažuje glycin, prolin, hydroxyprolin a kyselina glutamová, zatímco obsah aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu je nízký, a tryptofan stejně jako cystein prakticky chybí.

Ninhydrinová reakce

S ninhydrinem reaguje amoniak a primární alifatické aminy, tedy i všechny aminokyseliny, které obsahují volnou aminoskupinu. V závislosti na testované aminokyselině vzniká při reakci s ninhydrinem modrofialový až hnědý produkt. Ninhydrinovou reakci poskytují i iminokyseliny – prolin a hydroxyprolin, vzniklý produkt má však žluté zbarvení. V peptidech

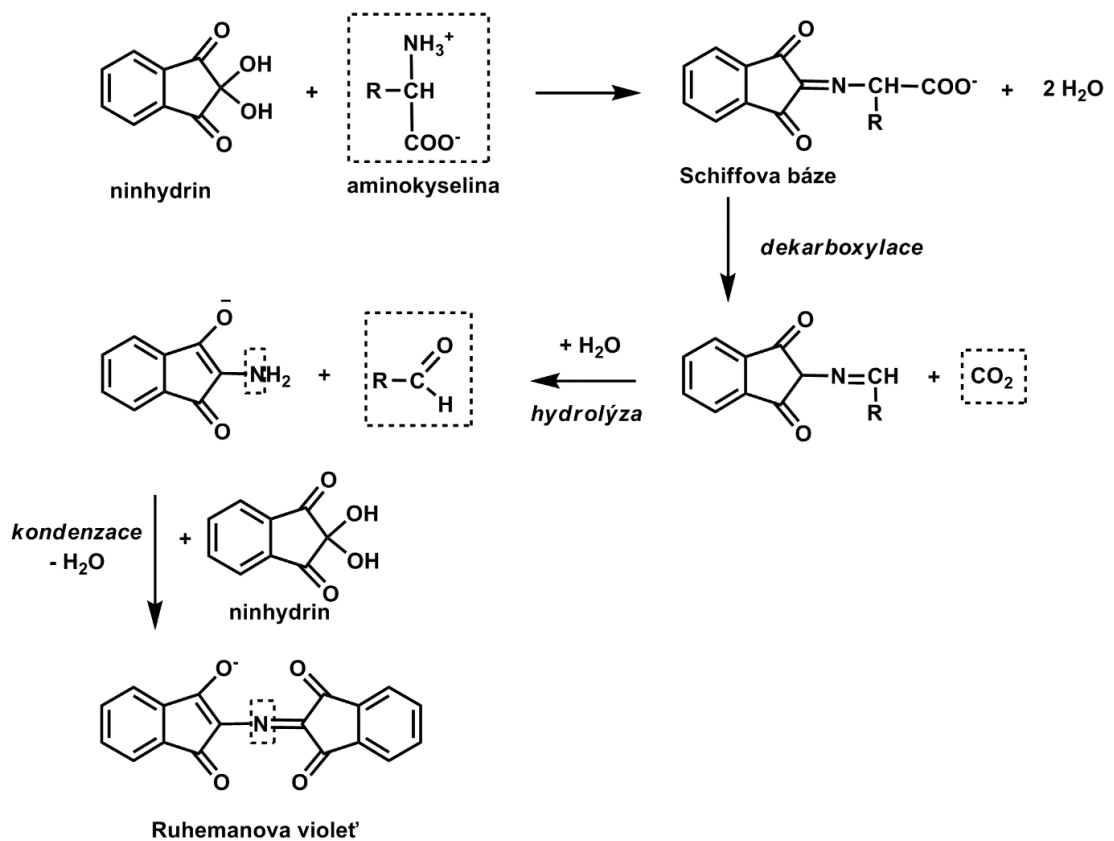
a proteinech jsou aminoskupiny vázány v peptidové vazbě, ale mohou reagovat ε- aminoskupiny lysinu nebo koncové $-NH_2$ skupiny.

Ninhydrinová reakce se často využívá při stanovení aminokyselin. V lékařství našla uplatnění při vyšetřování poruch jejich metabolismu, jako je např. fenylketonurie. Analýza profilu aminokyselin v krvi se provádí ionexovou chromatografií s následnou detekcí jednotlivých aminokyselin reakcí s ninhydrinem.

