

HISTORIE A VÝZNAM CHIRÁLNÍCH ANALÝZ AMINOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH MATRICÍCH A V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

HELENA ZAHRADNÍČKOVÁ^{a,c},
PETR HARTVICH^{a,b} a IVAN HOLOUBEK^c

^a Laboratoř analytické biochemie, Entomologický ústav AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^b Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2043, 120 43 Praha, ^c Recetox, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno
helenaz@entu.cas.cz

Došlo 2.11.04, přepracováno 7.6.05, přijato 20.6.05.

Klíčová slova: D-aminokyseliny, enantiomery, homochiralita

Obsah

1. Úvod – význam chirálních analýz
2. Historie analýz aminokyselin
3. Význam chirálních analýz aminokyselin
 - 3.1. D-Aminokyseliny v nižších organismech, potravinách, vodě, půdě, sedimentech a vzduchu
 - 3.2. D-Aminokyseliny ve vyšších organismech
 - 3.3. D-Aminokyseliny ve vesmíru
4. Závěr

1. Úvod – význam chirálních analýz

Tento přehled se zabývá historií a významem chirálních analýz, zejména aminokyselin, v biologických materiálech, potravinách a životním prostředí včetně vesmíru od 30. let 20. století.

První, komu se podařilo oddělit dva enantiomery z racemické směsi, byl Louis Pasteur v roce 1848 (cit.¹). V biologických systémech je už nějakou dobu znám jev asymetrie. Různé druhy měkkýšů vytvářejí zrcadlově odlišné tvary schránek. Dokonce i lidské tělo s dvěma nohama, rukama, ušima a očima může být rozděleno na dvě části – na dva neztotožnitelné zrcadlové obrazy. Většina životních procesů, například enzymatické reakce a metabolické procesy, je vysoce enantioselektivních^{2,3}. Chiralita je neoddelitelnou vlastností základních stavebních jednotek života, aminokyselin, sacharidů a jejich oligomerů a polymerů³. Po objevu schopnosti slabých interakcí rozli-

šovat v párech enantiomerů⁴ byly otevřeny další možnosti studia kvantové fyziky a pozměněny klasické chemické představy. Díky slabým interakcím mají D- a L-aminokyseliny nepatrně odlišnou energii (v podstatě tedy nejsou dokonalé zrcadlové obrazy – pravým enantiomerem L-aminokyseliny je D-aminokyselina tvořená z antihmoty). Byl navržen způsob výpočtu tohoto rozdílu energie pro mnoho důležitých biomolekul. Tyto výpočty potvrdily, že L-aminokyseliny jsou stabilnější, než D-aminokyseliny, což může být příčinou homochiralit⁵.

Po zjištění tragických dopadů rozdílných účinků některých enantiomerů léčiv ((R)-thalidomid je sedativum, (S)-thalidomid je teratogen) se enormně rozšířil zájem o studium farmakodynamických a farmakokinetických vlastností enantiomerů biologicky významných látek (stereoisomery léků v biologických systémech se liší biodostupností, metabolismem, vylučováním aj.)³. Při léčbě chorob se zpravidla přednostně používají čisté enantiomery⁶, neboť při užití racemické směsi, v níž je pouze jeden enantiomer aktivní, dochází ke konzumaci poloviny nežádoucí hmoty.

Enantiomery se mohou od sebe lišit i organoleptickými vlastnostmi – chutí (L-fenylalanin chutná sladce, D-fenylalanin hořce), těkavé látky vůně ((R)-limonen má pomerančovou, (S)-limonen citrónovou vůni)⁷, ale i fyzikálními vlastnostmi – byla nalezena překvapivá odlišnost v rozpustnosti D- a L-tyrosinu a tím i různá rychlost krystalizace⁸.

Analýza chirálních látek má velký význam také v potravinářství, protože mnoho složek potravy je chirálních; některé jsou přítomny jako čisté enantiomery, jiné jsou přítomny ve specifickém enantiomerním poměru. Enantiomerní poměr některých látek, jako jsou např. aminokyseliny, může být ovlivněn působením tepla, extrémního pH apod. (tj. podmínek vhodných pro racemizaci aminokyselin), aktivitou mikroorganismů (např. fermentací) anebo stárnutím. Zvýšené množství D-aminokyselin v potravinách snižuje jejich biologickou hodnotu (organismus je nedokáže využít jako L-aminokyseliny), je vhodným parametrem k posouzení kvality potravin, protože může indikovat kvalitu technologického procesu, nežádoucí příměsi, dlouhé skladování apod.^{9,10}. Na základě analýz enantiomerů aminokyselin lze rozlišit i druhy kávy¹¹.

Specifické funkce D-aminokyselin se samozřejmě netýkají pouze D-enantiomerů dvaceti esenciálních aminokyselin, ale i všech ostatních D-enantiomerů aminokyselin vyskytujících se v živých organismech (dosud bylo izolováno několik set)¹². Nejlépe prozkoumány jsou zatím právě D-enantiomery esenciálních aminokyselin, ačkoliv ostatní D-aminokyseliny pravděpodobně budou neméně významné.

2. Historie analýz aminokyselin

Základní úloha proteinů (*protos*, řecky první) a jejich stavebních bloků aminokyselin v biologii vyvolala zájem o chemii aminokyselin a proteinů. Aminokyseliny jsou stanovovány v nejrůznějších materiálech – od meteoritů a lunárních vzorků, přes nejrůznější biologické tekutiny až k nově syntetizovaným peptidům a proteinům.

