

ENZYMY

- Struktura a funkce enzymů
- Klasifikace enzymů
- Názvosloví enzymů
- Klinicky významné enzymy

ENZYMY

- v lidském organismu je asi 3000 různých druhů enzymů
- i nejjednodušší buňky obsahují přes 3000 enzymů
- je známa asi miliarda enzymů, proto vznikl samostatný vědní obor- enzymologie
- typickým příkladem jsou trávicí enzymy:
 - enzymy ze skupiny hydroláz vylučované slinnými žlázami, žaludeční stěnou a slinivkou břišní do trávicího traktu, kde katalyzují štěpení potravy na menší vstřebatelné molekuly
 - dále jsou zde jsou obsaženy glykosidázy (štěpení polysacharidů), proteinázy (štěpení bílkovin) a lipázy (štěpení tuků)

ENZYMY

- enzymy jsou biokatalyzátory
- katalyzují většinu významných chemických reakcí, které probíhají v živém organismu
- enzymy jsou nepostradatelné především při metabolických procesech, při nichž vznikají nebo naopak rozkládají lipidy, sacharidy a bílkoviny
- enzymy působí specificky, neboť uskutečňují pouze určitý typ reakce
- v buňkách jsou enzymy buď volné v cytoplazmě, nebo vázané na buněčné struktury (membrány)

Struktura a funkce enzymů

- enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, které urychlují chemické přeměny
- jedna molekula enzymu přemění $5 \cdot 10^4$ molekul substrátu za sekundu
- pracují za tělesných podmínek:
 - teplota: 20 – 40°C
 - tlak: 0,1 MPa
 - pH: 7
- některé žaludeční enzymy jsou však aktivní i v silně kyselém prostředí
- za vyšších teplot a v přítomnosti těžkých kovů (olovo, rtuť) se enzymy znehodnocují

Struktura a funkce enzymů

- enzymy jsou netoxické a jejich účinek lze snadno regulovat
- patří mezi globulární bílkoviny a většinou mají povahu složených bílkovin
- poměrně rychle se opotřebovávají, a proto jsou stále odbourávány a opět syntetizovány
- enzymy jsou zastoupeny jak v těle (např.: slinná amylasa – sliny; pepsin – žaludek), tak i v jiných organických látkách (amylasa – slad)

Struktura a funkce enzymů

- určují povahu i rychlost chemických reakcí
- aktivita enzymů spočívá v ovlivnění rychlosti chemických reakcí
 - je závislá zejména na koncentraci substrátu, teplotě, pH, aktivátorech a inhibítorech
- enzymy nikdy nemění aktivační energii reakce
- vedou reakci jiným reakčním mechanismem
- celkový součet aktivačních energií je pak nižší

Struktura a funkce enzymů

- katalytická aktivita enzymů je ovlivňována jeho aktivním centrem, vytvářeným prostorovým uspořádáním bílkovinného (polypeptidového) řetězce
- katalytickou funkci může vykonávat buď jednoduchá nebo složená bílkovina
- složené enzymy – KOENZYMY, jsou tvořené bílkovinnou částí (apoenzym) a nebílkovinnou složkou (kofaktor), který se podílí na aktivní přeměně substrátu na produkt

Struktura a funkce enzynů

- kofaktory se dělí na prostetické skupiny, které jsou trvale vázané na bílkovinnou část a regenerují se ve stejné oblasti; ionty kovů, které se váží do aktivního centra enzymu nebo jsou nezbytné jako další katalyzátory reakce, a také koenzymy, které jsou vázány dočasně, regenerují se v jiné reakci a přenášejí především elektrony mezi jednotlivými atomy.
- mezi nejznámější koenzymy patří NAD (nikotinamidadeninukleotid), který je regenerován v dýchacím řetězci

Struktura a funkce enzymů

Izoenzymy

- enzymy, které katalyzují stejnou reakci, ale mají odlišnou strukturu
- jednotlivé izoenzymy se dají rozlišit různými separačními metodami (elektroforézou, imunochemicky)
- izoenzymy sice katalyzují tutéž reakci, mohou se však lišit v reakční kinetice
- možná odlišná struktura izoenzymů se projeví i v rozdílné citlivosti jednotlivých izoenzymů k podmínkám – (teplota, pH)
- v medicíně mají velký význam především ty enzymy, jejichž izoenzymy jsou orgánově, tkáňově či subcelulárně specifické
- stanovením katalytické aktivity příslušného izoenzymu (v krvi, plazmě) lze usuzovat na poškození nebo poruchu konkrétní části těla

