

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Obsah fenylalaninu v různých druzích dýní (*Cucurbita*
spp.)**

Bakalářská práce

**Daniel Vykysalý
Výživa a potraviny**

Vedoucí práce: Ing. Zora Kotíková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Obsah fenylalaninu v různých druzích dýní (*Cucurbita* spp.)" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.04.2024

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval paní Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D., za pomoc v podobě skvělého vedení, poskytla mi rady a instrukce, bez kterých bych nebyl schopen tuto práci zdárně dokončit a této spolupráce si velmi vážím.

Obsah fenylalaninu v různých druzích dýní (*Cucurbita* spp.)

Souhrn

Vrozené poruchy metabolismu jsou poměrně frekventované dysfunkce, jež se projevují nefyziologickým fungováním procesů metabolických drah. Mezi tyto poruchy patří fenylketonurie, vada ovlivňující metabolismus aminokyselin, kterou způsobuje mutace genu kódujícího enzym fenylalaninhydroxylázu, jenž je zodpovědný za oxidaci fenylalaninu na tyrosin. Právě kvůli nedostatečné funkčnosti tohoto enzymu se u pacientů s fenylketonurií hromadí fenylalanin v krvi, což bez adekvátní léčby může vést k vážným a nevratným poškozením mozku. Nejúčinnější a trvalou léčbou je dodržování nízkobílkovinné diety s doplňováním esenciálních aminokyselin a bioaktivních látek nezbytných pro správné fungování organismu. Fenylketonurici se však i navzdory příjmu vitaminů a minerálů skrze speciální doplňky stravy potýkají s jejich nedostatečným příjmem, nemluvě o naprosté absenci některých neesenciálních ale zdraví prospěšných sloučenin při nedokonalém poskládání jídelníčku.

Dýně obsahují řadu látek, které jsou pro fenylketonuriky běžně těžko dostupné, včetně karotenoidů, minerálů a vitaminů, a jsou v České republice poměrně rozšířenou plodinou, zejména *Cucurbita maxima* Duchesne a *Cucurbita pepo* L. Pro pacienty trpící fenylketonurií by bylo začlenění dýní do jídelníčku tedy bez pochyby prospěšné. Je však obecně známo, že různé druhy ovoce a zeleniny se mohou výrazně lišit v chemickém složení, což může být pro fenylketonuriky zavádějící při přesném zaznamenávání přijatého fenylalaninu. Tabulkovaná hodnota uvádějící obsah této aminokyseliny se vztahuje pouze obecně na dýně, bez ohledu na druh.

Z tohoto důvodu bylo cílem praktické části této práce zjistit koncentrace fenylalaninu napříč šesti široce dostupnými druhy dýní na našem území. Konkrétně se jednalo o druhy: dýně muškátová Honeynut (*Cucurbita moschata* × *Cucurbita maxima*), dýně muškátová Ibiza (*Cucurbita moschata* `Ibiza`), dýně muškátová Butternut (*Cucurbita moschata* `Butternut`), dýně obecná okrasná (*Cucurbita pepo* var. *ovifera*), dýně obrovská Hokkaido Orange (*Cucurbita maxima* `Hokkaido Orange`) a dýně obrovská Hokkaido Green (*Cucurbita maxima* `Hokkaido Green`).

Pro analýzu fenylalaninu byl použita analytická metoda LC-ESI-MS/MS, která využívá kombinaci metod výhodných pro stanovení aminokyselin. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny jako průměry třech paralelních opakování a byly uváděny v mikrogramech fenylalaninu na gram sušiny dýně ($\mu\text{g Phe/g sušiny}$). Všechny tři odrůdy *Cucurbita moschata* obsahovaly vysoké koncentrace fenylalaninu v porovnání s ostatními druhy. Nejvyšší naměřená hodnota fenylalaninu byla zaznamenána u *Cucurbita moschata* × *Cucurbita maxima* ($3837 \pm 166 \mu\text{g Phe/g sušiny}$), zatímco obě *Cucurbita moschata* `Ibiza` ($3622 \pm 261 \mu\text{g Phe/g sušiny}$) a *Cucurbita moschata* `Butternut` ($3614 \pm 58,5 \mu\text{g Phe/g sušiny}$) obsahovaly o něco nižší koncentrace, které si byly vzájemně podobné. *Cucurbita pepo* var. *ovifera* ($2992 \pm 385 \mu\text{g Phe/g sušiny}$) vykazovala výrazně nižší hodnotu fenylalaninu než muškátové dýně, avšak obě *Cucurbita maxima* `Hokkaido Green` ($2535 \pm 180 \mu\text{g Phe/g sušiny}$) a *Cucurbita maxima* `Hokkaido Orange` ($2472 \pm 81,5 \mu\text{g Phe/g sušiny}$), byly prokázány jako druhy s nejnižším obsahem fenylalaninu.

Výsledky analýzy tedy ukázaly, že se koncentrace fenylalaninu může výrazně lišit mezi různými druhy dýní. Pro zařazení do jídelníčku fenylketonuriků za účelem zpestření a doplnění významných bioaktivních látek se nejvhodnějšími druhy jeví *Cucurbita maxima* `Hokkaido Green` a *Cucurbita maxima* `Hokkaido Orange`.

Klíčová slova: aminokyseliny, dieta, dýně, fenylketonurie, HPLC-MS/MS

Phenylalanine content in various pumpkin species (*Cucurbita* spp.)

Summary

Inborn errors of metabolism are relatively frequent dysfunctions, which are manifested by non-physiological functioning of metabolic pathways. These disorders include phenylketonuria, a defect affecting amino acid metabolism caused by mutations in the gene encoding the enzyme phenylalanine hydroxylase, which is responsible for oxidation of phenylalanine to tyrosine. It is because of the lack of function of this enzyme that phenylketonuria patients accumulate phenylalanine in their blood, which without adequate treatment can lead to severe and irreversible brain damage. The most effective and permanent treatment is adherence to a low-protein diet with supplementation of essential amino acids and bioactive substances necessary for proper functioning of the body. However, despite the intake of vitamins and minerals through special dietary supplements, phenylketonurics still struggle with insufficient intake of these substances, not to mention the complete absence of some non-essential but health-promoting compounds following an imperfectly structured diet.

Pumpkins contain a number of compounds that are usually not easily accessible for phenylketonurics, including carotenoids, minerals and vitamins, and are a relatively common crop in the Czech Republic, especially *Cucurbita maxima* Duchesne and *Cucurbita pepo* L. Therefore, the inclusion of pumpkins in the diet of a patient suffering from phenylketonuria would undoubtedly be beneficial. However, it is well known that different fruits and vegetables can vary considerably in chemical composition, which can be misleading for phenylketonurics when they try to accurately record the intake of phenylalanine. The tabulated value stating the content of this amino acid applies only to pumpkins in general, regardless of the species.

Therefore, the aim of the practical part of this work was to determine phenylalanine concentrations across six widely available pumpkin species in our area. Specifically, the species were: Honeynut (*Cucurbita moschata* × *Cucurbita maxima*), Ibiza (*Cucurbita moschata* `Ibiza`), Butternut (*Cucurbita moschata* `Butternut`), ornamental (*Cucurbita pepo* var. *ovifera*), Hokkaido Orange (*Cucurbita maxima* `Hokkaido Orange`) and Hokkaido Green (*Cucurbita maxima* `Hokkaido Green`).

For the analysis of phenylalanine, the LC-ESI-MS/MS analytical method was used, which uses a combination of methods advantageous for the determination of amino acids. The measured values were expressed as averages of three parallel replicates and were reported in micrograms of phenylalanine per gram of pumpkin dry matter ($\mu\text{g Phe/g dry matter}$). All three *Cucurbita moschata* varieties contained high concentrations of phenylalanine compared to the other species. The highest measured phenylalanine value was recorded for *Cucurbita moschata* × *Cucurbita maxima* ($3837 \pm 166 \mu\text{g Phe/g dry weight}$), while both *Cucurbita moschata* `Ibiza` ($3622 \pm 261 \mu\text{g Phe/g dry weight}$) and *Cucurbita moschata* `Butternut` ($3614 \pm 58.5 \mu\text{g Phe/g dry weight}$) contained slightly lower concentrations, which were mutually similar. *Cucurbita pepo* ($2992 \pm 385 \mu\text{g Phe/g dry weight}$) showed significantly lower phenylalanine levels than the butternut squashes, but both *Cucurbita maxima* `Hokkaido Green`

(2535 ± 180 $\mu\text{g Phe/g dry weight}$) and *Cucurbita maxima* `Hokkaido Orange` (2472 ± 81.5 $\mu\text{g Phe/g dry weight}$) proved to be the species with the lowest phenylalanine content.

The results of the analysis thus showed that the phenylalanine concentration can vary significantly between different pumpkin species. *Cucurbita maxima* `Hokkaido Green` and *Cucurbita maxima* `Hokkaido Orange` appear to be the most suitable species to include in the diet of phenylketonurics to diversify and supplement important bioactive compounds.

Keywords: amino acids, diet, pumpkin, phenylketonuria, HPLC-MS/MS

Obsah

1 Úvod	9
2 Cíl práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Vrozené metabolické poruchy (VMP)	11
3.1.1 Anamnéza a genetika VMP	11
3.1.2 Rozdělení VMP	12
3.1.3 Léčba VMP	13
3.2 Fenyketonurie	13
3.2.1 Fenylalanin	14
3.2.2 Fenyalaninhydroxyláza (PAH)	14
3.2.3 Dopady neléčené PKU na organismus.....	15
3.2.4 Léčba.....	16
3.3 Strava průměrného fenyketonurika	17
3.3.1 Monitorování koncentrací Phe.....	18
3.3.2 Nutriční charakteristiky nízkobílkovinné diety	18
3.4 Nutriční hodnoty a benefity dýní	19
3.5 Metody stanovení aminokyselin v potravinách	20
3.5.1 Kapalinová chromatografie/elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (LC-ESI-MS/MS).....	22
4 Metodika	23
4.1 Rostlinný materiál	23
4.2 Použité chemikálie	23
4.3 Použité přístroje	23
4.4 Příprava vzorku	23
4.5 LC-ESI-MS/MS analýza aminokyselin/fenylalaninu	24
4.5.1 HPLC podmínky separace	24
4.5.2 Podmínky ve zdroji detektoru	24
4.5.3 Detekční parametry fenylalaninu.....	24
5 Výsledky	25
6 Diskuze	26
7 Závěr	27
8 Literatura	28

1 Úvod

Sledování obsahu fenylalaninu patřícího mezi esenciální aminokyseliny (kvůli neschopnosti našeho organismu si tuto nepostradatelnou látku syntetizovat) v potravinách je velmi důležité pro jedince, kteří trpí dědičnou metabolickou poruchou zvanou fenylketonurie. Tato vada je způsobena mutací genu strukturujícího enzym fenylalaninhydroxylázu. Tento enzym je zodpovědný za, jak jméno napovídá, oxidaci fenylalaninu v rámci lidského metabolismu aminokyselin, což má při nedodržování přísné diety sledující denní příjem fenylalaninu v potravě za následek jeho zvýšené hladiny v krvi, jež při přetrvávající nadlimitní hodnotě vedou až k závažným a nevratným mentálním postižením.