Dlouho panovala představa, že aminokyseliny se v živých organismech vyskytují jen ve svých L-formách. Živé systémy byly považovány za homochirální¹³, D-aminokyseliny byly považovány za v přírodě se nevyskytující. Avšak už v přehledu z roku 1969 (cit.¹⁴) John J. Corrigan shrnuje práce zabývající se výskytem D-aminokyselin v živých organismech (žraločí játra – D-ornithin, létací svaly hmyzu – D-glutamová kyselina, hmyzí krev – D-serin) už od 30. let 20. století! Tyto výsledky však byly dosaženy ještě před nástupem chromatografie a dalších moderních separačních technik, je tedy nutno zvažovat jejich zkreslení vlivem racemizace.

První D-aminokyselinou nalezenou ve zvířecí tkáni za méně zpochybnitelných okolností byl D-alanin nalezený Auclairm a Pattonem v roce 1950 v hemolymfě hmyzu *Oncopeltus fasciatus* (dvourozměrná tenkovrstvá chromatografie kyseliny pyrohroznové získané z matrice působením oxidas D-aminokyselin)¹⁵. V 60. letech 19. století byly nalezeny D-aminokyseliny v peptidoglykanu buněčných stěn mnoha bakterií¹⁶. V krvi savců byla D-aminokyselina (D-alanin) nalezena poprvé v roce 1965 (cit.¹⁷) (obdobnou enzymatickou metodou jako v lit.¹⁵). V posledních šedesáti letech jsou aminokyseliny stanovovány hlavně chromatografickými metodami. Zabývali se jimi i nositelé Nobelovy ceny – J. P. Martin a R. L. M. Synge (1941, rozdělovací chromatografie *N*-acylaminokyselin). V roce 1952 popsali nositelé Nobelovy ceny A. T. James a A. J. P. Martin základy teorie plynové chromatografie, což vedlo v dalších desetiletích k ohromnému rozvoji této metody včetně aplikací v chirální analýze aminokyselin¹⁸. Intenzivní výzkum od konce 80. let dokládá řada přehledů zaměřených na chirální separace aminokyselin různými separačními technikami (GC, HPLC, TLC, kapilární elektroforéza, enzymatické metody)^{19–23}.

3. Význam chirálních analýz aminokyselin

D-Aminokyseliny se vyskytují ve všech třech hlavních větvích vývoje života (archea, bakterie, eukaryota). Existuje stále více důkazů, že D-aminokyseliny plní v živých organismech specifické role, které nedokáží pokrýt L-aminokyseliny²⁴.

3.1. D-Aminokyseliny v nižších organismech, potravinách, vodě, půdě, sedimentech a vzduchu

Častější výskyt D-aminokyselin v nižších organis-

Tabulka I

D-Aminokyseliny v potravinách

D-Amino-kyseliny	Typ	Matrice	Lit.
Různé	volné	želatinový hydrolyzát	29
		sojová omáčka, sýry, kysané zelí, kvasnice, med	30
		mléčné výrobky	31,32
		ocet, nepražená kávová zrna	32
		mateří kašička	33
		ovocné a zeleninové šťávy	29–31, 35, 36
		pivo, víno	29–32,37
D-Alanin	protein	sojové produkty	38
		houba <i>Lentinus edodes</i> (Shiitake)	37

Tabulka II

Volné D-aminokyseliny v potravinách jako markery

Matrice	Význam	Lit.
Potraviný	mikrobiální kontaminace	33,35,36,39
Potraviny a potravinové doplňky	kvalita produktu	35,39,40
Mléko krav	mikrobiální kontaminace	31,32,41
Mléko krav	mastitida	42
Káva <i>Coffea arabica</i> , <i>C. robusta</i>	rozlišení druhů kávy	11

mech je dán evolučně menší specifitou jejich enzymů (multienzymatických systémů)²⁵. Významná část peptidů je syntetizována neribosomální cestou v cytoplazmě, zatímco u vyšších organismů jsou peptidy a bílkoviny převážně ribosomálního původu²⁶.

D-Aminokyseliny jsou součástí peptidoglykanu buněčných stěn mnoha bakterií (D-Asp, D-Ala, D-Glu)^{16,27} a mohou se z nich uvolňovat do okolí²⁸. Díky tomu, a také působením bakteriálních enzymů racemas (epimeras) způsobujících přeměnu L-aminokyselin na D-aminokyseliny, jsou volné D-aminokyseliny nalézány zejména ve fermentovaných potravinách^{11,29–38} (Tabulka I). Přítomnost D-aminokyselin může sloužit jako marker mikrobiálního znečištění^{35,36,39} nebo přídavku syntetických racemických aminokyselin do přírodních produktů^{35,40} (Tabulka II). D-Aminokyseliny bakteriálního původu jsou přítomny i v zažívacím traktu krav a v kravském mléce^{31,32,41}, kde jejich zvýšené množství může být způsobeno mastitidou (zánětem veme-⁴²ne).

D-Aminokyseliny mohou ovšem vznikat v potravinách v kyselém prostředí z L-aminokyselin působením glukosy, fruktosy nebo sacharosy⁴³, tedy nejen působením enzymů mikroorganismů.

D-Serin a D-asparagová kyselina byly nalezeny i v izolovaných mitochondriích krysích jater⁴⁴ (mitochondrie jsou evolučně bakteriálního původu).

Aminokyseliny se dostávají do přírodních vod z mnoha zdrojů⁴⁵ – z rostlinné a půdní organické hmoty, bakterií, sinic, řas a vodních rostlin, ze sedimentů (převážně jejich L-formy), nebo jako odpadní produkty některých technologií (umělá sladidla, potraviny, čisticí prostředky, syntetická hnojiva aj.). Vysoký poměr D/L u některých aminokyselin (lysin, kyselina asparagová a glutamová) může být důležitým ukazatelem antropogenního znečištění vod. V mořské vodě byl studován obsah aminokyselin rozpuštěných ve vodě a obsažených v nerozpuštěných částicích. U vzorků rozpuštěných aminokyselin bylo nalezeno nejvyšší relativní zastoupení D-forem u alaninu, kyseliny asparagové, serinu a glutaminu. V nerozpuštěných částicích měly nejvyšší relativní zastoupení D-asparagová kyselina, D-arginin, D-alanin a D-glutamová kyselina⁴⁶. Výskyt D-asparagové kyseliny, D-alaninu a D-glutamové kyseliny v mořské vodě je vysvětlitelný tím, že tyto aminokyseliny jsou hlavními složkami peptidoglykanu bakterií⁴⁶. Z vysokého podílu D- vůči L-aminokyselinám bylo zjištěno, že značná část rozpuštěného organického dusíku v mořích je bakteriálního původu⁴⁷ (Tabulka III).