Klasifikace enzymů

- podle typu katalyzované reakce se enzymy dělí (podle UIB – Mezinárodní unie biochemie) do šesti skupin:
 - EC 1 **oxidoreduktázy**: katalyzují oxidačně/redukční reakce
 - EC 2 **transferázy**: přenášejí funkční skupiny (například methyl-, acetyl- nebo fosfátovou skupinu)
 - EC 3 **hydrolázy**: katalyzují hydrolýzu chemických vazeb
 - EC 4 **lyázy**: štěpí chemické vazby jiným způsobem než hydrolýzou či redoxní reakcí
 - EC 5 **isomerázy**: katalyzují isomerizační reakce
 - EC 6 **ligázy**: spojují dvě molekuly kovalentní vazbou

Klasifikace enzymů

- kvůli obrovskému množství enzymů byla vytvořena databáze, kde jsou všechny doposud známé enzymy uloženy pod čtyřmístným číselným kódem
 - (S)-laktát: NAD⁺ oxidoreduktasa EC 1 1 1 27
 - třída – oxidoreduktasy 1
 - podtřída – donorem vodíku je skupina CHOH 1
 - skupina – akceptorem vodíku je NAD⁺ 1
 - číslo enzymu uvnitř skupiny 27

Klasifikace enzymů

- Podle místa působení můžeme enzymy rozdělit na:
 1. extracelulární – jsou vylučovány z buňky, které je vytvořily a nacházíme je v četných tkáňových kapalinách (krvi, mozkomíšním moku, trávicích šťávách)
 2. intracelulární – své specifické funkce vykonávají uvnitř buňky

Klasifikace enzymů

- Dělení hydroláz:
 - glykosidázy - štěpení polysacharidů
 - proteinázy - štěpení bílkovin
 - lipázy - štěpení tuků
- Proteinázy:
 - jsou proteolytické enzymy (dříve proteasy) ze skupiny C-N-hydroláz, katalyzující štěpení bílkovin a polypeptidů za vzniku peptidů a aminokyselin
 - proteolytické enzymy hrají významnou roli v trávicím traktu (pepsin, trypsin, chymotrypsin), kde ovlivňují odbourávání bílkovinné složky potravy, vyskytují se též v krvi (trombin), v buňkách (katepsin), v rostlinách (papain) i v mikroorganismech

Názvosloví enzymů

- název se tvoří z kmene názvu sloučeniny, která se účinkem enzymu mění, a připojením koncovky -asa (áza)
- například enzym působící štěpení sacharosy se nazývá sacharasa
- kromě těchto názvů se u nejdůležitějších enzymů používají triviální názvy (pepsin, trypsin)
- nejvýznamnější enzymy: pepsin, který je obsažen v žaludeční šťávě a společně s trypsinem (enzymem slinivky břišní) štěpí při trávení přítomné bílkoviny až na aminokyseliny

Použití enzymů

- Použití v potravinářském průmyslu - proteolytické enzymy se používají například v mlékárenském průmyslu jako syřidla nebo k přípravě hypoalergenického mléka. Enzymy lze využít i ke změkčování masa (papain). Pomocí enzymatického štěpení trisacharidů v luštěninách lze připravit takové luštěniny, které nenadýmají.
- Použití v technické chemii - enzymy se používají jako „biologická“ složka pracích prostředků (mikrobiální proteinázy)
- Použití v analytické chemii - využití enzymů jako značek na specifickém indikátoru (např. ELISA). Pomocí redoxních enzymů lze poměrně snadno stanovit koncentraci specifického substrátu pro daný enzym

Použití enzymů

- Použití v lékařství - enzymy lze podávat jako náhradu chybějících enzymů při poškození slinivky břišní, nebo moderně i v terapii některých lyzozomálních poruch.
- Místně lze enzymy použít k rozpouštění mrtvé tkáně v terapii bércových vředů.
- Systémová enzymoterapie (podání směsi několika enzymů s cílem ovlivnit především imunitní systém) je kontroverzní postup, jehož účinnost nebyla nikdy seriózně doložena.