Pro zjištění obsahu fenylalaninu v potravě používají jedinci trpící touto poruchou metabolismu buďto speciální tabulky, nebo jednoduchý přepočít vycházející ze skutečnosti udávající, že 1 g bílkovin obsahuje přibližně 40–50 mg fenylalaninu. Hodnoty získané těmito způsoby ale nemusí být vždy přesné, zejména pro ovoce či zeleninu s rozmanitou škálou odrůd, jelikož nutriční hodnoty těchto potravin, včetně obsahu fenylalaninu, jsou tabulkovány obecně pro dané ovoce/zeleninu a přesné hodnoty fenylalaninu jednotlivých druhů nejsou běžně dostupné pro veřejnost. Pro to je zde samozřejmě logické ospravedlnění díky faktu, že ve většině případů by byly rozdíly tak zanedbatelné, že by nehrály žádnou roli jak pro průměrného člověka, tak ani pro pacienta s fenylketonurií. Jsou ale také výjimky, a je zde důvod věřit tomu, že dýně mohou být jednou z nich. Když vezmeme v potaz jejich nadstandartní flexibilitu v kulinářské úpravě a bohatý obsah vitaminů, vlákniny, draslíku a antioxidantů, nabízí se solidní argument pro důkladnější analýzu obsahu fenylalaninu v různých na našem území běžně dostupných druzích, jak pro účel potenciálního rozšíření lidských vědomostí, tak pro přesnější zařazení této zeleniny do jídelníčku průměrného jedince trpícího fenylketonurií.

2 Cíl práce

Na základě dosavadních ověřených poznatků osvětlit podstatu geneticky dědičné poruchy metabolismu zvané fenylketonurie, charakterizovat stravu průměrného fenylketonurika a prozkoumat vhodnost zařazení dýní do jídelníčku pacienta trpícího touto poruchou, popřípadě zjistit výhody konzumace dýní z hlediska doplnění ostatních pro organismus významných látek, které přirozeně fenylketonurici přijímají v nedostatečné míře. Praktickým cílem práce bude stanovit obsah fenylalaninu v různých druzích dýní běžně dostupných na českém trhu. Na základě získaných výsledků poté vybrat druhy vhodné pro zařazení do jídelníčku fenylketonuriků.

3 Literární rešerše

3.1 Vrozené metabolické poruchy (VMP)

Vrozené vady biochemických procesů našeho organismu způsobují metabolické nemoci, které jsou heterogenní skupinou poruch, jež mohou být geneticky přenesené z generace na generaci nebo mohou vznikat zapříčiněním spontánních alelických mutací. Tato onemocnění pod sebou zahrnují dysfunkci procesů metabolických drah, které se v lidském organismu podílejí na odbourávání nebo ukládání sacharidů, ne/nasycených mastných kyselin a proteinů (Jeanmonod et al. 2023).

Standartně je jejich důsledkem nedostatečná aktivita jednoho nebo více specifických enzymů nebo porucha transportu proteinů. Na mitochondriálním metabolismu mastných kyselin se dokonce podílí nejméně 25 enzymů a specifických transportních proteinů a u mnoha z nich byly objeveny genetické vady (Vockley 2008).

Mezi hlavní metabolické dráhy včetně těch spadajících pod zmíněný mitochondriální metabolismus nasycených a nenasycených organických kyselin se řadí syntéza mastných kyselin, β -oxidace, glukoneogeneze, glykolýza, cyklus kyseliny citronové a močovinový cyklus. Tyto dráhy se vzájemně protínají, a tudíž vrozená vada, která zasahuje jednu z nich, může nepřímo ale závažně ovlivnit jinou, na počáteční pohled vzdáleně působící dráhu (Reeds et al. 1997).

3.1.1 Anamnéza a genetika VMP

V roce 1904 definoval doktor Archibald E. Garrod nemoc alkaptonurii, kterou kategorizoval jako celoživotní vrozenou biochemickou alteraci organismu. Později, v roce 1909, popsal další onemocnění zahrnující albinismus, cystinurii, porfyrii a pentosurii, jež nazval vrozenými vadami metabolismu. Garrodovy závěry byly zcela korektní v navázání ke genetickému původu metabolických poruch a konceptu vazby mezi genem a enzymem.

Individuálně jsou VMP vnímány jako vzácné, ale při pohledu na jejich celkový kumulativní výskyt, který se rovná jednomu z 5000 narozených jedinců, zjistíme, že jsou poměrně vysoce frekventované.

Většina VMP se dědí autozomálně recesivním způsobem, tzn. že pro projevení vady musí být jedinec recesivním homozygotem, a tedy od obou rodičů musí přijmout recesivní alelu daného genu. Pravděpodobnost realizace této skutečnosti pro pár heterozygotních rodičů (tzv. přenašečů) je 25 %. Některá onemocnění jsou však vázána na pohlavní chromozom X, a tudíž je matka nositelkou mutace, přičemž riziko vady u každého těhotenství je u této varianty 50 % pro muže a 50 % pro ženy. Vedle toho existují i dysfunkce podmíněné mutacemi v mitochondriální DNA, u nichž je hrozba projevu prakticky 100 % pro potomky obou pohlaví (Martins 1999).

U pacientů se závažnými vadami metabolismu sacharidů (z nichž jsou nejrozšířenější poruchy ukládání glykogenu, dědičná intolerace fruktózy a galaktosemie) se příznaky projevují velmi brzy (obvykle v novorozeneckém období) a fatálně. Klinické projevy mohou být podobné jako u novorozenců se sepsí, včetně nízké hladiny krevního cukru, pomalých nebo rychlých srdečních dysrytmií, nízké tělesné teploty nebo extrémně vysoké horečky, záchvatů a

slabého svalového napětí. Tato skupina dětí není schopna přeměnit potravu na energii a při vážném raném postižení je prognóza nepříznivá.

U pacientů trpících kritickými defekty spojenými s vylučovacími cestami se typicky projeví intoxikace, které zahrnují apatii, změny v mentálním stavu, epileptické záchvaty, zvracení a poruchy životně důležitých funkcí. Hodnoty amoniaku a jiných metabolických produktů jsou v jejich případě často nad standardními hodnotami.

Pacienti vyznačující se chybami v biochemických drahách ovlivňujících využití uskladněné energie, se mohou při stálém příjmu sacharidů jevit dlouhodobě bez příznaků a zdát se zdraví. Nicméně, pokud takové dítě trpí gastrointestinálními problémy, nebo dojde ke změně v jeho stravovacích návycích, nebo se vzdá nočního krmení, může se objevit nedostatek energie, což se projeví nízkou hladinou krevního cukru či záchvaty. U těchto dětí je pravděpodobný výskyt onemocnění, které se na první pohled zdá mírné a krátkodobé, avšak jejich celkový zdravotní stav může být vážný.

Přestože se všechny tyto projevy vzájemně odlišují podle specifického stupně a druhu enzymatické poruchy, VMP se vyznačují několika obecnými charakteristikami. Nejběžnějšími symptomy těchto chorob jsou neurologické problémy, které se vyskytují přibližně u 80 % postižených jedinců. Tyto abnormality zahrnují opoždění vývoje, regresi ve vývoji, snížení svalového napětí, obtíže se sáním a záchvaty. Na druhém místě stojí gastrointestinální příznaky jako zvracení, zvětšení jater, potravinová intolerance, průjem, nechut k jídlu, odpor k pohybu a dehydratace. Více než polovina dětí trpí jak neurologickými, tak gastrointestinálními problémy. VMP by měly být zvažovány v diferenciální diagnostice každého novorozence s neurologickými a/nebo gastrointestinálními nálezy. U dětí s poruchami růstu, opakovanými potížemi s příjmem potravy, změnami výživy, refluxem, gastroparézou, autonomními dysfunkcemi nebo problémy s chováním a učením, by měla být brána v potaz možnost VMP (Ezgu 2016; Guerrero et al. 2019; Jeanmonod et al. 2023).

3.1.2 Rozdělení VMP

Vzhledem k výraznému zlepšení léčby je stále důležitější, aby lékaři první linie přešli přehlédnutí léčitelné vady provedením jednoduché metody klinického screeningu, zejména na pohotovosti. Pomocí zjednodušené klasifikace léčitelných poruch metabolismu je můžeme členit do tří skupin.

První skupina se týká vrozených poruch intermediárního metabolismu, které mohou vést k akutní nebo dlouhodobé intoxikaci. Radíme sem vady metabolismu aminokyselin, organické acidurie, poruchy cyklu močoviny a metabolismu kovů, nesnášenlivost sacharidů a porfyrie. Klinické projevy mohou být akutní nebo systémové, mohou postihovat určitý orgán a mohou se projevit v novorozeneckém období nebo později a s přestávkami od kojeneckého věku až do pozdní dospělosti. Většina těchto vad je léčitelná pomocí speciálních diet, speciálních doplňků stravy, mimotělních postupů, detoxikačních léčiv nebo vitaminů.

Druhá skupina zahrnuje takové poruchy intermediárního metabolismu, které ovlivňují energetické procesy v cytoplazmě a mitochondriích. Cytoplazmatické poruchy, jež jsou neléčitelné, zahrnují defekty ovlivňující glykolýzu, glykogenózu, glukoneogenezi, hyperinzulinismus a kreatinovou a pentózofosfátovou dráhu. Mezi mitochondriální defekty se

řadí poruchy dýchacího řetězce, Krebsova cyklu a oxidace pyruvátu, které jsou většinou neléčitelné, a poruchy oxidace mastných kyselin a ketolátek, které jsou léčitelné.

Třetí skupina je zaměřena na buněčné organely a zahrnuje lysozomální a peroxizomální poruchy, defekty glykosylace a syntézy cholesterolu. Z nich jsou některé lysozomální vady léčitelné pomocí enzymové substituce nebo terapie snižující akumulaci substrátů (Roe & Mochel 2006; Saudubray et al. 2006).