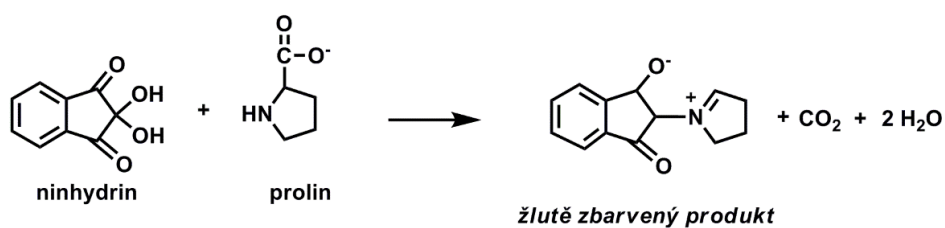
Princip reakce ninhydrinu s α-aminokyselinami:

Reakce ninhydrinu s aminokyselinami. V první fázi je hydroxyskupina ninhydrinu nahrazena aminoskupinou aminokyseliny, vzniká meziprodukt typu Schiffovy báze. Následuje dekarboxylace připojené aminokyseliny a uvolnění aldehydu. Poté vzniklý meziprodukt charakteru nestálého aminu reaguje s další molekulou ninhydrinu za vzniku barevného produktu, označovaného jako Ruhemanova violeť, kde je z původní aminokyseliny obsažen pouze atom dusíku v centrální části molekuly, zbylá část molekuly se odštěpila ve formě oxidu uhličitého a aldehydu. Žlutě zbarvený produkt vznikající reakcí s iminokyselinami má odlišnou strukturu.

Reakce ninhydrinu s α-aminokyselinou

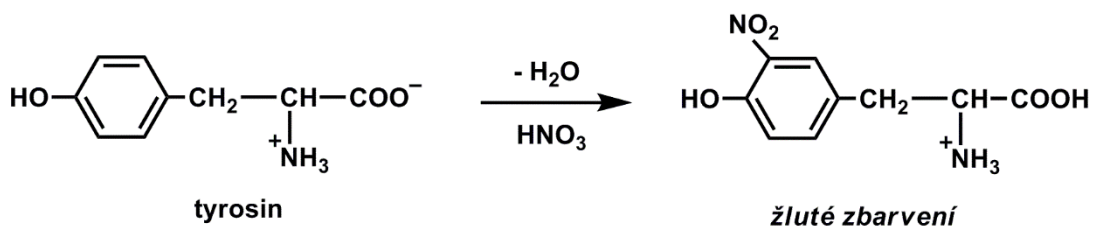


Reakce ninhydrinu s iminokyselinou



Xanthoproteinová reakce

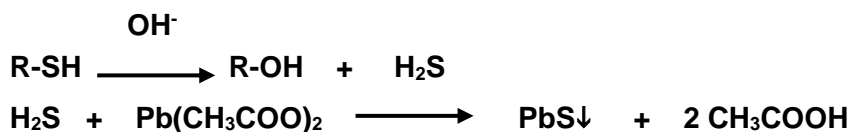
Pro aromatické jádro je typická nitrace koncentrovanou kyselinou dusičnou. Vzniklé nitroderiváty se vyznačují intenzivně žlutým zbarvením (řecky *xanthos* = žlutý). Podobnou reakci poskytují i aminokyseliny, které obsahující aromatické jádro – tyrosin, tryptofan a fenylalanin (slabě). Rovněž většina bílkovin v závislosti na obsahu aromatických aminokyselin reaguje s koncentrovanou kyselinou dusičnou pozitivně. Po přidání koncentrované kyseliny dusičné k roztoku bílkoviny se vyloučí bílá sraženina denaturovaného proteinu, která po povaření zežloutne.



Žluté zbarvení kůže, které se vyvine po potřísnění kyselinou dusičnou, je výsledkem xanthoproteinové reakce s aromatickými aminokyselinami bílkovin obsaženými v epidermis.

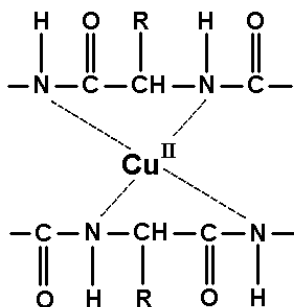
Reakce na cystein – průkaz síry v molekulách bílkovin

Cystein, stejně tak i bílkoviny obsahující tuto aminokyselinu ve větším množství, uvolňují v silně zásaditém prostředí sulfan, který můžeme následně prokázat reakcí s octanem olovnatým. Vytváří se černohnědá sraženina sulfidu olovnatého:

