Enzymy

Definicja

Swoiste biokatalizatory o budowie białkowej, które obniżają *energię aktywacji* substratu umożliwiając lub przyspieszając tym samym przebieg reakcji

Podziały

- ze względu na budowę:

  - proste
  - złożone – z grupą prostetyczną
    - z koenzymem

Podziały

- ze względu na funkcję:

- OKSYDOREDUKTAZY – katalizują reakcje oksydo-redukcyjne
- TRANSFERAZY – katalizują przenoszenie określonych grup pomiędzy poszczególnymi związkami
- HYDROLAZY – katalizują rozkład różnych wiązań z udziałem cząsteczki wody
- LIAZY – katalizują odłączenie grup od substratu bez udziału wody
- IZOMERAZY – katalizują reakcje izomeryzacji
- LIGAZY (SYNTETAZY) – katalizują wytwarzanie wiązań pomiędzy atomami w cząsteczkach substratów

Nazewnictwo

- czterocyfrowy numer
- nazwy systematyczne tworzone według katalizowanej reakcji

  oksydoreduktaza alkohol:NAD
- nazwy robocze (zwyczajowe)

  dehydrogenaza alkoholowa
- nazwy historyczne

Swoistość enzymów

- względem katalizowanej reakcji
- względem substratu

Mechanizm katalizy enzymatycznej

1. Zetknięcie cząsteczek substratów z powierzchnią cząsteczek enzymu

2. Oddziaływanie elektrostatyczne substratu z enzymem prowadzące do powstania wzbudzonej formy kompleksu enzym – substrat

3. Zajście reakcji enzymatycznej – kompleks enzym-substrat ulega przekształceniu w enzym – produkt

4. Uwalnia się produkt i wolny enzym

Budowa centrum katalitycznego (aktywnego)

- miejsce wiązania substratu – grupy pomocnicze (kontaktowe)
- miejsce katalityczne – grupy katalityczne

Modele centrum aktywnego

- wg Fischera – „klucz i zamek”
- wg Koshlanda – „ręka i rękawiczka”

Czynniki wpływające na aktywność enzymów

- temperatura
- stężenie jonów wodorowych
- potencjał oksydo-redukcyjny
- modulatory

Kinetyka enzymatyczna

Zajmuje się zagadnieniami związanymi z szybkością i mechanizmem reakcji

Szybkość reakcji **v** mierzymy zmianą stężenia **c** reagujących substancji (substratów lub produktów) w jednostce czasu **t**.

Stała szybkości reakcji (stała proporcjonalności k) – zależy od rodzaju reakcji chemicznej, warunków jej przebiegu i jest charakterystyczna dla danej temperatury. Liczbowo równa jest szybkości takiej reakcji, w której stężenia wszystkich reagujących substancji są równe 1 mol/l. Jest wyznaczana doświadczalnie.

Reakcja wyrażona ogólnym równaniem stechiometrycznym:

$$aA + bB \leftrightarrow cC + dD$$

oraz równaniem kinetycznym:

$$v = -\frac{dc}{dt} = kc_A^a c_B^b$$

Klasyfikacja kinetyczna reakcji chemicznych

Rząd reakcji – suma wykładników potęgowych ze stężenia reagentów. Wykładniki te dobierane są doświadczalnie, nie mają związku ze współczynnikami stechiometrycznymi. Rząd reakcji nie definiuje mechanizmu reakcji, ale jest pomocny w rozważaniach o mechanizmie reakcji.

Cząsteczkowość reakcji – wskazuje na liczbę cząsteczek biorących udział w danym procesie, nie należy utożsamiać z rzędem reakcji.

Reakcje pierwszego rzędu

Takie, których szybkość oznaczona doświadczalnie, zmienia się proporcjonalnie do stężenia jednej z reagujących substancji

$$v = -\frac{dc}{dt} = k_I c$$

$$k_I = \frac{2{,}3}{t} \log \frac{c_0}{c}$$

Okres półtrwania – jest to czas, po którym stężenie substratu w wyniku reakcji zmniejszyło się o połowę w stosunku do stężenia początkowego. Nie zależy od początkowego stężenia substancji.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_I}$$

Reakcje drugiego rzędu

Takie, których szybkość oznaczona doświadczalnie jest proporcjonalna do iloczynu stężeń dwóch reagujących substancji lub kwadratu stężenia jednego substratu.

$$v = -\frac{dc}{dt} = k_{II} c_1 c_2 = k_{II} c^2$$

$$k_{II} = \frac{2{,}3}{t(c_{01} - c_{02})} \log \frac{c_{02} c}{c_{01} c}$$

Okres półtrwania jest odwrotnie proporcjonalny do początkowego stężenia substratu.