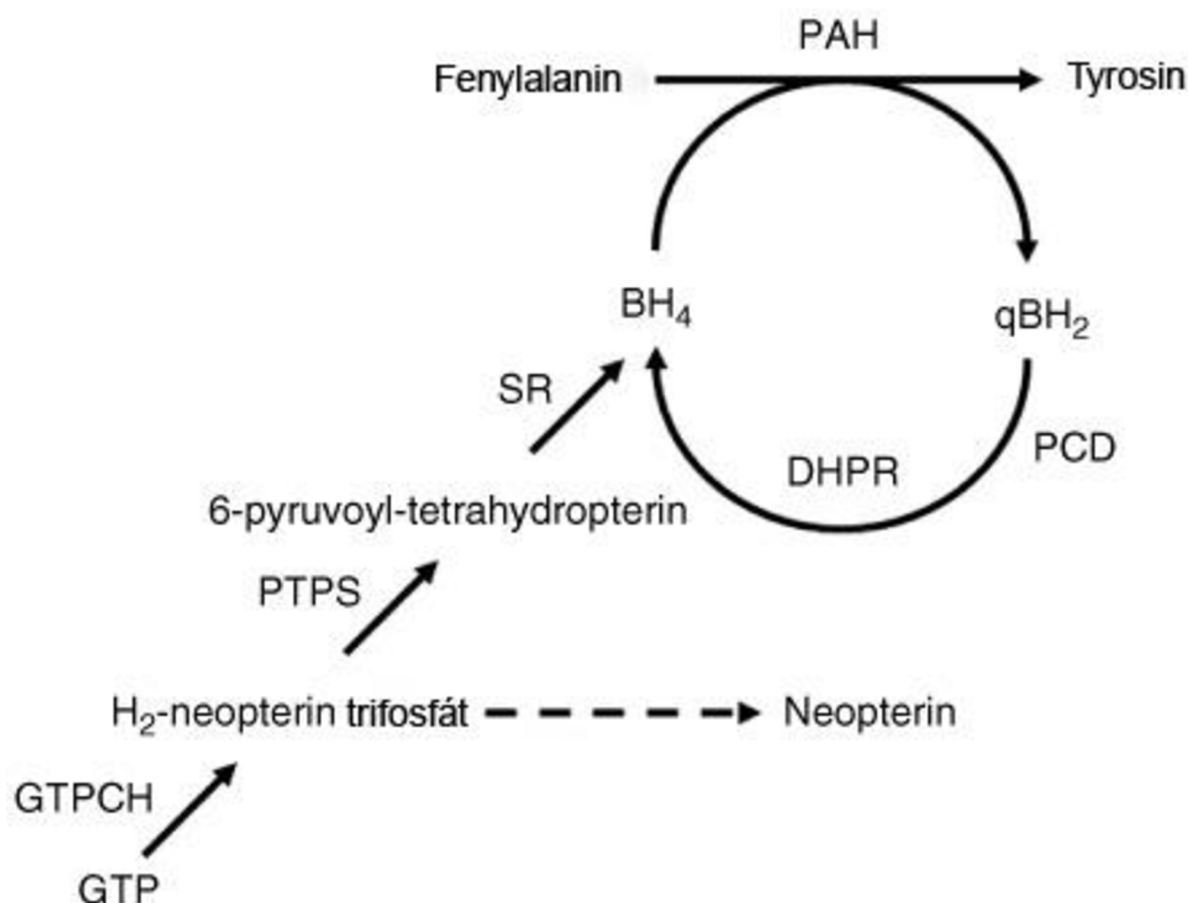
3.1.3 Léčba VMP

Základním patofyziologickým mechanismem u VMP je nerovnováha mezi substrátem a produktem, tradičními způsoby snížení akumulace substrátu a jeho alternativních metabolitů jsou v dnešní době dietní restriktce, terapie zaměřená na redukci substrátu a odstranění toxinů. Redukce substrátu má často za následek potřebu suplementovat produkt pro správnou buněčnou funkci. Vzhledem k tomu, že příčinou problému bývá absence nebo nedostatečná funkce enzymu, kofaktoru nebo transportéru, je obnovení těchto proteinů nebo kofaktorů vnímáno jako logický přístup. K nahrazení nebo zvýšení aktivity enzymů se používá enzymová substituční terapie (ERT), transplantace buněk/orgánů, doplnění kofaktorů a chaperonová terapie. Genová terapie, která je spíše lékem než léčbou, může poskytnout neomezený přísun chybějícího proteinu a v této oblasti bylo dosaženo významných pokroků. Díky pokrokům v oblasti včasné detekce novorozeneckým screeningem a sekvencování celého genomu lze pacientům poskytnout včasnou léčbu ještě před nástupem projevů vady a dosáhnout tak optimálního výsledku. U některých VMP zvyšují kombinované způsoby léčby terapeutickou účinnost. Stále je zapotřebí dalšího výzkumu patofyziologie vad, kombinovaných terapií a optimálního načasování léčby (Gambello & Li 2018).

3.2 Fenyلكetonurie

Fenyلكetonurie (známá také jako Follingova nemoc nebo PKU) je autozomálně recesivní vrozená vada metabolismu, tzn. že se projeví pouze u jedinců s recesivně homozygotní sestavou genu spojeného s touto poruchou, a tudíž heterozygotní jedinci neprojevují žádné příznaky a označují se jako tzv. "přenašeči", jelikož jsou zcela zdraví, ale mohou vadu přenést na potomky v případě početí dítěte s partnerem, který je též přenašečem (šance na nemocného potomka je 25 %) (Martins 1999).

Tato porucha je způsobena patogenetickými variantami genu zodpovědného za tvorbu enzymu fenylalaninhydroxylázy (PAH – EC 1.14.16.1). Funkce PAH spočívá v přeměně aminokyseliny fenylalaninu (Phe) na aminokyselinu tyrosin (Tyr) pomocí reakce, která vyžaduje kosubstrát tetrahydrobiopterin (BH4) (viz obrázek č. 1), u kterého je důležité zmínit, že může působit jako chaperon (speciální protein pomáhající skládat bílkoviny do správného prostorového uspořádání v buňce), který usnadňuje správné skládání monomeru, stejně jako kochaperon DNAJC12, a v důsledku toho je v malém počtu případů hyperfenylalaninemie (HPA – zvýšená hladina fenylalaninu v krvi) způsobena defektem metabolismu BH4 nebo patogenetickými variantami DNAJC12. HPA je základní biochemickou abnormalitou fenyلكetonurie, při níž jsou překročeny fyziologické koncentrace Phe v krvi (35-120 $\mu\text{mol/l}$) (Anikster et al. 2017; van Spronsen et al. 2021).



Obrázek č. 1: Přeměna fenylalaninu na tyrosin za přítomnosti kofaktoru tetrahydrobiopterinu (upraveno dle https://www.researchgate.net/figure/The-hepatic-phenylalanine-hydroxylating-system-The-tetrahydrobiopterin-BH4-cofactor_fig8_5489321)

3.2.1 Fenylalanin

Phe je jednou z devíti esenciálních aminokyselin, které jsou pro lidskou stravu nezbytné, neboť náš organismus není schopen je syntetizovat na rozdíl od ostatních aminokyselin. V lidském těle je část stravy přijatého Phe hydroxylací přeměněna na Tyr. Poměr přijatého Phe a Tyr je díky tomuto procesu ideální pro zdravé jedince, a nemusí tak vyhledávat samotný Tyr ve stravě (z toho důvodu není Tyr esenciální aminokyselinou), ale pro jedince s PKU, jež postrádají potřebný enzym PAH, vznikají komplikace se zvýšenými hladinami Phe v krvi a nedostatečnými koncentracemi Tyr. Z toho důvodu musí omezit příjem Phe ze stravy a navýšit příjem ostatních esenciálních aminokyselin a Tyr pomocí speciálních výživových doplňků (Matthews 2007).

3.2.2 Fenylalaninhydroxyláza (PAH)

PAH katalyzuje přeměnu Phe na Tyr para-hydroxylací aromatického postranního řetězce. U savců je tato reakce vyžadující BH₄ počátečním a rychlost limitujícím krokem při odbourávání přebytečného Phe z bílkovin přijatých stravy, kdy je Tyr dále odbouráván na produkty zapojující se do citrátového cyklu. Pro organismy vybavené PAH je Tyr tedy neesenciální aminokyselinou a je využíván k syntéze bílkovin nebo jako prekurzor

neurotransmitterů a dalších jeho derivátů. PAH je přítomna především v játrech, kde odstranění přebytečného Phe zabraňuje negativnímu neurotoxickému účinku, který může být způsoben jeho zvýšenou koncentrací v krvi. Phe je však také esenciální aminokyselinou a je důležité předejít tomu, aby byl plně katabolizovaný. Aby bylo možné zachovat dostatek Phe i při odstraňování jeho přebytečných koncentrací, musela se savčí PAH vyvinout a získat tak regulační mechanismy a specifickou strukturu, která umožňuje uplatnění regulačních procesů. PAH je kromě savců přítomna také v jiných eukaryotních organismech a v některých bakteriích, a pro tyto organismy má i významnou anabolickou funkci, kdy přispívá k syntéze pigmentů melaninového typu (Fitzpatrick 2000; Arias Barrau et al. 2004; Flydal & Martinez 2013).

Stejně jako ostatní hydroxylázy aromatických aminokyselin (HAA) katalyzuje PAH hydroxylaci svého substrátu začleněním jednoho atomu kyslíku do aromatického jádra a finální reakce zahrnuje také redukci druhého atomu kyslíku na vodu za využití dvou elektronů dodaných BH₄, který je rovněž hydroxylován na pterin-4a-karbinolamin (4a-OH-BH₄) s následnou disociací od enzymu. Dehydrataci a redukci 4a-OH-BH₄ zpět na BH₄ postupně katalyzuje pterin-karbinolamin-dehydratasa (PCD – EC 4.2.1.96), která dehydratuje 4a-OH-BH₄ na dihydrobiopterin-chinonoid (q-BH₂), respektive na NADH vyžadující dihydropteridin-reduktasu (DHPR – EC 1.5.1.34) (viz obrázek č. 1). Z toho důvodu jsou tyto dva enzymy považovány za součást systému PAH, což se promítá na citlivé povaze fyziologické degradace Phe, jelikož může být ovlivněna defekty v několika genech (Werner et al. 2011).

HAA sdílejí požadavek na katalytické nehemové železo, BH₄ jako kofaktor a molekulární kyslík jako dodatečný substrát. Geny savců kódují PAH, tyrosinhydroxylázu (TH – EC 1.14.16.2) a dvě tryptofanhydroxylázy (TPH1 – EC 1.14.16.4; TPH2 – EC 1.14.16.9), které jsou pojmenovány podle svých specifických aminokyselinových substrátů. Produkt TH L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) a produkt TPH 5-hydroxytryptofan (5-HTP) jsou prekurzory důležitých neurotransmitterů a hormonů. HAA mají velice identické aminokyselinové sekvence, podobnou strukturu a předpokládaný katalytický mechanismus. PAH je jedinou HAA nalezenou u bakterií a bylo i navrženo, že bakteriální PAH a preferát dehydratáza jsou předchůdci vícedoménových HAA. Označení PAH jako předchůdce v rodině HAA je rozumné, jelikož funkce TP a TPH budou mít pravděpodobně stále větší význam ve vícebuněčných organismech (Fitzpatrick 2000; Gjetting et al. 2001; Olsson et al. 2010; Flydal & Martinez 2013; Fitzpatrick 2015).