Klinicky významné enzymy

- ALT - alaninaminotransferáza
- AST - aspartátaminotransferáza
- CK - kreatinkináza
- LD - laktátdehydrogenáza
- ALP - alkalická fosfatáza
- ACP – kyselá fosfatáza
- PCP - kyselá fosfatáza prostatická
- α -amyláza
- Lipáza
- GMT – gamaglutamyltransferáza
- CHE - cholinesteráza

Biochemické vyšetření pankreatu

- k rozsáhlému poškození pankreatické tkáně dochází především při **akutní pankreatitidě**
- jde o život ohrožující náhlou příhodu břišní, při které se aktivují trávicí enzymy pankreatické šťávy, což vede k natrávení tkáně slinivky břišní
- spouštěčem akutní pankreatitidy bývá nejčastěji přetlak ve společných pankreatických a žlučových vývodných cestách (při cholelitiáze) a alkoholismus
- rozpad pankreatických buněk vede k vylití jejich součástí do krve, v séru pak můžeme prokázat vysokou katalytickou koncentraci pankreatických enzymů, zejména **α -amylázy a pankreatické lipázy**

α -amyláza

- **AMS** (α -1,4- glukán-4-glukán-hydroláza, EC 3.2.1.1)
- hydrolyzuje glykosidovou vazbu; pH optimum α -amylázy je mezi 7,0–7,2
- v organismu se vyskytuje ve dvou formách – jako slinný a pankreatický izoenzym, podle jejich orgánového původu
- obě izoformy se od sebe liší cukernou složkou a lze je odlišit elektroforeticky, či podle precipitace pomocí protilátky
- je tvořena v buňkách pankreatu
- do střevního lumen se dostává ve formě pankreatického sekretu (šťávy) spolu s dalšími trávicími
- za fyziologických podmínek není molekula enzymu absorbována střevním povrchem a sérová hladina je nízká, odpovídající aktivitě enzymu uvolněného do cirkulace přímo ze žlázových buněk resp. lymfatickou drenáží
- molekulová hmotnost α -amylázy je 55 000
- z cirkulace je α -amyláza eliminována v ledvinách glomerulární filtrací

α -amyláza

- Pro klinickou diagnostiku se stanovuje hladina α -amylázy v séru, v moči a vypočítává se index clearance (odstraňování z organismu) amylázy/kreatininu
- Referenční hodnoty
 - **S-AMS** celková amyláza v séru 0,30–1,67 $\mu\text{kat/l}$
 - **U-AMS** celková amyláza v moči $< 7,67 \mu\text{kat/l}$
 - **S-pAMS** pankreatická amyláza v séru 0,22–0,88 $\mu\text{kat/l}$
 - **U-pAMS** pankreatická amyláza v moči $< 5,83 \mu\text{kat/l}$

α -amyláza

- z praktického hlediska je významným nálezem zvýšení aktivity α -amylázy v séru
- může být způsobeno:
 - **zvýšeným uvolňováním** amylázy z poškozených buněk pankreatu nebo slinných žláz
 - **snížením glomerulární filtrace**, kdy se tato malá bílkovina ztrácí do primitivní moče v menším rozsahu než obvykle
- **Hyperamylázemie** při poškození pankreatu nebo slinných žláz je při normálních renálních funkcích provázena i vzestupem aktivity amylázy v moči; je ovšem nutné přihlídnout k tomu, že se v moči objeví až s několikahodinovým zpožděním. V tomto případě zbývá rozlišit, zda amyláza pochází z pankreatu či slinných žláz. Nelze-li rozhodnout na základě klinického obrazu, dá odpověď stanovení izoenzymů
- Snížení glomerulární filtrace amylázy je nejčastěji důsledkem renální insuficience. V tomto případě bude hyperamylázemie provázena nízkou koncentrací a aktivitou amylázy v moči. Jinou, podstatně vzácnější příčinou snížení renální clearance amylázy je makroamylázemie

Lipáza

- triacylglycerolacylhydroláza, EC 3.1.1.3
- glykoprotein se 420 449 aminokyselinovými zbytky a molekulovou hmotností 46 000–56 000 u pankreatické lipázy a 32 000–39 000 u sérové lipázy
- hydrolytický enzym štěpící triacylglyceroly s mastnými kyselinami o delším řetězci než 12 uhlíků, v přítomnosti žlučových kyselin štěpí tuk na monoacylglyceroly a diacylglyceroly
- je produkována žlázovými buňkami pankreatu a secernována do střevního lumen v pankreatické šťávě
- koncentrační gradient mezi pankreatickou tkání a sérovou lipázou je cca 20 000:1

Lipáza

- **Vzestup koncentrace pankreatické lipázy je specifičtější známkou akutní pankreatitidy než α -amyláza**
- Její hladina v séru zůstává zvýšena asi dva týdny po akutní příhodě
- Podstatněji se nezvyšuje u renálních onemocnění

Laktátdehydrogenáza (LD)