Ze stupně převážně časově závislé racemizace L-aminokyselin proteinů (liší se pro jednotlivé aminokyseliny) uchovaných ve zvápenatělých fosiliích lze určit stáří vzorku^{46,48–51} (Tabulka III). Rychlost racemizace je závislá nejen na čase, ale i na teplotě, a proto je nutné mít informace o teplotní historii fosilií^{49,51}. Nejdůležitější diastereoizomerní pár pro stanovení stáří geologických vzorků je L-isoleucin/D-alloisoleucin⁴⁶. Datování znesnadňuje častá přítomnost D-aminokyselin vzniklých činností mikroorganismů⁵². Byl studován poměr volných D/L aminokyselin v různých hloubkách rašelinišť z hlediska racemizace, degradace rostlinami a mikroorganismy a fyzikálně-chemických podmínek rašeliniště²⁹.

Tabulka III
D-Aminokyseliny v životním prostředí

Typ	Matrice	Význam	Lit.
Volné	voda	antropogenní znečištění	45
Peptidoglykany	mořská voda	výskyt mikrobiálních biopolymerů	46,47
Volné	rašeliniště		28
Protein	prach ze vzduchu		53
	fosilie v sedimentech	datování	46,48–52

Velmi zajímavá práce⁵³ popisuje přítomnost D- i L-aminokyselin v proteinech mikroskopického prachu a aerosolu v ovzduší. Při provádění stopové analýzy aminokyselin mohou aminokyseliny přítomné v ovzduší laboratoře kontaminovat vzorky, přičemž kontaminace se zvyšuje s dobou expozice.

3.2. D-Aminokyseliny ve vyšších organismech

D-Aminokyseliny byly nalezeny v různých vyšších organismech vázané v peptidech a v proteinech i ve formě volných aminokyselin (Tabulka IV).

V 70. letech 20. století se objevily v literatuře domněnky, že poměr D/L-asparagové kyseliny v proteinech lze užít k odhadu věku déležijících teplokrevných živočichů (v archeologii, geochemii, soudním lékařství apod.). Obsah D-asparagové kyseliny v metabolicky stabilních proteinech (v zubní sklovině a dentinu) se zvyšuje během lidského života ročně o 0,1 % (cit.⁵⁴) jako výsledek *in situ* racemizace. V roce 1983 byla potvrzena kumulace D-asparagové kyseliny v bílé mozkové hmotě u lidí vlivem přibývajících věku⁵⁵. Racemizace L-aminokyselin proteinů oční čočky může být jednou z příčin vzniku šedého zákalu⁵⁶ (rozbití krystalické terciární struktury proteinů vede ke změnám fyziologických charakteristik očních čoček).

D-Aminokyseliny v peptidech byly nalezeny u obratlovců i bezobratlých. První peptid obsahující D-aminokyselinu nalezený u obratlovců je dermorfin izolovaný z kůže žáby (*Phyllomedusa sauvagei* z Latinské Ameriky, 1981)⁵⁷. Jde o opioidní peptid se sekvencí Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂. Jeho analgetická aktivita je asi 1000x vyšší než u morfinu⁵⁸. Při náhradě L-Ala za D-Ala peptid tuto aktivitu ztrácí. Později byly izolovány ze stejné matrice další dva heptapeptidy obsahující D-Ala (deltorfin I a deltorfin II) s obdobnými účinky⁵⁹. U bezobratlých byly nalezeny dva peptidy v gangliích afrického hlemýžďe *Achatina fulica* – achatin (Gly-D-Phe-Ala-Asp)⁶⁰ ovlivňující funkci srdečního svalu a fulicin (Phe-D-Asn-Glu-Phe-Val-NH₂)⁶¹ stimulující kontrakce svalu odtahovače penisu. Další peptid složený z 48 aminokyselin obsahující v poloze 46 D-Ser, nalezený v jedu pavouka *Agelenopsis aperta* (ω-agatoxin)⁶², funguje jako blokátor kalciového kanálu. Peptid θ-defensin složený výlučně z D-aminokyselin má schopnost chránit lidské buňky před virem HIV-1 (cit.⁶³). Defensiny jsou malé peptidy s antimikrobiálními a antibakteriálními účinky. V tělech savců byly nalezeny tři subtypy – α, β, θ (cit.⁶³).