3.2.3 Dopady neléčené PKU na organismus

Phe ve vyšších hladinách v krvi působí na mozek a způsobuje jeho závažné poškození, zejména u vyvíjejících se dětí a dospívajících. Přesná podstata mechanismů, které to zapříčiňují, není stále dokonale pochopena, ale je zřejmé, že efekty Phe na centrální nervový systém jsou úměrné jeho hladinám a stádiu růstu a vývoje mozku závislého na věku jedince. Z toho, co je známo, můžeme však určit jaké biochemické procesy jsou s největší pravděpodobností negativně ovlivněny a způsobují některé problémy doprovázející neléčenou PKU.

Jedním z těchto procesů je přechod esenciálních aminokyselin z krve do mozku přes hematoencefalickou bariéru, kde hrají roli proteinové transportéry, jež mají vysokou afinitu vůči Phe. Při jeho vysokých koncentracích v krvi způsobených jeho nedostatečným štěpením se jím nasytí, což má za následek jeho hromadění v mozku, kde svojí přímou toxicitou ovlivňuje

přenos nervového vzruchu působením na spoje mezi neurony (synapse). Dalším důsledkem nasycení proteinových transportérů Phe je snížená dostupnost mozkového tryptofanu a Tyr, a tedy limitovaná syntéza neurotransmiterů serotoninu a dopaminu, která vede k poruchám kognitivních funkcí (učení, paměť, řešení problémů), poklesům nálady a motivace a změnám v chování.

Phe také inhibuje syntézu cholesterolu, důležitých mozkových proteinů včetně myelinu a enzymů hrajících roli v zásadních biochemických procesech, jako je například pyruvátkináza, jež je klíčová pro anaerobní glykolýzu a její inhibice Phe vede k poruše energetického metabolismu mozku a abnormálnímu metabolismu glukózy během diferenciaci mozku (van Spronsen et al. 2009b; van Spronsen 2010; Rovelli & Longo 2023; van Spronsen et al. 2023).

3.2.4 Léčba

Standartní léčba pro pacienty s PKU spočívá v dodržování speciální nízkobílkovinné diety, při které jsou podávány syntetické preparáty, jež obsahují všechny esenciální aminokyseliny kromě Phe, důležité vitaminy a minerály, které fenylketonurici nemohou obdržet v každodenní stravě, kvůli omezenému jídelníčku.

Přestože klinické výsledky jsou při této dietě dobré, je dnes již známo, že u pacientů s PKU existují neuropsychologické deficity, a že je zde pravděpodobně prostor pro zlepšení kvality života, nutričního stavu a psychosociálních výsledků. Potřeba nových terapeutických přístupů je prozatím uspokojována suplementací BH4 nebo esenciálními aminokyselinami, ve vzdálenější budoucnosti se jeví velmi nadějně vývoj v oblasti využití fenylalanin amoniakální lyázy, genové terapie a terapie chaperony (van Spronsen 2010; Rovelli & Longo 2023).

BH4 je přirozeným kofaktorem enzymu PAH. Jeho nedostatek vede nejen k dysfunkci PAH (a tedy k hyperfenylalaninemii), ale také k narušení funkce tyrosinových a tryptofanových hydroxyláz v mozku, což se projevuje velmi závažnými deficity neurotransmiterů spojenými s nedostatkem BH4 u různých syndromů.

Teprve Kure et al. (1999) uvádí, že u některých pacientů s mutacemi v genu, který kóduje PAH, mohou farmakologické dávky BH4 (20 mg/kg) snížit hladinu fenylalaninu v krvi. Následně bylo dospěno k závěru, že 10 až 60 % pacientů s deficitem enzymu PAH reaguje na BH4 v závislosti na lišících se mutacích převažujících v různých populacích (Bélanger-Quintana et al. 2011).

Ne všichni pacienti s deficitem PAH reagují na BH4 a u těch, kteří reagují, je rozsah reakce jejich organismu velmi široký, proto se k posouzení, zda by pacient měl z podávání BH4 prospěch, používá perorální zkouška.

Obecně platí, že jedinci s mírnějším fenotypem mají vyšší míru odezvy na BH4 než ti s nízkou tolerancí na Phe. Bylo dokázáno působení BH4 jako molekulárního chaperonu díky jeho funkci zvyšovat stabilitu PAH proteinů s částečně chybným složením. Touto schopností navyšuje efektivní intercelulární koncentraci funkčního enzymu PAH. Je tedy zřejmé, že aby pacient reagoval na BH4, musí mít v játrech přirozeně přítomno dostatečné množství zbytkového proteinu PAH, který s BH4 může interagovat. To vysvětluje, proč pacienti s mírnějšími formami a mutacemi mají větší pravděpodobnost odpovědi než pacienti se závažnými mutacemi (Kure et al. 1999; Strisciuglio & Concolino 2014).

Alternativně lze využít suplementaci jiné esenciální aminokyseliny (EA) než je Phe. Tato EA může kompetitivně inhibovat transport Phe přes gastrointestinální a hematoencefalickou bariéru a snížit tak absorpci Phe a jeho koncentraci v mozku. Strisciuglio a Concolino (2014) uvádí, že kontrolovaná placebo studie ukázala významný pokles koncentrace Phe v krvi u pacientů s PKU, jimž byla EA podávána po dobu 2 týdnů, což naznačuje, že EA opravdu konkuruje transportu Phe v gastrointestinálním traktu, z čehož vyplývá existence možnosti snížení hladiny Phe v krvi u jedinců trpících PKU podáním EA ve stravě. Opět se zde objevují rozdíly ve výsledcích, které mohou souviset se složením, způsobem podávání a délkou suplementace. Důkazy pro dostačující podložení účinnosti suplementace EA k významnému snížení fenylalaninemie jsou zatím omezené. Závěrem lze konstatovat, že podávání EA samostatně, nebo v kombinaci s dietou omezující příjem Phe ve stravě zlepšuje zdravotní výsledky u jedinců, jež nejsou schopni dostatečně omezit příjem Phe ve stravě. Je však stále zapotřebí dlouhodobých studií, aby bylo možné dojít k jasnému závěru potvrzujícímu účinnost a bezpečnost suplementace EA (van Spronsen 2010; Strisciuglio & Concolino 2014).

Objevení enzymu fenylalanin amoniak lyázy (PAL – EC 4.3.1.24) bylo možné díky zvědavosti rostlinných fyziologů zkoumajících původ ligninu (polymer podílející se na tuhosti rostlin). Dozvěděli se, že rozhodujícím prvkem této syntézy je intermediární enzym, jenž deaminuje Phe na kyselinu skořicovou a amoniak (později pojmenovaný PAL). Objev enzymu s touto schopností vedlo k následným úvahám o jeho využití v léčbě PKU. Podávání extrahovaného enzymu vykazovalo však minimální účinnost. Pro další vývoj léčby bylo zapotřebí úspěšné klonování pro získání dostatečného množství enzymu, testování *in vitro* a modifikace proteinu, aby bylo možné tento pro savce nepřirozený enzym podávat parenterálně. Dlouholetá snaha vědců měla zdárný závěr, neboť v květnu roku 2018 byla pod jménem "Palynziq" v USA schválena enzymová terapie využívající modifikovanou PAL pro léčbu PKU (Bélanger-Quintana et al. 2011; Levy et al. 2018).

Genové terapie s cílem přímo obnovit aktivitu PAH v játrech jsou aktivní oblastí výzkumu se světlou budoucností. PAH-mRNA (messenger ribonukleová kyselina) dodávaná lipidovými nanočásticemi vykazuje velmi slibné výsledky u testů na zvířatech, ale zatím nebyla otestována na lidech. Klinické studie na lidech ale probíhají u jiných VMP ovlivňujících metabolismus v játrech. Také probíhají klinické studie terapie založené na principu adice genu zprostředkované rekombinantními adenoasociovanými viry u dospělých, u kterých se netrpělivě očekává zveřejnění definitivních výsledků. Tato terapie však nezajistí stabilní expresi genu u mladistvých a není jistá ani dlouhodobá stabilita u dospělých. Z toho důvodu se zkoumají metody trvalé genové korekce nebo adice genu. Aby většina strategií genové modifikace dosáhla terapeutické relevance, bude nutné použít metody, které navýší počáteční frekvenci genové modifikace nebo zajistí selektivní růstovou výhodu pro korigované jaterní buňky (Martinez et al. 2023).

3.3 Strava průměrného fenylketonurika

Do dnešního dne přetrvávající způsob léčby obnáší omezení bílkovin přirozeně se vyskytujících ve stravě, konzumaci speciálních léčebných potravin s nízkým obsahem Phe a užívání směsí aminokyselin, které neobsahují Phe a jsou obohacené o vitaminy a minerály (Manta-Vogli & Schulpis 2018).

Cílem dietního managementu je dosáhnout plazmatických hladin Phe v doporučených koncentracích, zabránit mentální retardaci a zároveň udržet adekvátní výživu pro normální fyzický růst, neurokognitivní vývoj a dobrý zdravotní stav v dospělosti. Spousta problémů spojených s dietní léčbou byla v minulosti způsobena špatnou chutností léčebných potravin (Giovannini et al. 2012; Manta-Vogli & Schulpis 2018).

3.3.1 Monitorování koncentrací Phe

Ke správnému nastavení jídelníčku je nutné časté monitorování plazmatických koncentrací Phe a Tyr v závislosti na příjmu Phe, které se standardně provádí za pomoci tří denního záznamu přijaté potravy, po kterém následuje odběr krve. U dětí procházejících intenzivním růstem a vývojem organismu jsou potřebné hladiny Phe vysoké v poměru k tělesné hmotnosti a poté se snižují společně s klesající intenzitou růstu. Přijatý Phe by měl udržovat své plazmatické koncentrace v doporučeném rozmezí 2 až 4 hodiny po jídle. V kojeneckém věku může být zapotřebí upravovat doporučené hladiny Phe každý týden, v závislosti na růstu a hodnocení plazmatických koncentrací Phe. Za normálních okolností se přijatý Phe stanovuje jednou až dvakrát měsíčně, standardně je zapotřebí návštěva nemocnice či zaslání usušeného vzorku krve odebraného v pacientově domově (van Spronsen et al. 2009a; MacLeod & Ney 2010; Wada et al. 2023).

Ke zvýšení koncentrace Phe může dojít z různých důvodů. Častou příčinou u dětí a dospívajících, kteří se potýkají s komplikacemi spojenými s dodržováním diety, je nadměrný příjem Phe skrz bílkoviny přítomné ve stravě. Na druhou stranu nedostatečný příjem Phe, bílkovin nebo celkové energie potřebné k podpoře růstu může rovněž vést ke zvýšeným hladinám plazmatické koncentrace Phe v důsledku katabolismu vlastních bílkovin a tím způsobenému uvolňování Phe do krve. U žen může dojít ke změnám plazmatických hladin Phe během menstruačního cyklu, kdy se vyšší hladiny vyskytují v pozdní luteální fázi. Infekční onemocnění nebo trauma také vyvolávají katabolismus bílkovin, z toho důvodu je nezbytná okamžitá léčba, která zabráni katabolismu bílkovin prostřednictvím přidání dodatečných sacharidů do perorálních rehydratačních roztoků, jež jsou poté po celý den popíjeny, za účelem poskytnutí zdroje energie neobsahujícího Phe. U osob, které nezvládnou tolerovat dlouhodobé perorální podávání, může být nutné enterální podávání aminokyselinového přípravku s nízkým obsahem Phe, jež jim dodá energii, elektrolyty a esenciální aminokyseliny (MacLeod & Ney 2010).

