

# Enzymy



# Cele kształcenia

- ▶ Zapoznanie z właściwościami enzymów i ich znaczeniem dla prawidłowego metabolizmu oraz diagnostyki klinicznej
- ▶ zapoznanie z witaminowymi koenzymami i ich znaczeniem dla prawidłowego działania enzymów

# Efekty kształcenia

- ▶ Umiejętność wykorzystania wiedzy enzymologicznej dla diagnostyki laboratoryjnej – interpretacja uzyskanych wyników
- ▶ Zrozumienie metabolicznych konsekwencji zmian aktywności enzymów
- ▶ Zrozumienie znaczenia witaminowych koenzymów dla metabolizmu

# 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:  
7 klas



# Klasa 1

**Oksydoreduktazy** katalizują reakcje oksydo-redukcyjne. Transportują elektrony i protony pomiędzy utleniaczem i reduktorem

# Klasa 2

**Transferazy** katalizują przenoszenie określonych grup funkcyjnych (-SH, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>) pomiędzy poszczególnymi związkami



# Klasa 3

**Hydrolazy** katalizują rozkład różnych wiązań z udziałem cząsteczki wody



# Klasa 4

**Liazy** katalizują odłączenie grup od substratu bez udziału wody



# Klasa 5

**Izomeryzy** katalizują reakcje izomeryzacji – przebudowa w obrębie cząsteczki

# Klasa 6

**Ligazy (SYNTETAZY)** – katalizują  
wytwarzanie wiązań pomiędzy atomami w  
cząsteczkach substratów

# Klasa 7

**TRANSLOKAZY** – białka wspomagające przeniesienie jonów lub cząsteczek przez błonę komórkową lub w jej zakresie (syntaza ATP)

# Nazewnictwo

- ▶ czterocyfrowy numer
- ▶ nazwy systematyczne tworzone według katalizowanej reakcji

*oksydoreduktaza alkohol:NAD*

- ▶ nazwy robocze (zwykajowe)

*dehydrogenaza alkoholowa*

- ▶ nazwy historyczne

numer



# 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

# Kompleks enzim - substrat



# 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”
- ▶ aktualny - pośredni

# Czynniki wpływające na **szybkość** reakcji enzymatycznej

- ▶ 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:



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.

$$v = -\frac{dc}{dt} = k_{II}c_1c_2 = k_{II}c^2$$

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

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.

$$v = -\frac{dc}{dt} = k_{III}c_1c_2c_3 = k_{III}c^3$$

$$k_{III} = \frac{c_0^2 - c^2}{t2c_0^2c^2}$$

Okres półtrwania jest odwrotnie proporcjonalny do kwadratu początkowego stężenia

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

# 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  $7,9 \times 10^{-5} \text{ godz}^{-1}$

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

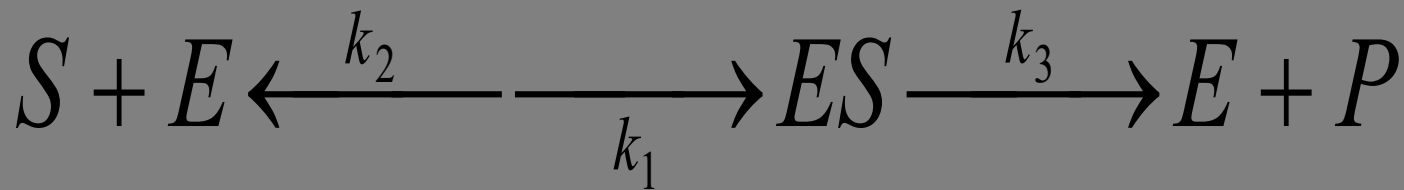
$$t_{1/2} = \frac{0,693}{7,9 \times 10^{-5}} = 8772,15 \text{ godz}$$

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

# 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:



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 niezmiennie 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



# Znaczenie medyczne

► Toksyczność – wiele związków występujących naturalnie lub wytworzonych przez człowieka jest substancjami nieodwracalnie hamującymi aktywność enzymatyczną, np. gaz bojowy sarin hamuje acetylocholinesterazę.

► Wykorzystanie terapeutyczne – związki syntetyczne i naturalne są wykorzystywane do hamowania aktywności enzymów w celach terapeutycznych:

**Lowastatyna** hamuje reduktazę HMG-CoA i obniża stężenie cholesterolu

**Penicylina** hamuje transpeptydazę i ma działanie antybakteryjne

**Pargylina** hamuje monoaminooksydazę i ma działanie hipotensyjne

# Antykoagulanty

**Heparyna** – wiąże się z antytrombiną III zwiększając jej aktywność inhibitorową

**Hirudyna** – naturalny inhibitor trombiny

**Kumaryny** – hamują zależną od witaminy K  $\gamma$ -karboksylazę reszt Gla w czynnikach krzepnięcia

## Fibrynolizyny

**Streptokinaza** – enzym  $\beta$ -hemolizujących streptokoków rozpuszczający skrzep

# 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
- ▶ koenzymy
- ▶ modyfikacje kowalencyjne –  
fosforylacja/defosforylacja → kinazy/fosfatazy
- ▶ efektory allosteryczne

# Modyfikacje kowalencyjne

- ▶ odwracalna fosforylacja reszt seryny, tyrozyny, treoniny
- ▶ odwracalna nukleotydacja
- ▶ proteolityczne cięcia – enzymy proteolityczne, krzepnięcie krwi

# Efektory allosteryczne

- ▶ aktywatory i inhibitory zmieniają szybkość reakcji enzymatycznych kluczowych enzymów wpływając na regulację szlaków metabolicznych
- ▶ hamowanie zwrotne – hamowanie przez produkt końcowy szlaku zapobiegające niepotrzebnemu wytwarzaniu nadmiaru końcowego produktu

# 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.

# Izoenzymy



# 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  $\leftrightarrow$

Kwas  $\alpha$  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  $\alpha$  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

# Izoenzymy transaminaz



# Amylaza

Hydrolizuje  $\alpha$  1,4-glikany zbudowane z co najmniej 3 reszt glukozy. Najwłaściwszymi substratami są jednak wielocukry należące do  $\alpha$ -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 (H), leukocyty, nerki, wątroba i mięśnie (M), 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: M<sub>4</sub>; H<sub>M</sub><sub>3</sub>; H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>; **H<sub>3</sub>M**; H<sub>4</sub>.

Kwas mlekowy + NAD  $\leftrightarrow$  kwas pirogronowy + NADH<sub>2</sub>

Wzrost aktywności obserwuje się:

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



# Izoenzymy LDH



# $\gamma$ Glutamylotranspeptydaza (GGT)

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



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:



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 (M)**, **mózgu (B)**, **sercu (MB)**, jelitach. Istnieją 3 izoenzymy specyficzne tkankowo – CK-MM; CK-BB; CK-MB.

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