Volné D-aminokyseliny byly stanovovány ve vyšších rostlinách, informace jsou shrnuty v několika přehledných článcích^{64,65} a knize⁶⁶. Bylo potvrzeno, že D-aminokyseliny se vyskytují v nahosemenných rostlinách, stejně jako v hlavních čeledích krytosemenných jedno- i dvouděložných rostlin¹⁹. Volné D-aminokyseliny se v rostlinách vyskytují v množství 0,2–8 % relativně k odpovídajícím L-aminokyselinám (D-asparagová kyselina, D-asparagin, D-glutamová kyselina, D-glutamin, D-serin a D-alanin se

Tabulka IV

D-Aminokyseliny ve vyšších organismech

D-Aminokyseliny	Typ	Matrice	Důvod studia	Lit.
Asparagová kyselina	protein	lidské zuby, bílá mozková hmota	stárnutí	54,55
Lysin, glutamová kyselina	peptid	oční čočka potkanů	šedý zákal	56
Alanin		kůže žabky <i>Phyllomedusa sauvagei</i>	analgetická (opioidní) aktivita	57-59
Fenylalanin, asparagin		hlemýžď <i>Achatina fulica</i>	neuropeptid	60,61
Serin	volná	pavouk <i>Agelenopsis aperta</i>	blokátor kalciového kanálu	62
Asparagová kyselina		savci	neurotransmitter, vývoj	67,68
N-Methyl-D-asparagová kyselina		škeble <i>Scapharca broughtonii</i> , <i>S. subcrenata</i>	neuroexcitans	69,70
Asparagová kyselina, N-methyl-D-asparagová kyselina		sumka <i>Ciona intestinalis</i>	vliv na sekreci testosteronu a progesteronu	71
Asparagová kyselina, serin		lidský mozek	vývoj	73
Asparagová kyselina		měkkýši, korýši, pláštěnci, ryby, obojživelníci, ptáci, hlodavci	vývoj	72,74,77
Asparagová kyselina		endokrinní žlázy potkanů	vliv na sekreci testosteronu, oxytocinu, prolaktinu, melatoninu	78-80,82
Asparagová kyselina, N-methyl-D-asparagová kyselina		nervový systém a endokrinní žlázy potkanů	vliv na produkci hormonů	81
Asparagová kyselina		lidská cerebrospinální tekutina	degradace mozkových proteinů	99
Glutamová kyselina		hmyz, korýši, ryby, ptáci	vývoj	74
Serin, alanin		hmyz	vývoj	14,24,84
Serin		lidský přední mozek	neuromodulátor	83
Alanin		krev hmyzu	–	15
Alanin		hlodavci	důsledek činnosti endogenní mikroflory, vývoj	17,94
Alanin		mořští korýši	osmotický regulátor	93
Alanin		lidská moč	činnost intestinálních bakterií	95

vyskytují ve většině rostlin, D-prolin, D-valin, D-leucin a D-lysin jen v některých). D-Aminokyseliny v rostlinách vznikají působením racemas z L-aminokyselin, působením aminotransferas vedoucím k přesunu aminoskupin z různých D-aminokyselin na pyruvát nebo 2-ketoglutarát za vzniku D-alaninu a D-glutaminu, a dále enzymatickou *de novo* syntézou, kdy kromě volných D-aminokyselin vznikají i jejich konjugáty (D-Ala-Gly, D-Ala-D-Ala aj.). Existují i další možné cesty vzniku D-aminokyselin v rostlinách – uvolňování z konjugátů, neenzymatický vznik z L-aminokyselin a reaktivních karbonylových sloučenin, vznik z exogenních zdrojů (ze symbiotických bakterií nebo mykorrhizních hub)¹⁹.

Už v roce 1976 Davies a Johnston uvažovali, že volná D-asparagová kyselina může fungovat jako přirozený neurotransmitter u savců⁶⁷. Po překvapujícím nalezení zvýše-

ného množství volné D-asparagové kyseliny v mozku a dalších tkáních hlodavců a v lidské krvi u mladších jedinců⁶⁸ je stále častěji studován původ, metabolismus a úloha D-aminokyselin v tělech živých organismů. Ve tkáních škeblí *Scapharca broughtonii* a *S. subcrenata* byla nalezena kyselina N-methyl-D-asparagová⁶⁹, známá již dříve jako neuroexcitační látka⁷⁰. Kyseliny D-asparagová a N-methylasparagová, nalezené v nervovém komplexu a gonádách mořského živočicha sumky *Ciona intestinalis*, ovlivňují vylučování testosteronu a progesteronu⁷¹. Kyselina D-asparagová se zřejmě účastní morfolického a funkčního vývoje orgánů savců^{68,72–74}. Obsah kyseliny D-asparagové je vyšší v ranných stádiích plodů krys a kuřat (v mozku a sítnici), později se snižuje⁷². Kyselina D-asparagová a kyselina D-glutamová byly nalezeny v různých tkáních nižších obratlovců (ptáci, obojživelníci,

ryby)⁷⁴, kde se zřejmě podílejí na vývoji orgánů a hormonální regulaci v endokrinních žlázách podobně jako u savců. V kůře přední části lidského mozku bylo ve čtrnáctém týdnu těhotenství 60 % z celkového množství asparagové kyseliny v D-formě, ale její množství rychle klesalo na stopová množství po narození⁷³. Ovšem v mozkových šišinkách se obsah D-asparagové kyseliny po narození zvyšuje⁷⁵, její množství v mozku je vyšší v noci než ve dne (podobně jako u melatoninu⁷⁶) a snižuje se s věkem⁷⁷. Bylo zjištěno, že volná D-asparagová kyselina u savců ovlivňuje sekreci hormonů testosteronu⁷⁸, oxytocinu⁷⁹, prolaktinu⁸⁰, luteinizačního a růstového hormonu⁸¹ a melatoninu⁸². Protože se její obsah v různých tkáních, jako jsou varlata, sítnice, šišinka mozková a nadledvinky zvyšuje během morfologického a funkčního dozrávání, je zvažován vliv této aminokyseliny na ontogenezi a diferenciaci⁸³.

Volný D-serin byl nalezen ve hmyzu^{14,28,84}, vyskytuje se hlavně v předním mozku v průběhu celého života savců⁷³, funguje jako neuromodulátor a účastní se mnoha fyziologických a patofyziologických procesů, jako je učení, vnímání bolesti, schizofrenie, epilepsie⁸³. D-Serin je proto předmětem zájmu jako možný lék proti schizofrenii⁸⁵. Bylo prokázáno, že D-serin vzniká v mozcích krysu přímo racemizací L-serinu⁸⁶.