3.3.2 Nutriční charakteristiky nízkobílkovinné diety

Omezení fenylyalaninu ve stravě zůstává primární metodou léčby PKU a standardně se uplatňuje ihned po potvrzení dysfunkce fenylyalaninhydroxylázy u novorozence. Pacienti s PKU se musí vyhýbat potravinám bohatým na bílkoviny (maso, ryby, vejce, běžné pečivo, mléčné výrobky, ořechy a semena) a potravinám i nápojům obsahujícím aspartam (syntetický dipeptid vznikající reakcí kyseliny L-asparagové s methylesterem L-fenylyalaninu, využívá se jako umělé sladidlo v potravinách, lécích a nápojích). Do problematických potravin spadají také mouka, sója, pivo nebo smetanové likéry. Proto je strava při této dietě tvořena především potravinami, jež přirozeně obsahují nízký obsah bílkovin a poskytnou tedy požadovaný přísun Phe nezbytný pro růstové procesy. Nízkobílkovinné varianty některých potravin jsou komerčně dostupné,

např. nízkobílkovinný chléb nebo nízkobílkovinné těstoviny. Množství povolených přirozených potravin se vypočítává metodou ekvivalentu Phe na hmotnost porce. Potřebné množství bílkovin se získává z bílkovinných náhražek bez Phe, které poskytují esenciální aminokyseliny ve vhodném poměru (Giovannini et al. 2012; Choudhary & Pretorius 2017).

Tento dietní režim neposkytuje dostatečný příjem nasycených a polynenasycených tuků, cholesterolu, karnitinu, taurinu, železa, zinku, selenu, vápníku, folátů a vitaminů (A, C, D, E, B12, B2, B6), a to z důvodu velmi nízkého příjmu živočišných potravin obsahujících Phe a nadprůměrného příjmu sacharidů. Proto panuje obecná shoda, že pacienti s PKU potřebují dlouhodobé dietní poradenství a každodenní suplementaci mikronutrienty. Dieta při PKU je nastavována spíše opatrně pro prevenci kardiovaskulárních poruch. Konkrétněji nasycené tuky mohou tvořit méně než 7 % a polynenasycené více jak 5 % celkové energie s denním příjmem cholesterolu pohybujícím se pod hranicí 50 mg. Děti s PKU vskutku vykazují nižší hladiny cholesterolu v plazmě v porovnání se zdravými dětmi, zejména lipoproteinů o nízké hustotě (LDL). Nicméně jak stravovací návyky, tak genetické predispozice se mohou vzájemně podílet na udržování nízkých hladin tuků v krvi jedinců s PKU (Verduci et al. 2004; Giovannini et al. 2012; Manta-Vogli et al. 2018).

3.4 Nutriční hodnoty a benefity dýní

Dýně je významná zahradnická plodina patřící do čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*), která zahrnuje pět domestikovaných druhů: *Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret*, *C. pepo L.*, *C. maxima Duchesne*, *C. mixta pangalo* a *C. micifolia*. Tři z nich, *C. moschata*, *C. pepo* a *C. maxima*, představují hospodářsky významné druhy pěstované s vysokou produkcí po celém světě. V Čechách se běžně pěstují *C. maxima Duchesne* a *C. pepo L.*, jak ve větších produkčních oblastech, tak na domácích zahrádkách pro zpracování a čerstvý trh.

Dýňové plody se skládají především z dužiny a semen. V dužině se skrývá mnoho nutričních složek včetně polysacharidů, aminokyselin a aktivních bílkovin. Dýně jsou obvykle tvořeny z 85-95 % vodou, na sušinu tedy připadá 5-15 % celkové hmotnosti. Zastoupení makronutrientů se může výrazně lišit v závislosti na konkrétní odrůdě, obecně se ale v sušině nachází 40-80 % sacharidů, asi 10 % bílkovin, přibližně 1 % tuků a 10 % vlákniny. Bílkovin je sice v dužině poměrně málo, ale v závislosti na druhu dýně obsahují různé esenciální aminokyseliny, konkrétněji lysin, leucin, izoleucin, valin, threonin, histidin a fenylalanin (Moravec et al. 2004; Zhou et al. 2007; Biesiada et al. 2011; Guiné et al. 2011; Kim et al. 2012; Armesto et al. 2020; Hussain et al. 2022).

Dýně kromě základních makronutrientů také obsahují mnoho jiných zdraví prospěšných látek, jako jsou karotenoidy, minerály, draslík, vitaminy C, B2 a E, a vyznačují se nízkou energetickou hodnotou. β -Karoten snižuje poškození kůže sluncem a působí protizánětlivě. U α -karotenu se předpokládá, že zpomaluje proces stárnutí, snižuje riziko vzniku šedého zákalu a zabraňuje růstu nádorů. Oba tyto karoteny slouží jako důležité provitaminy vitamínu A. Vitamin E (tokoferoly) chrání buňky před oxidačním poškozením tím, že zabraňuje oxidaci nenasycených mastných kyselin v buněčné membráně (Biesiada et al. 2011; Kim et al. 2012).

Dýňová semínka jsou dobrým zdrojem zinku, polynenasycených mastných kyselin a fytosterolů (např. β -sitosterolu), které mohou přecházet chronickým onemocněním. Používají se především ke kulinářským účelům a k získávání oleje, který je široce přijímán nejen jako

jedlý olej, ale i jako nutraceutikum. Studie uvádějí, že dýňová semínka mohou být prospěšná při léčbě benigní hyperplazie prostaty, a to díky vysokému obsahu β -sitosterolu, u kterého bylo prokázáno, že snižuje hladinu cholesterolu v krvi a snižuje riziko vzniku některých typů rakoviny. Studie vlivu dýňového oleje na zvířata také prokázaly, že může zpomalit vývoj hypertenze, snížit hypercholesterolemii a zmírnit příznaky cukrovky tím, že podporuje hypoglykemickou aktivitu (Gossell-Williams et al. 2006; Xanthopoulou et al. 2009; Kim et al. 2012; Vinayashree & Vasu 2021).

3.5 Metody stanovení aminokyselin v potravinách

Aminokyseliny se v potravinách vyskytují ve volné formě nebo vázané v peptidech, proteinech nebo polymerech nepeptidového charakteru. Ke stanovení celkového obsahu aminokyselin v potravinách je zapotřebí provést hydrolýzu bílkovin pomocí různých způsobů, které musí zohlednit rozdíly ve stabilitě jednotlivých aminokyselin a odolnost různých peptidových vazeb vůči hydrolýze (Peace & Gilani 2005).

Cílem hydrolýzy je kvantitativní uvolnění všech aminokyselin ze substrátu a jejich kvantitativní převedení do hydrolyzátu. Žádná metoda hydrolýzy není schopna splnit tyto požadavky, jelikož hydrolýza a destrukce uvolněných zbytků probíhají současně. Účinnost procesu hydrolýzy ovlivňuje několik faktorů, jako je teplota, čas, použité činidlo a přísady. Kombinace těchto faktorů je kritická pro stanovení citlivých reziduí.

V laboratoři se obvykle analyzuje velké množství různých vzorků, a proto závisí volba správné metody hydrolýzy do značné míry na potřebách konkrétní analýzy. Ve většině případů se volí kompromisní přístup. Hydrolýza polypeptidů může být provedena buď chemicky, nebo enzymaticky. Chemickou hydrolýzu lze provádět za kyselých nebo zásaditých podmínek a samotná kyselá hydrolýza může být uskutečněna v kapalně nebo plynné fázi (Fountoulakis & Lahm 1998).

Kyselá hydrolýza se nejčastěji provádí za využití kyseliny chlorovodíkové (HCl), která je velice výhodná jako činidlo, jelikož ji lze použít jak v kapalně, tak plynné fázi a lze ji následně odpařit a získat tak hydrolyzáat v malém objemu rekonstitučního pufu. Konvenční kyselá hydrolýza využívá 6M HCl po dobu 20 nebo 24 hodin při 110 °C. Aminokyseliny jsou chemicky různorodou skupinou látek a pouze některé z nich (kyselina asparagová, kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, leucin, fenylalanin, histidin a arginin) lze kvantitativně stanovit pomocí kyselé hydrolýzy, ostatní mohou během hydrolýzy podléhat přeměnám. Asparagin a glutamin podléhají deaminačním reakcím a přeměňují se na kyselinu asparagovou a glutamovou. Serin a threonin jsou částečně degradovány, přičemž se uvádí ztráty 5 až 15 procent. Také dochází k přeměně cysteinu a methioninu, cystein může být částečně degradován nebo oxidován na cystin, zatímco methionin může být oxidován na methionin sulfoxid a methionin sulfon. Valin a izoleucin obsahují peptidové vazby s velmi hydrofobními zbytky, které se kyselinou štěpí poměrně obtížně, takže při použití kyselé hydrolýzy jsou získaná množství často nízká. Tyrosin při hydrolýze využívající HCl může podléhat halogenaci. Lysin je stabilní za standartních podmínek kyselé hydrolýzy a lze ho snadno stanovit v čistých bílkovinách nebo tepelně neošetřených potravinách, problémy se však objevují u tepelně opracovaných potravin, protože aminoskupina na postranním řetězci může reagovat s jinými sloučeninami (např. cukry) a vytvářet produkty Maillardovy reakce. Tryptofan může být během

kyselé hydrolyzy kompletně zničen. Výhody kyselé hydrolyzy však stále výrazně převažují nevýhody, a proto je to nejvyužívanější metoda hydrolyzy (Fountoulakis & Lahm 1998; Mustăţea et al. 2019).

Alkalická hydrolyza se používá téměř výhradně pro stanovení tryptofanu, který je za zásaditých podmínek stabilní. Také se využívá v případě, že vzorek bílkoviny obsahuje velké procento sacharidů, jako je tomu u potravin a u formulačních roztoků farmaceutických bílkovin, které obvykle obsahují vysoký podíl monosacharidů. Hlavní nevýhodou metody je, že dochází ke zničení serinu, treoninu, argininu a cysteinu a k racemizaci ostatních aminokyselin. Alkalická hydrolyza se obvykle provádí pomocí NaOH, KOH nebo vzácněji s BaOH₂ (Fountoulakis & Lahm 1998).