- tetramerní enzym skládaný z podjednotek M a H
- podle počtu M a H podjednotek (nezáleží na pořadí) lze získat celkem 5 izoenzymů
 - LD1 (HHHH) - srdeční sval, červené krvinky, ledvina
 - LD2 (HHHM)
 - LD3 (HHMM) - monocyty
 - LD4 (HMMM) - monocyty
 - LD5 (MMMM) - játra
- LD je cytoplazmatický enzym, podílí se především na přeměně pyruvátu na laktát při anaerobní glykolýze
- tkáňová distribuce izoenzymů není příliš specifická, proto se již LD prakticky opouští při diagnostice poruch srdce a jater a nadále se používá především při sledování rozsahu hemolytických anémií a nádorových onemocnění

Kreatinkináza (CK)

- dimerní enzym skládaný ze dvou podjednotek B a M:
 - MM - sval
 - MB - srdce
 - BB - mozek
- funkcí kreatinkinázy je tvorba a zpětná mobilizace energetických zásob v kreatinfosfátu do ATP
- prakticky se používá jen stanovení izoenzymu MB při diagnostice **infarktu myokardu** - CK-MB
- obvykle se stanovuje hmotnost izoenzymu (CK-MB mass)

Alkalická fosfatáza (ALP)

- membránově vázaný enzym vyskytující se ve formě několika izoenzymů:
 - střevní ALP
 - placentární ALP
 - tkáňová ALP
 - jaterní ALP
 - kostní ALP
 - ledvinná ALP
- změny ALP mohou odpovídat poměrně širokému spektru onemocnění

Kyselá fosfatáza

- sérová kyselá fosfatáza zahrnuje 5 izoenzymů, které pocházejí především z erytrocytů, destiček, slinivky a jaterních buněk, ledvin, kostí a epiteliálních buněk prostaty
- prostatická kyselá fosfatáza PCP (izoenzym 2) je vytvářena především v prostatě
- hladina celkové a prostatické kyselé fosfatázy se zvyšuje při progresivních, metastazujících karcinomech prostaty

Aspartátaminotransferáza

- **AST (EC 2.6.1.1)**
- katalyzuje reverzibilní přenos aminoskupiny z aspartátu na 2-oxoglutarát
- AST se ve větší míře vyskytuje v řadě orgánů – v játrech, myokardu, kosterním svalstvu, ledvinách, pankreatu a v erytrocytech
- existuje ve formě dvou izoenzymů
 - mitochondriálního, který je přítomen v mitochondriích a představuje asi 70 %
 - cytoplazmatického, lokalizovaného v cytoplazmě, který je zastoupen asi 30 %
- cytoplazmatická frakce se uvolňuje do cirkulace snadno i při mírném poškození hepatocytů (při narušení permeability buněčné membrány hepatocytu)
- mitochondriální frakce se dostává do krve až při nekróze (rozpadu) jaterní buňky
- výrazné zvýšení aktivity AST v séru je známkou rozpadu hepatocytů, neboť do cirkulace se uvolňují oba izoenzymy

Aspartátaminotransferáza

- protože AST není specifická pouze pro jaterní tkáň, její zvýšení může doprovázet i poškození kosterního svalstva a myokardu.
- AST stoupá v krvi u akutního IM a po operacích srdce, ale i po dlouhotrvající fyzické námaze
- Stanovení AST falešně pozitivně ovlivňuje hemolýza, neboť v erythrocytech je obsažena v poměrně vysokém množství
- **Fyziologické hodnoty S-AST**
 - muži do 0,85 $\mu\text{kat/l}$
 - ženy do 0,60 $\mu\text{kat/l}$

Alaninaminotransferáza

- ALT (EC 2.6.1.2)
- katalyzuje transaminační reakci, při níž se reverzibilně přenáší aminoskupina z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a laktátu
- ALT je obsažena nejvíce v játrech, v jiných orgánech (kosterní sval, myokard a další) je její aktivita mnohem nižší.
- na rozdíl od AST je lokalizována pouze v cytoplazmě

Alaninaminotransferáza

- stanovení ALT je citlivým a relativně specifickým testem pro poškození hepatocytu
- její aktivita v séru se zvyšuje již při malém poškození jaterní buňky, které je způsobeno zvýšenou propustností cytoplazmatické membrány
- u zánětu jater (např. virová hepatitida) je zvýšení ALT nejčasnějším indikátorem porušení celistvosti membrány hepatocytu
- sledování ALT je vhodné pro monitování průběhu onemocnění