D-Aminokyseliny tkání savců vznikají biosyntézou (D-serin⁸⁷, D-asparagová kyselina^{87–89}, D-alanin⁸⁷) nebo se do nich dostávají z potravy (D-alanin⁹⁰, D-prolin⁹¹, D-leucin⁹¹) a bakterií zažívacího traktu (D-alanin)⁹².

D-Alanin byl první aminokyselinou nalezenou ve zvířecí tkáni (hemolymfa hmyzu *Oncopeltus fasciatus*)¹⁵ a také první D-aminokyselinou nalezenou v krvi savců (1965) v důsledku činnosti endogenní mikroflory¹⁷. Volný D-alanin funguje jako osmotický regulátor u mořských bezobratlých korýšů⁹³. Byla sledována jeho distribuce v centrální nervové soustavě a dalších tkáních potkanů. Z 22 zkoumaných tkání byl pozorován nejvyšší obsah D-alaninu v přední hypofýze, druhý nejvyšší v pankreatu. Obsah D-alaninu v podvěsku mozkovém byl nejvyšší ve věku 6 týdnů, a pak se s věkem velmi rychle snižoval a jeho množství bylo signifikantně vyšší ve dne než v noci⁹⁴.

V posledních letech je intenzivně studována diagnostická hodnota D-aminokyselin. Změnami v zastoupení D-aminokyselin (volných i vázaných v proteinech) je možno diagnostikovat některé nemoci. V moči pacientů s onemocněním syndromu krátkého střeva bylo nalezeno zvýšené množství D-alaninu, zřejmě intestinálního původu⁹⁵. D-Lysin byl zjištěn u pacientů s myelomem (rakovinou krve) a podstupujících dialýzu⁹⁶. Množství D-alaninu volného i vázaného v proteinech a volného D-serinu v mozcích a cerebrospinální tekutině se liší u zdravých lidí a pacientů s Alzheimerovou chorobou^{97–99}. D-Aminokyseliny v cerebrospinální tekutině mohou vznikat degradací mozkových bílkovin⁹⁸. Další výzkum vztahu mezi obsahem D-aminokyselin a Alzheimerovou chorobou může vést k pokrokům při léčení této devastující choroby⁹⁷. Změny v obsahu D-aminokyselin v tkáních nastávají při onemocněních ledvin^{99–101}. Obsah D-aminokyselin v plaz-

mě starých lidí je signifikantně vyšší než u mladších lidí^{53,54,102} a pozitivně koreluje s markery ledvinových onemocnění, jako je např. kreatinin^{101,102}, a dalšími markery, jako např. mikroglobulin¹⁰².

Problematické D-aminokyselin v živých organismech je věnována řada přehledných článků. Analytickou chemií a biochemií D-aminokyselin v tkáních a tělních tekutinách savců se zabývá přehled¹⁰³, výskyt a význam D-aminokyselin ve vyšších organismech shrnuje práce¹⁰⁴. D-Aminokyseliny byly nalezeny ve všech hlavních rodech savců¹⁰⁵.

3.3. D-Aminokyseliny ve vesmíru

Stanovení chirálního zastoupení aminokyselin ve vzorcích z vesmíru je velmi důležité pro poznání vývoje života. Klíčovým problémem původu života je vznik homochiralita (tj. převahy jednoho ze dvou možných enantiomerů chirálních molekul) pozemských organismů. Byly navrženy dvě teorie – biotická (evoluce vybrala z původně racemických směsí organických látek stabilnější konfiguraci) a abiotická (asymetrie předcházela vzniku života).

Shrnutí mnoha prací snažících se podpořit biotickou teorii, spolu s výsledky geosimulačních experimentů (ze tří aminokyselin alaninu, asparagové kyseliny a glycinu vzniklo 34 di-, tri- a tetrapeptidů, z toho 70 % vykazovalo diastereoisomerní přebytek mezi 4,2–56,6 %), lze nalézt v práci¹⁰⁶. Prebiotickou chemií a zkoumáním možných cest k homochiralitě se zabývá řada vědeckých týmů, některé podporují teorii biotickou^{8,106–109}, jiné ji vyvracejí¹¹⁰.

Abiotická teorie uvažuje o vnesení chirálních látek na Zemi z kosmu (extraterestriální)¹¹¹. K podpoře této teorie pomohlo i zkoumání enantiomerních poměrů v meteoritických vzorcích^{112–104}. Byly nalezeny přebytky L-enantiomerů aminokyselin, které se v biosféře vyskytují jen velmi omezeně nebo vůbec ne. Protože zkoumaný meteorit (pojmenovaný Murchison) vznikl před 4,5 miliardami let, výsledky nasvědčují asymetrickému vlivu na chemický vývoj před vznikem života. Dosud v něm bylo identifikováno přes 70 aminokyselin, včetně osmi biogenních. Evropská kosmická agentura (ESA) plánuje pro podporu extraterestriální teorie vzniku homochiralita analýzy materiálu komet *in situ* – projekt COSAC (cometary sampling and composition). Byl popsán způsob, jakým bude sledováno chirální složení aminokyselin na kometě 46P/Wirtanen v roce 2012 (cit.^{115,116}), práce¹¹⁶ zároveň shrnuje, jak byla dosud využívána technika GC a GC/MS při výzkumu vesmíru. Pro měření přímo v jádru komet musely být vyvinuty a speciálně testovány kolony různého typu včetně kolon s chirálními stacionárními fázemi Chirasil-Dex a Chirasil-L-Val (enantiomery derivátů aminokyselin jsou separovány po jednostupňové derivatizaci dimethylformamid-dimethylacetalem) odolávající vibracím, kosmickému záření, vakuu a velkým rozdílům teplot¹¹⁷. Stejně tak jsou vyvíjeny vhodné analytické metody pro stanovení chirálních aminokyselin při výzkumu Marsu *in situ*.