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_{II} c_0}$$

Reakcje trzeciego rzędu

Są stosunkowo rzadkie, należą do nich te reakcje, których szybkość oznaczona doświadczalnie jest proporcjonalna do iloczynu trzech reagujących substancji lub do trzeciej potęgi stężenia jednego substratu.

$$v = -\frac{dc}{dt} = k_{III} c_1 c_2 c_3 = k_{III} c^3$$

$$k_{III} = \frac{c_0^{\,2} - c^2}{t 2 c_0^{\,2} c^2}$$

Okres półtrwania jest odwrotnie proporcjonalny do kwadratu początkowego stężenia

$$t_{1/2} = \frac{3}{2 k_{III} c_0^{\,2}}$$

Reakcje zerowego rzędu

Przebiegają z szybkością niezależną od stężenia reagujących substancji. Zależą od stężenia enzymu.

$$v = -\frac{dc}{dt} = k_0$$

Okres półtrwania

$$t_{1/2} = \frac{c_0}{2k_0}$$

Przykład

Pewien lek wyprodukowano w styczniu 1992. Jeżeli jego rozkład przebiega zgodnie z kinetyką I rzędu to w jakim czasie połowa leku ulegnie rozpadowi. Stała szybkości k tej reakcji wynosi 7,9 x 10^{-5} $godz^{-1}$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{7,9x10^{-5}} = 8772,15godz$$

$$\frac{8772,15godz}{24godz} = 365,5dni$$

Stała Michaelisa

Jest to takie stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji równa się połowie szybkości maksymalnej. Jest wartością charakterystyczną dla każdego enzymu w odpowiednich warunkach pH i temperatury. Określa powinowactwo enzymu do substratu.

Zgodnie z modelem Michaelisa – Menten reakcja katalizowana przez enzym przebiega według schematu:

$$S + E \underset{k_1}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

Szybkość właściwej reakcji enzymatycznej, czyli szybkość tworzenia i uwalniania produktu zależy od stężenia kompleksu ES i charakteryzuje ją stała szybkości reakcji k_3

$$v = k_3[ES]$$

Opisując kinetykę tak działającego enzymu Michaelis i Menten oparli się na następujących założeniach:

1. Stężenie kompleksu ES jest niezmienne w czasie. Zmianie może ulegać stężenie substratu, produktu, ale nie ES. Jeżeli szybkość tworzenia kompleksu ES jest równa szybkości jego rozpadu to:

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

A wprowadzając stałą K_m

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Otrzymujemy

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

2. Jeżeli cały enzym jest w postaci ES, to dla danego stężenia enzymu szybkość osiąga wartość maksymalną:

$$v_{\max} = k_3[ES] = k_3[E]$$

Stąd końcowe równanie na szybkość reakcji enzymatycznej ma postać:

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{[S] + K_m}$$

Inhibicje

- hamowanie kompetycyjne

Inhibicje

- hamowanie niekompetycyjne

Inhibicje

- hamowanie allosteryczne

Sposoby wyrażania aktywności enzymów

Jednostki enzymatyczne

- **Jednostka standardowa** (U) – taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 mikromola substratu w ciągu 1 minuty w optymalnych warunkach

- **Katal** (kat) – taka aktywność enzymu, która przekształca 1 mol substratu w ciągu 1 sekundy

- **Aktywność właściwa** – liczba U przypadająca na 1 mg białka (w układzie SI – kat/kg białka) –określa stopień czystości preparatów enzymatycznych

Regulacja aktywności enzymów

- zmiany bezwzględnej ilości enzymu
- zmiany wielkości puli reagujących związków
- zmiany katalitycznej sprawności enzymu

Zmiany bezwzględnej ilości enzymu

Bezwzględna ilość enzymu jest wypadkową jego syntezy i degradacji – procesami odbywającymi się niezależnie i regulowanymi niezależnie.