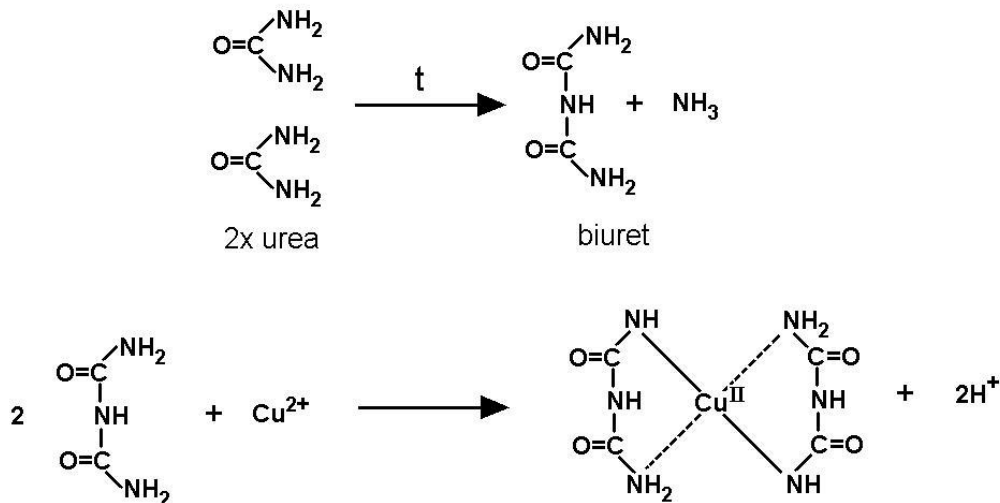


Biuretová reakce

Všechny bílkoviny dávají s měďnatými ionty v alkalickém prostředí fialové zbarvení. Příčinou této barevné změny je vznik komplexu měďnatých iontů s dusíky sousedních peptidových vazeb:



Tato reakce závisí na přítomnosti peptidových vazeb, nikoliv na vlastnostech postranních aminokyselinových zbytků a poskytují ji tedy všechny proteiny bez rozdílu. Obecně takto reagují všechny látky, která mají v molekule alespoň dvě sousedící amidové skupiny $-\text{CO}-\text{NH}_2$ anebo alespoň dvě peptidové vazby $-\text{CO}-\text{NH}-$. Nejjednodušší sloučenina, která může reagovat je tedy oxamid $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$, anebo biuret (bis-urea, dimer močoviny), po němž je tato reakce pojmenována:



Úloha 5 – Výpočet dusíkové bilance

V lidském organismu dochází neustále k syntéze a degradaci bílkovin. Sledování dusíkové bilance poskytuje základní informace o metabolismu tělesných bílkovin. Označuje rozdíl mezi množstvím dusíku přijatého v potravě a množstvím dusíku vyloučeného za časovou jednotku. Příjem dusíku lze určit poměrně přesně, exkrece dusíkových látek se stanovuje obtížněji vzhledem k tomu, že dusík se vylučuje jednak močí především ve formě urey, ale i stolicí a kůží, popř. dalšími sekrety.

Postup při výpočtu dusíkové bilance

Pro výpočet dusíkové bilance musíme zjistit:

1. příjem dusíku v gramech za 24 hodin
2. ztráty dusíku v gramech za 24 hodin

Ad 1. Příjem dusíku za 24 hodin

Základem pro výpočet příjmu dusíku je množstvím přijatých bílkovin v potravě odečtených z dietních tabulek nebo aminokyselin v případě parenterální výživy.

Bílkoviny a aminokyseliny obsahují průměrně 16 % dusíku, takže hmotnost dusíku přijatého potravou je dána množstvím bílkovin přijatých za 24 hodin v g x 0,16 (1 g dusíku = cca 6,25 g bílkovin).

$$\text{Příjem dusíku za 24 hodin v g} = \text{bílkoviny, AMK přijaté potravou} \times 0,16$$

2. Ztráty dusíku za 24 hodin - katabolický dusík (KN)

Katabolický dusík je dán metabolickým odbouráváním bílkovin přijatých potravou a odbouráváním tělesných bílkovin. Podílí se na něm katabolity bohaté na dusík, především močovina (asi 80 %), ale i kreatinin, amoniak, kyselina močová, popř. další.

Hlavní metabolickou cestou katabolizovaných bílkovin je tvorba močoviny v játrech a její vylučování ledvinami močí. Za základ výpočtu se berou ztráty dusíku zjištěné pomocí stanovení močoviny v moči za časovou jednotku.