- Fyziologické hodnoty S-ALT
 - muži do 0,80 $\mu\text{kat/l}$
 - ženy do 0,60 $\mu\text{kat/l}$

Gama - glutamyltransferáza

- γ - glutamyltransferáza - GGT, GMT (EC 2.3.2.2)
- klíčový enzyme γ - glutamylového cyklu, který zabezpečuje transport některých aminokyselin a peptidů přes buněčnou membránu z extracelulární tekutiny do buněk
- GMT se vyskytuje v membránách buněk s vysokou sekreční nebo absorpční kapacitou
- v játrech je GMT lokalizována v mikrosomální frakci hepatocytů a v membránách buněk výstelky žlučových cest
- vysoké koncentrace jsou také v proximálních tubulech ledvin, v enterocytech a v pankreatu

Gama - glutamyltransferáza

- syntézu GMT indukují některé látky (barbituráty, antidepressiva, alkohol)
- GMT se také může uvolnit z membrán detergentním působením, např. žlučových kyselin nebo alkoholu
- zvýšení GMT je typické především pro poškození hepatobiliárního traktu:
 - intrahepatální nebo extrahepatální cholestáza – v těchto případech je zvýšena i ALP
 - hepatocelulární poškození – akutní a chronická jaterní onemocnění
 - vysoké izolované zvýšení GGT může být známkou poškození jater z důvodů chronického požívání alkoholu; zvýšená aktivita je u alkoholiků i v případě, že ještě nejsou poškozena játra (indukce syntézy GGT)
 - nádory jater a pankreatu

Gama - glutamyltransferáza

- fyziologické hodnoty fS-GGT
 - muži 0,14–0,84 $\mu\text{kat/l}$
 - ženy 0,14–0,68 $\mu\text{kat/l}$
- fyziologicky jsou vyšší hodnoty GGT u mužů vzhledem k vyššímu obsahu v prostatě

Cholinesteráza

- Jako **cholinesterázy** se v biochemii označuje skupina enzymů, které katalyzují hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou
- **reakce nezbytná k tomu, aby se cholinergní neuron vrátil po aktivaci do klidového stavu**
- existují dva typy cholinesteráz:
 - acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7, AChE), též známá jako erytrocytová cholinesteráza či nejformálněji jako acetylcholinová acetylhydroláza, obsažená především v krvi a v nervových synapsích
 - pseudocholinesteráza (EC 3.1.1.8, BChE nebo BuChE), též známá jako plazmová cholinesteráza, butyrylcholinesteráza či nejformálněji jako acylcholin acylhydroláza, obsažená primárně v játrech

Cholinesteráza

- podle nomenklatury enzymů je CHOLINESTERÁZA oficiální název pro acylcholin acylhydrolázu (EC 3.1.1.8) vyskytující se v plazmě
- syntéza cholinesterázy a s tím i její aktivita v plazmě klesá v případě poškození jaterního parenchymu nebo při nedostatku proteinů v dietě
- z genetického hlediska je známo 7 alel kódujících cholinesterázu
- varianty enzymu jsou klinicky významné, neboť způsobují daleko větší citlivost na přítomnost inhibitorů, případně mají jen nízkou aktivitu. Následkem je citlivost na myorelaxans sukcinylcholin (suxamethonium). Homozygoti trpí prodlouženou zástavou dechu po podání této látky ve spojení s chirurgickou anestézií.

Cholinesteráza

- rozdíl mezi oběma typy cholinesteráz spočívá v preferenci substrátu
 - první z nich hydrolyzuje rychleji acetylcholin
 - druhá butyrylcholin
- vzhledem k význačné funkci enzymu, jsou chemikálie interferující s jejím účinkem potentními neurotoxiny - v malých dávkách způsobují výrazné slinění a slzení, při vyšších svalové křeče a případně i smrt
- to se týká například hadích jedů nebo nervových plynů (sarin)
- mezi léčiva působící proti takovým inhibitorům patří například pralidoxim

Cholinesteráza

- inhibiční účinek na cholinesterázu mají také benzodiazepiny
- kromě použití jako biochemické zbraně se anticholinesterázy používají také pro reverzační medikaci paralýzy vyvolané při anestezii, a dále také pro léčbu glaukomu a Alzheimerovy nemoci
- kromě akutní otravy se může objevit také semiakutní otrava charakterizovaná silnými duševními poruchami
- dlouhodobá expozice může způsobit vrozené vady
- *další oblastí použití je usmrcování hmyzu (insekticidy)*