- induktory syntezy białka enzymatycznego
- represory syntezy (np. sprzężenie zwrotne przez produkt reakcji)
- obrót metaboliczny
- wpływy środowiskowe – hormony, dieta
- synteza nieaktywnych prekursorów

Zmiany wielkości puli reagujących związków

Aktywacja lub hamowanie aktywności enzymu poprzez metabolity końcowe lub pośrednie – (indukcja enzymatyczna)

Zmiany katalitycznej sprawności enzymu

Zmiana aktywności enzymu bez zmiany stężenia białka enzymatycznego

- kompartmentacja
- kompleksy wielkocząsteczkowe
- efektory allosteryczne
- koenzymy
- modyfikacje kowalencyjne – fosforylacja/defosforylacja → kinazy/fosfatazy

Izoenzymy

- To fizycznie odmienne formy o tej samej aktywności katalitycznej.
- Mogą występować w różnych tkankach tego samego organizmu, w różnych typach komórek lub w subkomórkowych kompartmentach.
- Mogą różnić się ciężarem cząsteczkowym i ruchliwością elektroforetyczną.
- Oznaczanie izoenzymów ma znaczenie diagnostyczne – mogą być charakterystyczne narządowo.

Znaczenie diagnostyczne oznaczania aktywności enzymów

- enzymy sekrecyjne – wydzielane do łożyska naczyniowego (cholinesteraza, proteazy układu krzepnięcia i fibrynolizy)
- enzymy ekskrecyjne – wydzielane np. do światła przewodu pokarmowego (amylaza, lipaza)
- enzymy wskaźnikowe – wewnątrzkomórkowe – ich aktywność rośnie w czasie uszkodzenia komórek (AST, ALT, LDH, CK)

Osocze – uzyskuje się po odwirowaniu krwi pełnej pobranej do probówki z antykoagulantem

Surowica – uzyskuje się po odwirowaniu krwi pobranej do suchej probówki

Niektóre typowe przyczyny zmian aktywności enzymów we krwi

- zwiększona proliferacja komórek i indukcja enzymów. Zmiany w eliminacji enzymu
- zmiana przepuszczalności błon komórkowych. Uwalnianie cytoplazmatycznych enzymów wskaźnikowych
- utrudniony odpływ wydzieliny gruczołu zawierającej enzymy sekrecyjne (np. cholestaza)
- rozpad komórek w wyniku procesu patologicznego (uwolnienie enzymów wskaźnikowych
- upośledzenie syntezy (spadek aktywności enzymów głównie sekrecyjnych w wyniku zniszczenia tkanki przez proces chorobowy)

Aminotransferaza alaninowa (ALT)

Kwas glutaminowy + kwas pirogronowy ↔

Kwas α keto glutarowy + alanina

Wzrost aktywności wskazuje na rozległe uszkodzenia komórek, a nie zaburzenia funkcji narządu. Pojawia się w następujących przypadkach:

- nowotwory wątroby, zapalenia trzustki, hemoliza in vitro i in vivo
- cholestazy wątrobowe, marskość wątroby, leczenie dużymi dawkami salicylanów
- wirusowe zapalenie wątroby, toksyczne uszkodzenia wątroby, niewydolność krążenia

Aminotransferaza asparaginianowa (AST)

Kwas glutaminowy + kwas szczawiooctowy $\leftrightarrow$

Kwas α keto glutarowy + kwas asparaginowy

Wzrost aktywności pojawia się:

- marskość wątroby, zapalenia trzustki, hemoliza in vitro i in vivo
- choroby mięśni szkieletowych, przewlekłe zapalenie wątroby, zabiegi chirurgiczne, pasożyty, niedobór selenu i witaminy E
- zawał mięśnia sercowego, wirusowe zapalenie wątroby, toksyczne uszkodzenie wątroby, nowotwory wątroby, intensywny wysiłek u koni sportowych

Amylaza

Hydrolizuje α 1,4-glikany zbudowane z co najmniej 3 reszt glukozy. Najwłaściwszymi substratami są jednak wielocukry należące do α-glikanów jak amylozy, amylopektyny i glikogeny, które są metabolizowane do dekstryn $\rightarrow$ maltotriozy $\rightarrow$ maltozy i niewielkich ilości glukozy

Występuje oprócz trzustki w śliniankach, wątrobie i mięśniach. Jest oznaczana w diagnozowaniu chorób trzustki.

Wzrost aktywności amylazy we krwi powoduje jej wydalanie z moczem przez nieuszkodzone kłębuszki nerkowe – można monitorować w moczu schorzenia trzustki.

Amylaza

Wzrost aktywności obserwuje się:

- ostre zapalenie trzustki, niedrożność jelit, kwasica ketonowa w cukrzycy, niewydolność nerek, hyperadrenokortycyzm, niedrożność gruczołów ślinowych

Spadek aktywności

- martwica trzustki, rozległe oparzenia, zatrucia metalami ciężkimi

Lipaza

Katalizuje rozkład estrów glicerolu i kwasów tłuszczowych. Potwierdza obecność procesu patologicznego w trzustce.