Enzymatická hydrolyza bílkovin umožňuje kvantitativní stanovení asparaginu, glutaminu a tryptofanu, zachování vazeb napojených na kyseliny nebo zásady a úplné uvolnění aminokyselin, které bylo možné kyselou hydrolyzou uvolnit pouze částečně. Mezi používané enzymy patří leucinaminopeptidáza, papain, pronáza, karboxypeptidázy, trypsin a chymotrypsin, ačkoli problémy s jejich využitím mohou obnášet složité inkubační postupy, nestabilitu některých enzymů a zvýšené množství nechtěných aminokyselin při použití více enzymů (Peace & Gilani 2005).

K vlastnímu stanovení aminokyselin se nejčastěji používají separační (kapalinová chromatografie – HPLC, iontově výměnná chromatografie – IEC, plynová chromatografie – GC) a elektromigrační metody (kapilární elektroforéza – CE). Většina aminokyselin až na aromatické aminokyseliny tyrosin, tryptofan a fenylalanin obsahující ve své přirozené struktuře aromatické jádro, jež zajišťuje dostatečnou citlivost v ultrafialové (UV) spektroskopii, nemá chromoforové ani fluoroforové skupiny, tudíž je nutné provést derivatizační krok, aby tyto sloučeniny byly vhodné pro UV nebo fluorescenční detekci. Derivatizační postup lze provést pomocí tří hlavních modelů: 1) postkolonová (post-separační) metoda, běžně používaná v HPLC, 2) předkolonová (před-separační) metoda používaná v HPLC, GC a CE a 3) metoda na koloně (derivatizace během separace), omezená na CE (Song et al. 2018; Ferré et al. 2019).

U postkolonové metody se derivatizační krok používá pouze ke zvýšení detekce aminokyselin pro absorpční nebo fluorescenční spektroskopii bez vlivu na předchozí separační mechanismus. Tento přístup odpovídá jedné z referenčních metod pro stanovení aromatických uhlovodíků, při níž se IEC kombinuje s postkolonovou detekcí ninhydrinem. Při této metodě se aminokyseliny kladně nabitě při nízkém pH separují na kationtové výměnné pryskyřici, na které se postupně zvyšuje pH mobilní fáze a k eluci dojde, když je dosaženo izoelektického bodu stanovovaných aminokyselin, což vede k mobilizaci analytu. Derivatizace probíhá mezi výstupem z kolony a detektorem. Postkolonová derivatizace umožňuje zkrátit dobu přípravy vzorku, aniž by se změnila chromatografická účinnost.

Předkolonová derivatizace je alternativním přístupem hojně využívaným v GC, jelikož se zároveň podílí na lepší těkavosti i detekci analytů. Derivatizace může probíhat s dvěma různými činidly na aminoskupině a karboxylové skupině nebo pouze s jedním činidlem pro obě skupiny. Při dvoustupňové derivatizaci se aminokyseliny nejprve esterifikují v přítomnosti příslušného alkoholu a HCl a poté po odpaření netěkavých meziproductů podléhají acylaci. Výsledkem tohoto procesu jsou různé estery N-acyl aminokyselin. Co se týče derivatizace obou funkčních skupin jedním činidlem, používají se většinou methyl- nebo fenylisothiokyanáty.

Nejmodernějším způsobem derivatizace pro CE je derivatizace na koloně, která je vhodná pro velmi malé objemy vzorku. Existuje několik způsobů elektroforézy, ale nejpoužívanějšími zůstávají kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie. U obou způsobů je vzorek zaveden do úzké kapiláry a nabitě sloučeniny, jež jsou předmětem zájmu, jsou separovány pod elektrickým polem. Ve většině případů se při derivatizaci na koloně využívá rozdílné mobility analytů a činidla (Callejón et al. 2010; Rigas 2012; Ferré et al. 2019).

3.5.1 Kapalinová chromatografie/elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (LC-ESI-MS/MS)

Kapalinová chromatografie/tandemová hmotnostní spektroskopie (LC-MS/MS) vybavená iontovým zdrojem s elektrosprejovou ionizací (ESI) je nejdůležitější metodou pro citlivé a selektivní stanovení stopových množství sloučenin, jelikož v porovnání s jinými ionizačními metodami vyžaduje nižší teplotu pro ionizaci a lze ji tedy použít při stanovování tepelně nestabilních sloučenin. Kromě využití MS/MS detekce zlepšuje velikost signálu oproti pozadí, což umožňuje citlivou detekci cílových sloučenin. Ne všechny sloučeniny lze však touto metodou výhodně analyzovat. Například účinnost ionizace některých sloučenin je často velmi nízká a takové sloučeniny nelze citlivě detekovat. Analyt by měl mít následující vlastnosti. Za prvé musí být ve své iontové formě v roztoku nebo být schopen obdržet náboj prostřednictvím reakce tvorby aduktů v plynné fázi. Za druhé se upřednostňují méně polární látky, protože hydrofobní sloučeniny lze snadno oddělit od solí interferujících sloučenin, které mají potlačující účinky na ESI. Hydrofobní sloučeniny jsou navíc eluovány mobilní fází s vyšším obsahem organického rozpouštědla na koloně s obrácenou fází (kolona, kde je stacionární fáze hydrofobní a mobilní fáze je hydrofilní). Vyšší obsah organického rozpouštědla přispívá k vytváření nabitých kapek elektrosprejem, což vede k vyšší odezvě ESI. Obecně jsou pro odezvu ESI kritickými faktory schopnost analytu obdržet náboj a jeho hydrofóbnost. Za třetí je žádoucí, aby cílový analyt fragmentoval při disociaci vyvolané srážkou a vytvářel intenzivní ion pro citlivou detekci MS/MS. Ke zvýšení citlivosti detekce této metody se často využívá chemická derivatizace analytu (Cech & Enke 2001; Nordstrom et al. 2004; Santa 2010).

Kombinace těchto metod je mimo jiné zároveň vhodná pro detekci aminokyselin. Při této konkrétní analýze má použití MS místo spektrofotometrické detekce několik výhod, včetně vyšší citlivosti, selektivity a výkonnosti. Kromě toho MS/MS přidává další úroveň zlepšení identifikace analytu prostřednictvím fragmentace molekul, což vede k vyšší specifičnosti a reprodukovatelnosti. MS také vyžaduje základní separaci pouze u aminokyselin s totožnou hmotností (konstituční izomery), protože překrývání aminokyselin s různými hmotnostmi neovlivňuje kvalifikaci ani kvantifikaci. Analýza aminokyselin pomocí GC-MS a LC-MS poskytuje srovnatelné výsledky, ale LC-MS je rozšířenější, jelikož vyžaduje méně kroků čištění vzorků před analýzou. Analýza aminokyselin pomocí LC-MS/MS však přináší své vlastní komplikace vzhledem k malé velikosti a zwitterionické povaze aminokyselin. Tyto problémy kompromitují všechny kroky metody od extrakce analytů přes chromatografickou separaci až po detekci MS. V závislosti na účelu analýzy mohou tyto tři faktory vyžadovat zvláštní pozornost (Violi et al. 2020).

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

Do pokusu bylo zařazeno celkem šest druhů dýní běžně dostupných na českém trhu, které nám byly darovány Katedrou agroekologie a rostlinné produkce. Konkrétně se jednalo o druhy: dýně muškátová Honeynut (*C. moschata* × *C. maxima*), dýně muškátová Ibiza (*C. moschata* `Ibiza`), dýně muškátová Butternut (*C. moschata* `Butternut`), dýně obecná okrasná (*C. pepo* var. *ovifera*), dýně obrovská Hokkaido Orange (*C. maxima* `Hokkaido Orange`) a dýně obrovská Hokkaido Green (*C. maxima* `Hokkaido Green`).

4.2 Použité chemikálie

Methanol (HPLC grade; Lachner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (35% p.a.; Lachner, Česká republika)

Heptafluoromáselná kyselina (HFBA, ≥99,5%; Merck, Německo)

Směsný standard L-aminokyselin pro kyselou hydrolyzu (96%; Merck, Německo)

Ultračistá HPLC voda (Merck Millipore, Německo)

4.3 Použité přístroje

Analytické váhy (KERN EW, Kern & Sohn, Německo)

Lyofilizátor (Lyovac GT2, Steris, Německo)

Sušárna Venticell BMT (BMT medical technology s.r.o., Česká republika)

Simplicity UV (Merck Millipore, Německo)

Kapalinový chromatograf (UltiMate 3000 RS, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) spojený s hmotnostním detektorem typu hybridní trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí (3200 QTRAP, Sciex, Massachusetts, USA)

4.4 Příprava vzorku

Ke stanovení obsahu fenylalaninu ve vzorcích dýně byla využita kyselá hydrolyza, která je vhodná ke stanovení všech AMK kromě tryptofanu, glutaminu a asparaginu kompletně přecházejících na kyselinu glutamovou a asparagovou a cysteinu, který je oxidován na cystin.

Vzorek lyofilizované dýně byl rozemlet na hladký prášek, z něhož bylo odváženo 0,2 g do 20mL uzavíratelných zkumavek z borosilikátového skla. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml 6M HCl, zkumavka byla uzavřena, opatrně promíchána a umístěna do dřevěného stojanu, jenž byl umístěn na 24 hodin do sušárny vyhřáté na 110 °C. Po 24h hydrolyze byl vzorek ponechán vychladnout na pokojovou teplotu. Poté byl kvantitativně převeden do 100ml odměrných baněk pomocí destilované vody, baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou a promíchána. Vzorek byl následně zfiltrován nejprve přes skládaný papír, poté přes 0,2 μm nylonový

stříkačkový filtr a v poměru 1:9 byl naředěn destilovanou vodou do vialky. Všechny vzorky byly zpracovány ve třech paralelních opakováních.

4.5 LC-ESI-MS/MS analýza aminokyselin/fenylalaninu

Separace jednotlivých aminokyselin v podmínkách RP-HPLC byla provedena pomocí iontově párové chromatografie. Jako iont-párové činidlo byla do mobilní fáze přidána kyselina heptafluoromáselná (HFBA).

4.5.1 HPLC podmínky separace

Chromatografická kolona: ZORBAX SB-C18, 3,0 x 150 mm, 5 μ m (Agilent, Kalifornie, USA).