V přehledu¹¹⁸ je diskutováno několik hypotéz týkajících se homochiralita a jejího spojení s procesy v sub-

atomárním měřítku ve vztahu k procesům pomáhajícím definovat strukturu vesmíru.

4. Závěr

Distribuce, množství a úloha D-aminokyselin v živých organismech i mimo ně je velmi zajímavá oblast zkoumání, velmi dynamicky se rozvíjející. Volné D-aminokyseliny jsou zřejmě jedním z faktorů řídících tvorbu a diferenciaci buněk nebo tkání. D-Aminokyseliny v tkáních a biologických tekutinách mohou být využity jako marker stárnutí organismů nebo mohou mít diagnostickou hodnotu. Stanovování chirálního zastoupení aminokyselin ve vzorcích z vesmíru může pomoci při odhalování původu života na Zemi.

Seznam zkratk

Kódy aminokyselin v peptidech a proteinech:

Asp	asparagová kyselina
Asn	asparagin
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
Phe	phenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin
Tyr	tyrosin
Val	valin

LITERATURA

- Pasteur L.: C. R. Acad. Sci. 26, 535 (1848).
- Kallenborn R., Hühnerfuss H., v knize: *Chiral Environmental Pollutants – Trace Analysis and Ecotoxicology*, kap. 1, str. 2. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 2001.
- Maier N. M., Franco P., Lindner W.: J. Chromatogr., A 906, 3 (2001).
- Lee T. D., Yang C. N.: Phys. Rev. 104, 254 (1956).
- MacDermott A. J.: Origins Life Evol. Biosphere 25, 191 (1995).
- Stinson S. C.: Chem. Eng. News 77, 101 (1999).
- Jonas J.: Chem. Listy 90, 410 (1996).
- Shinitzky M., Muselman F., Barda Y., Haimovitz R., Chen E., Dealer D. W.: Origins Life Evol. Biosphere 32, 285 (2002).
- Marchelli R., Dossena A., Palla G.: Trends Food Sci. Technol. 7, 113 (1996).
- Pawlowska M., Armstrong D. W.: Chirality 6, 270 (1994).
- Casal S., Alves A. R., Mendes E., Oliveira M. B. P., Ferreira M. A.: J. Agric. Food Chem. 51, 6495 (2003).
- Barrett G.C. (ed.), v knize: *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, kap. 4, str. 55. Chapman and Hall, London 1985.
- Janoschek R. (ed.), v knize: *Chirality. From Weak Bosons to alfa-Helix*, kap. 2, str. 18. Springer-Verlag, Berlin 1991.
- Corrigan J. J.: Science 164, 142 (1969).
- Auclair J., Patton R.: Rev. Can. Biol. 9, 3 (1950).
- Perkins H.R.: Bacteriol. Rev. 27, 18 (1963).
- Hoepflich P. D.: J. Biol. Chem. 240, 1654 (1965).
- Zumwalt R. W., Kuo K. C. T., Gehrke C. W. (ed.), v knize: *Amino Acid Analysis by Gas Chromatography*, sv. I, předmluva. CRC Press, Boca Raton 1987.
- Imai K., Fukushima T., Santa T., Homma H., Hamase K., Sakai K., Kato M.: Biomed. Chromatogr. 10, 303 (1996).
- Imai K., Kato M., Huang Y., Ichihara H., Fukushima T., Santa T., Homma H.: Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn. 117, 637 (1997).
- Bojarski J.: Chem. Anal. (Warsaw) 42, 139 (1997).
- Ward T. J.: Anal. Chem. 72, 4521 (2000).
- Ward T. J.: Anal. Chem. 74, 2863 (2002).
- Brückner H., Westhauser T.: Amino Acids 24, 43 (2003).
- Marchelli R., Dossena A., Palla G.: Trends Food Sci. Technol. 7, 113 (1996).
- Kleikauf H., Döhren H.: Prog. Drug Res. 48, 27 (1997).
- Kleikauf H., Döhren H.: Biotechnology 7, 277 (1997).
- Brückner H., Becker D., Lüpke M.: Chirality 5, 385 (1993).
- Kunnas A. V., Jauhiainen T. P.: J. Chromatogr. 628, 269 (1993).
- Brückner H., Wittner R., Godel H.: Chromatographia 32, 383 (1991).
- Brückner H., Langer M., Lüpke M., Westhauser T., Godel H.: J. Chromatogr., A 697, 229 (1995).
- Jin D. R., Miyahara T., Oe T., Toyo'oka T.: Anal. Biochem. 269, 124 (1999).
- Casal S., Oliveira M. B., Ferreira M. A.: J. Chromatogr., A 866, 221 (2000).
- Boselli E., Caboni M. F., Sabatini A. G., Marazzan G. L., Lercker G.: Apidologie 34, 129 (2003).
- Watanabe A., Yamaguchi S., Urabe K., Asada Y.: J. Mol. Catal., B: Enzymatic 23, 379 (2003).
- Brückner H., Lüpke M.: Chromatographia 31, 123 (1991).
- Brückner H., Westhauser T.: Chromatographia 39, 419 (1994).
- Kato M., Fukushima T., Santa T., Homma H., Imai K.: Biomed. Chromatogr. 9, 193 (1995).
- Stenberg M., Marko-Varga G., Oste R.: Food Chem. 79, 507 (2002).
- del Mar Caja López M., Blanch G. P., Herraiz M.: Anal. Chem. 76, 736 (2004).
- Csapó J., Schmidt J., Csapó-Kiss Z., Hollo G., Hollo I., Wagner L., Cenkvari E., Varga-Visi E., Pohn G., Andrassy-Baka G.: Acta Aliment. 30, 37 (2001).
- Csapó J., Csapó-Kiss Z., Stefler J., Martin T. G.,