Kromě ledvin se dusík vylučuje i jinými extrarenálními cestami. Ztráty dusíku stolicí a kůží nestanovujeme přímo, ale do bilance započítáváme přibližné hodnoty. Normální hodnota katabolického dusíku je cca 10 g/den.

Hodnot katabolického dusíku se využívá pro stanovení dávky aminokyselin u pacientů na parenterální výživě.

Výpočet katabolického dusíku:

$$\begin{aligned} \text{KN} = & \text{koncentrace urey v moči (mmol/l)} \times V \text{ (l)} \times 0,028 \times 1,2 \\ & + \\ & \Delta \text{ koncentrace urey v séru (mmol/l)} \times 0,028 \times \text{hmotnost (kg)} \times f \text{ tělesné vody} \\ & + \\ & \text{ztráty kůží a stolicí} \end{aligned}$$

Vzorec pro výpočet zahrnuje tři položky.

- Za základ výpočtu se bere údaj o množství močovin vyloučené za 24 hodin, který získáme sběrem moči za příslušné časové období a určením koncentrace močovin v moči. Předpokládáme, že močovina tvoří 80 - 84 % dusíku vyloučeného močí a že jeden mol močovin obsahuje 28 g dusíku. Zbývající podíl N je vyloučen ve formě amoniaku, kyseliny močové, kreatininu a dalších sloučenin obsahujících dusík.
- Dále započítáváme změnu dusíku močovin v celkové tělesné vodě. Vycházíme ze změny koncentrace močovin v séru na konci a na začátku sledovaného dne. Zvýšení koncentrace močovin v séru během sledovaného dne znamená, že část močovin nebyla vyloučena.

Močovina snadno difunduje všemi membránami, takže jejím distribučním objemem je celková tělesná voda.

K předchozím hodnotám přičítáme přibližné ztráty dusíku jinými cestami (stolicí a kůží).

Vysvětlení jednotlivých koeficientů:

- 0,028 = faktor k přepočtu mmol urey na N v gramech (1 mmol močovin obsahuje 0,028 g dusíku)
- V = objem moči za den v litrech
- 1,2 = faktor k přepočtu na celkový dusík za předpokladu, že N urey se na něm podílí 80 – 84 %
- Δ urey v séru = rozdíl koncentrace urey v séru na konci a na začátku denního sledování
- f = faktor tělesné vody, pro muže je 0,6 a pro ženy 0,55

- ztráty kůží a stolicí závisí na tělesné teplotě
 - 37 °C 1,0 g
 - 37 – 38 °C 1,3 g
 - 38 – 39 °C 1,5 g
 - 39 – 40 °C 1,8 g

Výpočet dusíkové bilance

Po zjištění množství přijatého dusíku a katabolického dusíku vypočítáme dusíkovou bilanci.

$$\text{Dusíková bilance} = \text{příjem dusíku za 24 hodin (v g)} - \text{ztráty dusíku za 24 hodin (v g)}$$

Hodnocení dusíkové bilance

Dusíková bilance	Charakteristika	Výskyt
Vyrovnaná	množství přijatého dusíku se rovná jeho ztrátám	<ul style="list-style-type: none"> • zdravý dospělý člověk
Pozitivní	příjem dusíku převažuje nad ztrátami – převládá anabolismus bílkovin	<ul style="list-style-type: none"> • rostoucí organismus • rekonvalescence • těhotenství
Negativní	<p>příjem dusíku je nižší než jeho výdej, organismus využívá jako zdroj energie vlastní bílkoviny – převládá katabolismus bílkovin (ztráty dusíku znamenají ztrátu proteinů)</p> <p>ztráta 1 g dusíku odpovídá přibližně ztrátě 6,25 g bílkovin a to odpovídá 25 – 30 g svalové hmoty</p>	<ul style="list-style-type: none"> • závažná onemocnění (infekce, operace, nádory, popáleniny, onemocnění gastrointestinálního traktu) • hladovění • nedostatek esenciálních aminokyselin v potravě (chybění jedné esenciální aminokyseliny může navodit negativní dusíkovou bilanci) • pokročilý věk

Použitá literatura

- FIALOVÁ, Lenka. *Návody k praktickým cvičením z lékařské biochemie s klinicko-biochemickými aplikacemi*. 2. rozš. vyd. Praha: Medprint, 2003.
- FIALOVÁ, Lenka. *Lékařská chemie a biochemie pro stomatology: praktická cvičení - teoretická část*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2890-5.