Teplota kolony: 25 °C

Teplota autosampleru: 10 °C

Mobilní fáze: 5 mM HFBA ve vodě (A), 5 mM HFBA v methanolu (B)

Gradientová eluce: 0-0,5 min 20 % B izokraticky, 0,5-9 min 60 % B lineární gradient, 9-10 min 60 % B izokraticky, 10-11 min 20 % B lineární gradient, 11-15 min 20 % B izokraticky

Čas analýzy: 15 min

Průtok: 0,3 ml/min

Objem nástříku 3 μ l

4.5.2 Podmínky ve zdroji detektoru

Ionizace: ESI pozitivní mód

Ochranný plyn: 25 psig

Napětí zdroje: 5500 V

Teplota: 600 °C

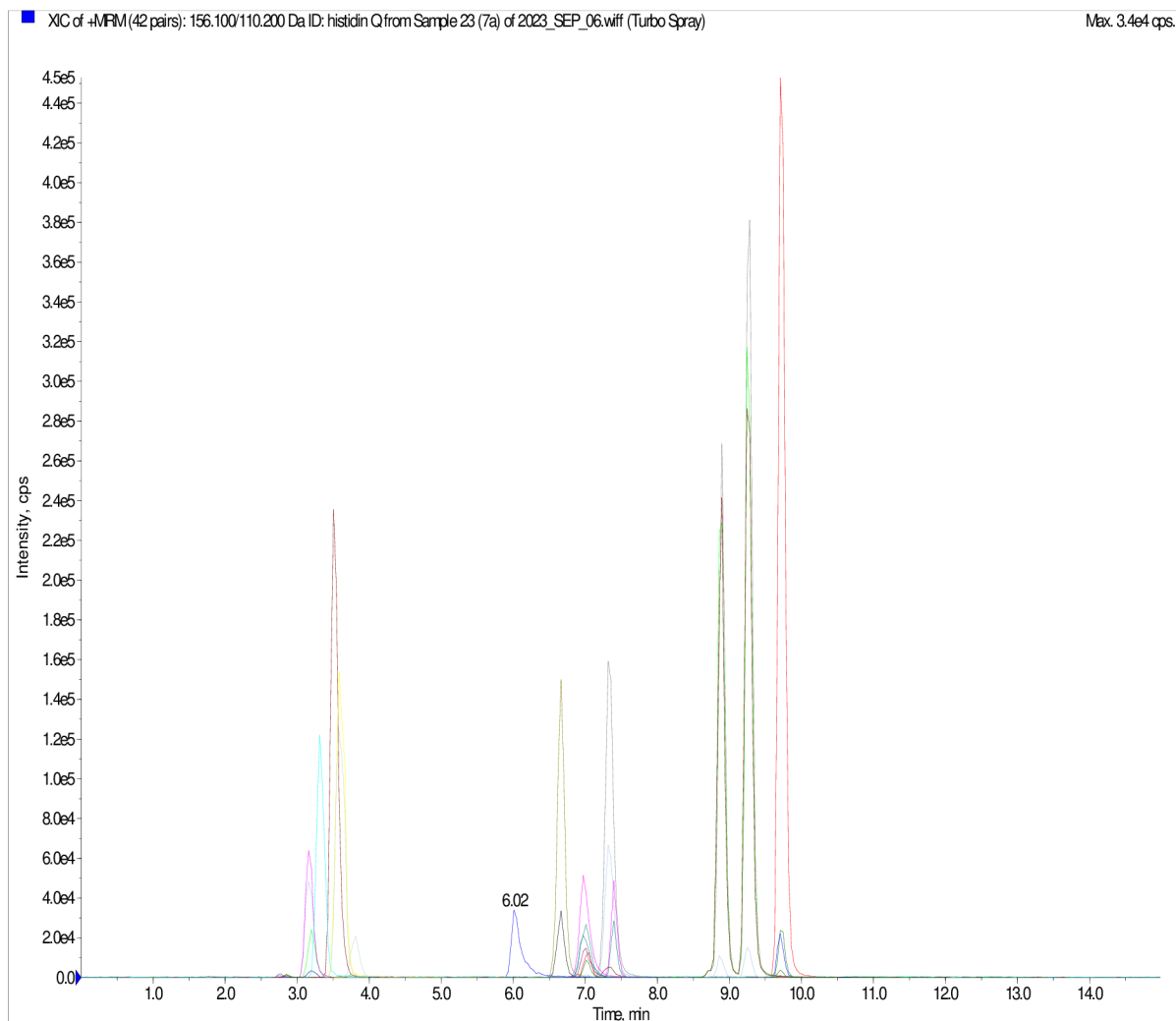
Zmlžovací plyn: 55 psig

Turboplyn: 50 psig

4.5.3 Detekční parametry fenylalaninu

Pro fenylalanin byly monitorovány dva iontové přechody s jednotkovým rozlišením: kvantifikační přechod 166 \rightarrow 120 (deklasterační potenciál 20 V, kolizní energie 20 V) a konfirmační přechod 166 \rightarrow 103 (deklasterační potenciál 20 V, kolizní energie 20 V).

Kvantifikace fenylalaninu byla provedena metodou externí kalibrace v rozmezí 0,1-10 μ g/ml. Detekční limit fenylalaninu (vypočítaný ze vztahu signál/šum = 3) činil 14 ng/ml. Ukázkový chromatogram hydrolyzovaného vzorku dýně (*C. moschata* \times *C. maxima*) je uveden na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2: Chromatogram vzorku dýně: Fenylalanin (retenční čas 9,75 min – červený pík)

5 Výsledky

Výsledné hodnoty měření odpovídaly mikromolům Phe přítomným v jednom mililitru vzorku, pro možnost porovnání naměřených hodnot s literaturou byl uskutečněn přepočít na mikrogramy Phe obsáhlé v 1 g suché dýně. Všechny získané hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 2383 do 3966 μg Phe na gram sušiny (viz tabulka č. 1). Obě varianty *C. maxima* poskytly zdaleka nejmenší naměřené hodnoty (2383–2740 μg Phe/g sušiny), s tím, že *C. maxima* `Hokkaido Orange` vykazovala nejmenší obsah Phe z celého spektra vzorků, včetně nejnižší zjištěné hodnoty rovné 2383 μg Phe/g sušiny (vzorek 5-b). *C. pepo* var. *ovifera* se svými hodnotami zprůměrovanými na 2992 ± 385 μg Phe/g sušiny leží zhruba uprostřed zjištěného rozmezí hodnot Phe, jelikož výrazně přesahuje obsahy obou variant *C. maxima*, ale nepřibližuje se vyšším hodnotám ostatních dýní. Je ale důležité poznamenat, že u *C. pepo* var. *ovifera* se vyskytla největší naměřená odchylka napříč vzorky jednotlivých druhů dýní, rovnající se rozdílu 675 μg Phe/g sušiny mezi vzorky 4-a a 4-c. Zbylé druhy *C. moschata* \times *C. maxima*, *C. moschata* `Ibiza` a *C. moschata* `Butternut` obsahovaly výrazně vyšší množství Phe (3451–3966 μg Phe/g sušiny), kde *C. moschata* \times *C. maxima* ztelně překračovala průměrné obsahy obou *C. moschata* `Ibiza` (3622 ± 261 μg Phe/g sušiny) i *C. moschata* `Butternut` ($3614 \pm 58,5$

µg Phe/g sušiny) svojí průměrnou hodnotou obsahu Phe dosahující 3837 ± 166 µg Phe/g sušiny, ke které přispěla i nejvyšší změřená hodnota Phe napříč celou analýzou rovnající se 3966 µg Phe/g sušiny (vzorek 1-b).

Tabulka č. 1: Obsah Phe změřený pomocí metody LC-ESI-MS/MS. Finální hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatné odchylky stanovené z třech paralelních opakování.

Dýně	Vzorek	Obsah (µg Phe/g sušiny)	Průměr (µg Phe/g sušiny)
<i>C. moschata</i>	1-a	3896	3837 ± 166
	1-b	3966	
<i>C. maxima</i>	1-c	3650	3622 ± 261
	2-a	3922	
	2-b	3493	
<i>C. moschata</i> `Ibiza`	2-c	3451	3614 ± 58,5
	3-a	3680	
	3-b	3568	
<i>C. moschata</i> `Butternut`	3-c	3594	2992 ± 385
	4-a	3222	
	4-b	3207	
<i>C. pepo</i> var. <i>ovifera</i>	4-c	2547	2472 ± 81,5
	5-a	2490	
<i>C. maxima</i> `Hokkaido Orange`	5-b	2383	2536 ± 180
	5-c	2543	
	6-a	2740	
<i>C. maxima</i> `Hokkaido Green`	6-b	2396	2474
	6-c	2474	

6 Diskuze

Puda (2018) uvádí v aktualizovaných tabulkách pro pacienty s PKU a jinými VMP hodnotu Phe 29 mg na 100 g čerstvé dýně. Pro přehledné porovnání této hodnoty s našimi výsledky se můžeme řídit podle průměrného obsahu vody v dýních, jež je přibližně 90 %, a učinit tak přepočít, dle kterého se 29 mg Phe na 100 g čerstvé dýně rovná 2900 µg Phe na 1 g sušiny. Pokud tuto hodnotu porovnáme s našimi výsledky, tak zjistíme, že námi měřené odrůdy muškátové dýně jsou nevhodné pro podávání fenylylketonurikům, jelikož všechny tři přesahovaly tabulkovou hodnotu o více jak 24 %. Na druhou stranu u obou variant *C. maxima* byly zjištěny hladiny (viz tabulka č. 1) nižší, než je hodnota uváděná v tabulkách a jedinci trpící PKU se nemusí tak při konzumaci těchto dýní obávat, že by přijali nečekaně vysoké množství Phe. Z výsledků našich analýz můžeme tedy obě varianty *C. maxima* označit jako nejvhodnější druhy dýní pro zařazení do jídelníčku fenylylketonuriků, kteří konzumací těchto dýní mohou doplnit důležité minerály, vitaminy a antioxidanty. *C. pepo* var. *ovifera* zapadla doprostřed naší škály výsledků a nejvíce se svojí hladinou 2992 ± 385 µg Phe/g sušiny přibližuje tabulkové hodnotě dýní, kterou ale stále přesahuje a není tedy přímo vhodná pro konzumaci při PKU, ale ani neobsahuje příliš vysoké hladiny Phe, a bylo by tedy možné v určitých situacích použít tento

druh pro přípravu pokrmů, pokud by nebyla k dispozici ani jedna ze dvou námi měřených variant *C. maxima* nebo by pacient potřeboval doplnit denní příjem Phe potřebný pro správné fungování organismu.

7 Závěr

Provedené měření prokázalo, že obsah Phe v dužině dýní se může opravdu výrazně lišit v závislosti na druhu dýně. Tento objev je významný, jelikož pro jedince s PKU procházející intenzivním fyziologickým vývojem je stěžejní velmi přísné dodržování nízkobílkovinné diety, a tedy jakákoliv příležitost pro omezení příjmu Phe ze stravy, která zároveň poskytne významné nutrienty, je více než vítána. Dýňová semínka pro účely této práce nebyla relevantní, jelikož je známo, že jsou bohatým zdrojem bílkovin, a tedy i fenylalaninu.