Wzrost aktywności obserwuje się:

- ostre zapalenie trzustki, nowotwory trzustki, choroby nerek, niedrożność jelit

Hemoliza w badanej surowicy powoduje zaniżanie wyniku ponieważ hemoglobina hamuje aktywność lipazy

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH)

Enzym cytoplazmatyczny występujący we wszystkich komórkach – mózg, erytrocyty, mięsień sercowy, leukocyty, nerki, wątroba, płuca. Składa się z 4 łańcuchów – typu M dla narządów mających mniejsze zapotrzebowanie na tlen i typu H dla narządów o nasilonej przemianie tlenowej. Wyróżnia się 5 izoenzymów tkankowo specyficznych.

Kwas mlekowy + NAD $\leftrightarrow$ kwas pirogronowy + $NADH_2$

Wzrost aktywności obserwuje się:

- choroby wątroby, niedokrwistość hemolityczna, białaczka, choroby mięśni szkieletowych, zapalenie płuc, zawał mięśnia sercowego, długotrwały stres

γ Glutamylotranspeptydaza (GGT)

Katalizuje przeniesienie grupy γ-glutamylowej z donora na odpowiedni akceptor. Donorami mogą być glutation lub γ-glutamylowe peptydy a akceptorami glicylo-glicyna, α aminokwasy oraz substraty γ-glutamylowe

$$\gamma\text{-glu A} + \text{A`} \rightarrow \gamma\text{-glu A`} + \text{A}$$

Występuje w nerkach, wątrobie, komórkach dróg żółciowych, trzustce, jelitach. Należy do enzymów indukowanych – np. przez barbiturany, estrogeny, alkohol

Wzrost aktywności obserwuje się:

- cholestazy wewnątrz- i pozawątrobowe, ostre i przewlekłe zapalenia trzustki, ostre zapalenie wątroby, choroba wrzodowa okrężnicy, po leczeniu kortykosterydami u psów

Fosfataza zasadowa

Katalizuje hydrolizę monoestrów ortofosforowych:

$R\text{-}O\text{-}PO_3H_2 + H_2O \rightarrow R\text{-}OH + H_3PO_4$

Izoformy stwierdza się w wątrobie, kościach, jelitach, łożysku, nerkach i śledzionie

Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej obserwuje się:

- żółtaczka zastoinowa, wirusowe i toksyczne zapalenie wątroby, marskość wątroby, białaczka szpikowa, nowotwory kości, osteomalacja, krzywica, po leczeniu glikokortykosterydami, hiperadrenokortycyzm u psów, niewielki wzrost w złamaniach kości

Fosfataza kwaśna

Enzym lizosomalny – optimum pH 5. Izoformy pochodzą z **gruczołu krokowego**, wątroby, nerek, erytrocytów, śledziony i osteoklastów

Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej obserwuje się:

- rak prostaty, nowotwory złośliwe kości, hemoliza in vitro i in vivo, zniszczone płytki krwi, pierwotna nadczynność przytarczyc

Hemoliza przeszkadza w oznaczeniu.

Kinaza kreatynowa (CK)

Enzym cytoplazmatyczny i mitochondrialny. Najwięcej enzymu jest w **mięśniach, mózgu, sercu**, jelitach. Istnieją 3 izoenzymy specyficzne tkankowo.

Katalizuje przeniesienie grupy fosforanowej z ATP na kreatynę z wytworzeniem fosfokreatyny i ADP

Kreatyna + ATP $\leftrightarrow$ fosfokreatyna + ADP

Wzrost aktywności obserwuje się:

- urazy tkanki mięśniowej, zawał mięśnia sercowego, postępujące zwyrodnienia mięśni, zatrucia np. strychniną czy tlenkiem węgla

Cholinesteraza (pseudocholinesteraza)

Enzymy katalizujące hydrolizę estrów choliny do choliny i odpowiedniego kwasu tłuszczowego. Najważniejsze są:

- acetylocholinesteraza układu nerwowego i erytrocytów, rozkładająca acetylocholinę
- pseudocholinesteraza, produkowana w wątrobie i uwalniana do krwioobiegu.

Aktywność obniża się u osób narażonych na stały kontakt z pestycydami, które blokują enzym

Hemoliza przeszkadza w oznaczeniach

Dehydrogenaza glutaminianowa

Enzym mitochondrialny obecny głównie w hepatocytach. Aktywność jest wyższa u mężczyzn niż kobiet.

Należy do „profilu wątrobowego” badań diagnostycznych.