- Neméthy S.: J. Dairy Sci. 78, 2375 (1995).
43. Brückner H., Justus J., Kirschbaum J.: Amino Acids 21, 429 (2001).
 44. Nagata Y., Fukuda A., Sakai M., Teruhito I., Kawaguchi-Nagata K.: J. Mol. Catal., B: Enzymatic 12, 109 (2001).
 45. Abe I., Nakamura K., Toyonaga T., Kobara Y., Wassa T.: Anal. Sci. 9, 775 (1993).
 46. Fitznar H. P., Lobbes J. M., Kattner G.: J. Chromatogr., A 832, 123 (1999).
 47. McCarthy M. D., Hedges J. I., Benner R.: Science 281, 231 (1998).
 48. Meyer V.: ACS Symp. Ser. 471, 217 (1991).
 49. Abe I., Yanagi H., Nakahara T.: J. High Resolut. Chromatogr. 20, 451 (1997).
 50. Pollock G. E., Cheng C. N., Cronin S. E.: Anal. Chem. 49, 2 (1977).
 51. Schwarcz H. P.: Acc. Chem. Res. 35, 637 (2002).
 52. Julg A., Lafont R., Perinet G.: Q. Sci. Rev. 6, 25 (1987).
 53. Armstrong D. W., Kullman J. P., Chen X. H., Rowe M.: Chirality 13, 153 (2001).
 54. Helfman P. M., Bada J. L.: Nature 262, 279 (1976).
 55. Man E. H., Sandhouse M. E., Burg J., Fisher G. H.: Science 220, 1407 (1983).
 56. Jung W. T., Rho S. H., Park W. C.: Ophthalmic Res. 28, 26 (1996).
 57. Montecucchi P. C., de Castiglione R., Piani S., Gozzini L., Erspamer V.: Int. J. Pept. Protein Res. 17275 (1981).
 58. Broccardo M., Erspamer V., Falconieri-Erspamer G., Improta G., Linari G., Melchiori P., Montecucchi P. C.: Br. J. Pharmacol. 73, 625 (1981).
 59. Mor A., Delfour A., Sagan S., Amiche M., Pradelles P., Rossier J., Nicolas P.: FEBS Lett. 255, 269 (1989).
 60. Kamatani Y., Minakata H., Kenny P. T., Iwashita T., Watanabe K., Funase K., Sun X. P., Yongsiri A., Kim K. H., Novales-Li P., Novales E. T., Kanapi C. G., Takeuchi H., Nomoto K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 160, 1015 (1989).
 61. Ohta N., Kubota I., Takao T., Shimonishi Y., Yasuda-Kamatani Y., Minakata H., Nomoto K., Muneoka Y., Kobayashi M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 486 (1991).
 62. Kuwada M., Teramoto T., Kumagaye K. Y., Nakajima K., Watanabe T., Kawai T., Kawakami Y., Niidome T., Sawada K., Nishizawa Y., Katayama K.: Mol. Pharmacol. 46, 587 (1994).
 63. Owen S. M., Rudolph D., Wang W., Cole A. M., Herman M. A., Waring A. J., Lehrer R. I., Lal R. B.: Pept. Res. 63, 469 (2004).
 64. Gamborg K. Z., Rekoslavskaya N. I.: Soviet Plant Physiol. 38, 904 (1992).
 65. Friedman M.: J. Agric. Food Chem. 47 3457 (1999).
 66. Davies J. S., v knize: *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins* (Weinstein B., ed.), sv. 4., str. 1. Marcel Dekker, New York 1977.
 67. Davies L. P., Johnston G. A. R.: J. Neurochem. 26, 1007 (1976).
 68. Dunlop D. S., Neidle A., McHale D., Dunlop D. M., Lajtha A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 27 (1986).
 69. Sekine M., Fukuda H., Nimura N., Furuchi T., Homma H.: Anal. Biochem. 310, 144 (2002).
 70. Todoroki N., Shibata K., Yamada T., Kera Y., Yamada R. H.: J. Chromatogr., B 728, 41 (1999).
 71. D'Aniello A., Spinelli P., De Simone A., D'Aniello S., Branno M., Aniello F., Fisher G. H., Di Fiore M. M., Rastogi R. K.: FEBS Lett. 552, 193 (2003).
 72. Neidle A., Dunlop D. S.: Life Sci. 46, 1517 (1990).
 73. Hashimoto A., Kumashiro S., Nishikawa T., Oka T., Takahashi K., Mito T., Takashima S., Doi N., Mizutani Y., Yamazaki T., Kaneko T., Ootomo E.: J. Neurochem. 61, 348 (1993).
 74. Kera Y., Watanabe T., Shibata K., Nagasaki H., Yamada R.: J. Mol. Catal., B: Enzymatic 12, 121 (2001).
 75. Hashimoto A., Oka T., Nishikawa T.: Eur. J. Neurosci. 7, 1657 (1995).
 76. Reiter R. J.: Braz. J. Med. Biol. Res. 26, 1141 (1993).
 77. Imai K., Fukushima T., Hagiwara K., Santa T.: Biomed. Chromatogr. 9, 106 (1995).
 78. Nagata Y., Homma H., Lee J.-A., Imai K.: FEBS Lett. 444, 160 (1999).
 79. Wang H., Wolosker H., Pevsner J., Snyder S. H., Selkoe D. J.: J. Endocrinol. 167, 247 (2000).
 80. D'Aniello G., Tolino A., D'Aniello A., Errico F., Fisher G. H., Fiore M. M. D.: Endocrinology 141, 3862 (2000).
 81. D'Aniello A., Fiore M. M. D., Fisher G. H., Milone A., Seleni S., D'Aniello S., Perna A. S., Ingrosso D.: FASEB J. 14, 699 (2000).
 82. Ishio S., Yamada H., Hayashi M., Yatsushiro S., Noumi T., Yamaguchi A., Moriyama Y.: Neurosci. Lett. 249, 143 (1998).
 83. Hamase K., Morikawa A., Zaitzu K.: J. Chromatogr., B 781, 73 (2002).
 84. Lim M. S. L., Gibbons W. A.: Biochem. Soc. Trans. 17, 740 (1989).
 85. Tsai G., Yang P., Chung L.-C., Lange N., Coyle J. T.: Biol. Psychiatry 44, 1081 (1998).
 86. Dunlop D. S., Neidle A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 235, 26 (1997).
 87. Brückner H., Schieber A.: Biomed. Chromatogr. 15, 257 (2001).
 88. Wolosker H., D'Aniello A., Snyder S. H.: Neuroscience 100, 183 (2000).
 89. Lee J.-A., Long Z., Nimura N., Iwatsubo T., Imai K., Homma H.: Arch. Biochem. Biophys. 385, 242 (2001).
 90. Nagata Y., Konno R., Niwa A.: Metabolism 43, 1153 (1994).
 91. Hamase K., Inoue T., Morikawa A., Konno R., Zaitzu K.: Anal. Biochem. 291, 253 (2001).