Dýňové plody se sice vyznačují nízkou energetickou hodnotou, ale fenylketonurici mohou zařazením dýní do svého jídelníčku doplnit vlákninu a pro ně jinak těžce dostupné bioaktivní látky, včetně karotenoidů, minerálů (dýně obsahují obzvláště vysoké koncentrace draslíku) a vitaminů C, B2 a E. Výsledky praktické části této práce odhalily, že z 6 analyzovaných v České republice široce dostupných druhů dýní jsou pro PKU dietu nejvhodnější dvě varianty *C. maxima*. Obě *C. maxima* `Hokkaido Orange` i *C. maxima* `Hokkaido Green` obsahovaly výrazně menší množství Phe než ostatní měřené druhy a jsou tak ideální volbou pro obohacení jídelníčku průměrného fenylketonurika, který z nich získá zmíněné živiny a bioaktivní látky a zároveň omezí příjem Phe na minimum. Rozdíl mezi *C. maxima* `Hokkaido Orange`, jež měla ze všech druhů nejmenší naměřenou hodnotu Phe, a *C. moschata* × *C. maxima*, která na druhou stranu obsahovala nejvyšší množství Phe napříč vzorky, byl dokonce tak výrazný, že pacient s PKU by mohl zkonzumovat 1,5krát větší množství *C. maxima* `Hokkaido Orange` než *C. moschata* × *C. maxima* při identickém příjmu Phe. Dýně není jediná plodina, jež se může lišit v hladinách Phe napříč druhy, a výsledky této práce tedy zároveň slouží jako ukázka signifikance této problematiky zejména pro jedince s velmi striktní PKU dietou a budoucí studie s podobnými cíli by byly bez pochyby přínosné.

8 Literatura

- Agarwal PK. 2006. Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microbial Cell Factories*, **5**:1-12.
- Anikster Y, et al. 2017 Biallelic mutations in DNAJC12 cause of hyperphenylalaninemia, dystonia and intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet*, **100**:257-266.
- Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernández C, Galán B, García JL, Díaz E, Minambres B. 2004. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, **186**:5062-5077.
- Armesto J, Rocchetti G, Senizza B, Pateiro M, Barba FJ, Domínguez R, Lucini L, Lorenzo JM. 2020. Nutritional characterization of Butternut squash (*Cucurbita moschata D.*): Effect of variety (Ariel vs. Pluto) and farming type (conventional vs. organic). *Food Research International* (e109052) DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109052.
- Bélanger-Quintana A, Burlina A, Harding CO. a spol. 2011. Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, **104**:S19-S25.
- Biesiada A, Nawirska A, Kucharska A, Sokół-Łętowska A. 2011. Chemical composition of pumpkin fruit depending on cultivar and storage. *Ecological Chemistry and Engineering*, **18**:9-18.
- Callejón RM, Troncoso AM, Morales ML. 2010. Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta*, **81**:1143-1152.
- Cech NB, Enke CG. 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Review*, **20**:362-387.
- Ezgu F. 2016. Chapter Seven – Inborn Errors of Metabolism. *Advances in Clinical Chemistry*, **73**:195-250.
- Ferré S, González-Ruiz V, Guillarme D, Rudaz S. 2019. Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends. *Journal of Chromatography B* (e121819) DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121819.
- Fitzpatrick PF. 2000. The aromatic amino acid hydroxylases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **74**:235-294.
- Fitzpatrick PF. 2015. Structural insights into the regulation of aromatic amino acid hydroxylation. *Current Opinion in Structural Biology*, **35**:1-6.
- Flydal MI, Martinez A. 2013. Phenylalanine Hydroxylase: Function, structure, and regulation. *IUBMB Life*, **65**:341-349.

- Fountoulakis M, Lahm HW. 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, **826**:109-134.
- Gambello MJ, Li H. 2018. Current strategies for the treatment of inborn errors of metabolism. *Journal of Genetics and Genomics*, **45**:61-70.
- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, Riva E. 2012. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutrition and Metabolism* DOI: 10.1186/1743-7075-9-7.
- Gjetting T, Petersen M, Guldborg P, Guttler F. 2001. Missense mutations in the N-terminal domain of human phenylalanine hydroxylase interfere with binding of regulatory phenylalanine. *The American Journal of Human Genetics*, **68**:1353-1360.
- Gossell-Williams M, Davis A, O'Connor N. 2006. Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of Sprague-Dawley rats by pumpkin seed oil. *Journal of Medicinal Food*, **9**:284-286.
- Guerrero RB, Kloke KM, Salazar D. 2019. Inborn errors of metabolism and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology Clinics of North America*, **48**:183-198.
- Guiné RPF, Pinho S, Barroca MJ. 2011. Study of the convective drying of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Food and Bioproducts Processing*, **89**:422-428.
- Hussain A, et al. 2022. A comprehensive review of functional ingredients, especially bioactive compounds present in pumpkin peel, flesh and seeds, and their health benefits. *Food Chemistry Advances* (e100067) DOI: 10.1016/j.focha.2022.100067.
- Choudhary AK, Pretorius E. 2017. Revisiting the safety of aspartame. *Nutrition Reviews*, **75**:718-730.
- Jeanmonod R, Asuka E, Jeanmonod D. 2023. *Inborn Errors of Metabolism*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) PMID: 29083820.
- Kim MY, Kim EJ, Kim YN, Choi C, Lee BH. 2012. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. *Nutrition research and practice*, **6**:21-27.
- Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K. 1999. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *The Journal of Pediatrics*, **135**:375-378.
- Leonard JV. 2006. Komrower lecture: Treatment of inborn errors of metabolism: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **29**:275-278.
- Levy HL, Sarkissian CN, Scriver CR. 2018. Phenylalanine ammonia lyase (PAL): From discovery to enzyme substitution therapy for phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, **124**:223-229.

- MacLeod EL, Ney DM. 2010. Nutritional Management of Phenylketonuria. *Annales Nestlé*, **68**:58-69.
- Mandrioli R, Mercolini L, Raggi MA. 2013. Recent trends in the analysis of amino acids in fruits and derived foodstuffs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**:7941-7956.
- Manta-Vogli PD, Dotsikas Y, Loukas YL, Schulpis KH. 2018. The phenylketonuria patient: A recent dietetic therapeutic approach. *Nutritional Neuroscience*, **23**:628-639.
- Manta-Vogli PD, Schulpis KH. 2018. Phenylketonuria dietary management and an emerging development. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, **118**:1361-1363.
- Martinez M, Harding CO, Schwank G, Thöny B. 2023. State-of-the-art 2023 on gene therapy for phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **47**:80-92.
- Martins AM. 1999. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Sao Paulo Medical Journal*, **117**:251-265.
- Matthews DE. 2007. An Overview of Phenylalanine and Tyrosine Kinetics in Humans. *The Journal of Nutrition*, **137**:1549S-1555S.
- Moravec J, Lebeda A, Křístková E. 2004. History of growing and breeding of cucurbitaceous vegetables in Czech Lands. Pages 21-38 in Lebeda A, Paris HS, editors. *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research*. Palacký University in Olomouc, Olomouc.
- Mustățea G, Ungureanu EL, Iorga E. 2019. Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food – progress over time: A short review. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, **26**:81-87.
- Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Dolezal K, Astot C, Sandberg G, Moritz T. 2004. Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI response of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Analytical Chemistry*, **76**:2869-2877.
- Olsson E, Teigen K, Martinez A, Jensen VR. 2010. The aromatic amino acid hydroxylase mechanism: a perspective from computational chemistry. *Advances in Inorganic Chemistry*, **62**:437-500.
- Peace RW, Gilani GS. 2005. Chromatographic determination of amino acids in foods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, **88**:877-887.
- Puda R. 2018. Část 1 Běžné potraviny. Pages 9-32 in Puda R, editor. *Potravinové Tabulky Výživových Hodnot. Národní sdružení PKU a jiných DMP, z.s.*
- Reeds PJ, et al. 1997. Integration of amino acid and carbon intermediary metabolism: studies with uniformly labeled tracers and mass isotopomer analysis. *European Journal of Pediatrics*, **156**:S50-S58.

- Rigas PG. 2012. Review: Liquid chromatography–post-column derivatization for amino acid analysis: Strategies, instrumentation, and applications. *Instrumentation Science & Technology*, **40**:161-193.
- Roe CR, Mochel F. 2006. Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: therapeutic potential. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **29**:332-340.
- Rovelli V, Longo N. 2023. Phenylketonuria and the brain. *Molecular Genetics and Metabolism* (e107583) DOI: 10.1016/j.ymgme.2023.107583.
- Santa T. 2010. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, **25**:1-10.
- Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. 2006. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **29**:261-274.
- Singh RH, et al. 2014. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genetics in Medicine*, **16**:121-131.
- Song Y, Xu Ch, Kuroki H, Liao Y, Tsunoda M. 2018. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **147**:35-49.
- Strisciuglio P, Concolino D. 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*, **4**:1007-1017.
- Tao Z, Dong B, Teng Z, Zhao Y. 2020. The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE Access*, **8**:89802-89811.
- Torres Pazmiño DE, Winkler M, Glieder A, Fraaije MW. 2010. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, **146**:9-24.
- van Spronsen FJ, Ahring KK, Gizewska M. 2009a. PKU – what is daily practice in various centres in Europe? Data from a questionnaire by the scientific advisory committee of the European Society of Phenylketonuria and Allied Disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **32**:58-64.
- van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, Burlina A, Longo N, Bosch AM. 2021. Phenylketonuria. *Nature Reviews Disease Primers*, **7** (36). DOI: 10.1038/s41572-021-00267-0.
- van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ. 2009b. Brain dysfunction in phenylketonuria: Is phenylalanine toxicity the only possible cause? *Journal of Inherited Metabolic Disease* DOI: 10.1007/s10545-008-0946-2.
- van Spronsen FJ. 2010. Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nature Reviews Endocrinology*, **6**:509-514.

- Verduci E, Agostoni C, Biondi ML, Radaelli G, Giovannini M, Riva E. 2004. Apolipoprotein B gene polymorphism and plasma lipid levels in phenylketonuric children. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, **71**:117-120.
- Vinayashree S, Vasu P. 2021. Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. Kashi Harit) seeds. *Food Chemistry* 340 (e128177) DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128177.
- Violi JP, Bishop DP, Padula MP, Steele JR, Rodgers KJ. 2020. Consideration for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. *Trends in Analytical Chemistry* (e116018) DOI: 10.1016/j.trac.2020.116018.
- Vockley J. 2008. Metabolism as a complex genetic trait a systems biology approach: Implications for inborn errors of metabolism and clinical diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **31**:619-629.
- Wada Y, Totsune E, Mikami-Saito Y, Kikuchi A, Miyata T, Kure S. 2023. A method for phenylalanine self-monitoring using phenylalanine ammonia-lyase and pre-existing portable ammonia detection system. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* (e100970) DOI: 10.1016/j.ymgmr.2023.100970.
- Werner ER, Blau N, Thony B. 2011. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochemical Journal*, **438**:397-414.
- Xanthopoulou MN, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S. 2009. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Research International*, **42**:641-646.
- Ye Y, Ding Y, Jiang Q, Wang F, Sun J, Zhu C. 2017. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Reports*, **36**:235–242.
- Zhou T, Kong Q, Huang J, Dai R, Li Q. 2007. Characterization of nutritional components and utilization of pumpkin. *Food*, **1**:313-321.