92. Konno R., Oowada T., Ozaki A., Iida T., Niwa A., Yasumura Y., Mizutani T.: *Am. J. Physiol.* 265, G699 (1993).
93. Okuma E., Abe H.: *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 191 (1994).
94. Morikawa A., Hamase K., Zaitzu K.: *Anal. Biochem.* 312, 66 (2003).
95. Ketting D., Wadman S. K., Spaapen L. J. M., Vandermeer S. B., Duran M.: *Clin. Chim. Acta* 204, 79 (1991).
96. Fukushima T., Kato M., Santa T., Imai K.: *Biomed. Chromatogr.* 9, 10 (1995).
97. D'Aniello A., Vetere A., Fisher G. H., Cusano G., Chavez M., Petrucelli L.: *Brain Res.* 592, 44 (1992).
98. Fisher G. H., Petrucelli L., Gardner C., Emory C., Frey W. H., Amaducci L., Sorbi S., Sorrentino G., Borghi M., D'Aniello A.: *Mol. Chem. Neuropathol.* 23, 115 (1994).
99. Fisher G., Lorenzo N., Abe H., Fujita E., Frey W. H., Emory C., Fiore M. M. D., D'Aniello A.: *Amino Acids* 15, 263 (1998).
100. Brückner H., Hausch M.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 614, 7 (1993).
101. Hashimoto K., Fukushima T., Shimizu E., Okada SI., Komatsu N., Okamura N., Koike K., Koizumi H., Kumakiri C., Imai K., Iyo M.: *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 385 (2004).
102. Nagata Y., Akino T., Ohno K., Kataoka Y., Ueda T., Sakurai T., Shiroshita K., Yasuda T.: *Clin. Sci.* 73, 105 (1987).
103. Imai K., Fukushima T., Santa T., Homma H., Hamase K., Sakai K., Kato M.: *Biomed. Chromatogr.* 10, 303 (1996).
104. Fujii N.: *Origins Life Evol. Biosphere* 32, 103 (2002).
105. Brückner H., Schieber A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 576 (2000).
106. Golberg S. I., Crosby J. M., Iusem N. D., Younes U. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 109, 823 (1987).
107. Keszthelyi L.: *Origins Life Evol. Biosphere* 31, 249 (2001).
108. Viedma C.: *Origins Life Evol. Biosphere* 31, 501 (2001).
109. Hitz T. H., Luisi P. L.: *Origins Life Evol. Biosphere* 34, 575 (2004).
110. Bonner W. A., Greenberg J. M., Rubenstein E.: *Origins Life Evol. Biosphere* 29, 215 (1995).
111. Bonner W. A.: *Origins Life Evol. Biosphere* 25, 175 (1995).
112. Cronin J. R., Pizzarello S.: *Science* 275, 951 (1997).
113. Bonner W. W., Greenberg J. M., Rubenstein E.: *Origins Life Evol. Biosphere* 29, 215 (1999).
114. Vandenabeele-Trambouze O., Gefard M., Bodet D., Desois M., Dobrijevic M., Grenier-Loustalot M. F., Commeyras A.: *Chirality* 14, 519 (2002).
115. Thiemann W. H. P., Meierhenrich U. J.: *Origins Life Evol. Biosphere* 31, 199 (2001).
116. Sternberg R., Szopa C.: *Anal. Chem.* 17, 481A (2002).
117. Szopa C., Meierhenrich U. J., Coscia D., Janin L., Goesmann F., Sternberg R., Brun J.-F., Israel G., Cabane M., Roll R., Raulin F., Thiemann W., Vidal-Madjar C., Rosenbauer H.: *J. Chromatogr., A* 982, 303 (2002).
118. Borchers A. T., Davis P. A., Gershwin M. E.: *Exp. Biol. Med.* 229, 21 (2004).

H. Zahradníčková^{a,c}, P. Hartvich^{a,b}, and I. Holoubek^c (^a *Laboratory of Analytical Biochemistry, Institute of Entomology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 370 05 České Budějovice*, ^b *Department of Organic and Nuclear Chemistry, Faculty of Science, Charles University, 128 43 Prague 2, Czech Republic*, ^c *Recetox, Faculty of Science, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic*): **History and Significance of Chiral Analysis of Amino Acids in Biological Matrices and Environment**

The review deals with the history and significance of chiral analysis of amino acids in physiological matrices, food and environment including the outer space since the 1930's. The review discusses the importance of D-amino acids for formation and differentiation of cells or tissues, for biological and geological dating and the origin of life on Earth and diagnostic value of D-amino acids in food control and clinical biochemistry.