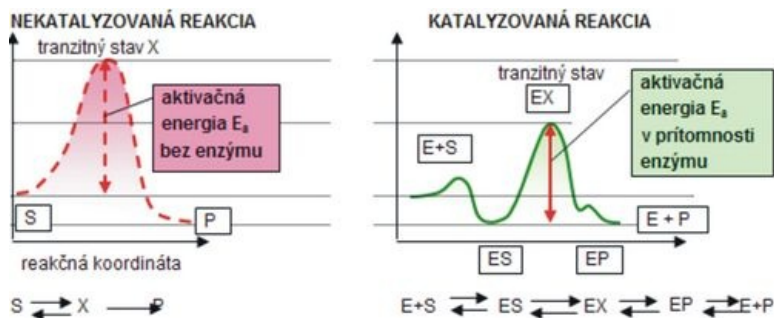


# Enzýmy (cvičenie z biochémie)

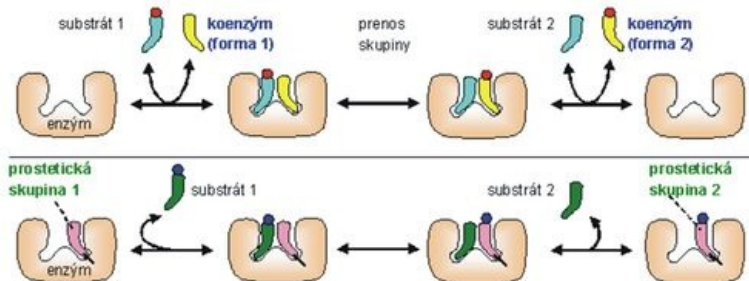
Enzýmy sú katalyzátory biochemických procesov prebiehajúcich v živých organizmoch, a preto sú často nazývané biokatalyzátory. Keďže ide o látky bielkovinovej povahy, vznikajú rovnako ako iné proteíny proteosyntézou, ktorá je regulovaná podľa požiadaviek bunky a organizmu. Enzýmy sú štiepené proteinázami a majú svoj biologický polčas života. Molekuly enzýmu majú definované priestorové usporiadanie – konformáciu. Tá umožňuje, aby určité bočné reťazce aminokyselín sa dostali do vzájomnej blízkosti a vytvorili tzv. **aktívne miesto** enzýmu. Na toto miesto sa viaže substrát (S) (látka, ktorá sa má premieňať), vzniká labilný medziprodukt – komplex enzým – **substrát** (ES), ktorý sa samovoľne rozpadá na produkt (P) reakcie a enzým (E). Enzýmy urýchľujú **ustálenie** chemickej rovnováhy reakcie **znížením aktivačnej energie** –  $E_a$  (obr. 1).



Aktivačná energia hypotetickej reakcie bez enzýmu - nekatalyzovanej reakcie a v prítomnosti enzýmu - katalyzovanej reakcie. Porovnajte veľkosť aktivačných energií.  
S=substrát P=produkt E=enzým ES=enzým-substrátový komplex X=tranzitný stav

Enzýmy obsahujú často aj nebielkovinovú zložku, **prostetickú skupinu** alebo **koenzým** (obr. 2). Bielkovinová zložka enzýmu (holoenzýmu) sa nazýva apoenzým. Koenzým sa slabo viaže na **apoenzým** a môže od neho oddissociovať. Prostetická skupina sa z apoenzýmu neuvolňuje, ale je na neho pevne naviazaná. V súčasnosti sa často používa všeobecnejší pojem **kofaktor**, ktorý nerozlišuje spôsob väzby.

**Enzým** (holoenzým) = **apoenzým** + **kofaktor** (prostetická skupina, koenzým)



## Rozdelenie a katalytická aktivita enzýmov

V nasledujúcej tabuľke (tab. 1) sú prehľadne uvedené jednotlivé triedy enzýmov a schematicky zobrazené ich účinky (typ reakcie, ktorú jednotlivé enzýmy katalyzujú). V tabuľke sú uvedené aj príklady niekoľkých konkrétnych kofaktorov.

Trieda	typ reakcie	dôležité podtriedy
1. Oxidoreduktázy		dehydrogenázy oxidázy, peroxidázy reduktázy monooxygenázy dioxygenázy
2. Transferázy		C1-transferázy glykozyltransferázy aminotransferázy fosfotransferázy
3. Hydrolázy		esterázy glykozidázy peptidázy amidázy
4. Lyázy (syntázy)		C-C-lyázy C-O-lyázy C-N-lyázy C-S-lyázy
5. Izomerázy		epimerázy cis-trans-izomerázy intramolekulové transferázy
6. Ligázy (syntetázy)		C-C-ligázy C-O-ligázy C-N-ligázy C-S-ligázy

## Vyjadrenie enzýmovej aktivity

Aktivity enzýmov sú vyjadrované v jednotkách podľa medzinárodnej sústavy jednotiek (Systeme International d'Unites – SI) a doporučená IFCC (International Federation of Clinical Chemistry). Jednotkou na vyjadrovanie enzýmovej aktivity v sústave SI je **katal** (kat), ktorý je najčastejšie používaný v prepočte na 1 liter biologickej tekutiny.

Definícia: 1 kat je taká aktivita enzýmu, ktorá premení 1 mol substrátu za 1 s.

V odbornej biochemickej ako aj medicínskej praxi sa stále stretávame s medzinárodnou jednotkou U, ktorá sa oficiálne používala do roku 1980. Medzinárodnou jednotka U bola definovaná ako aktivita enzýmu, ktorá premení 1 μmol substrátu za 1 min pri 25 °C. Keďže sa stále používa uvádzame základný vzájomný prepočet týchto jednotiek:

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1} = 60 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} = 60,106 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} = 6,107 \text{ U}$$

## Kinetika enzýmových reakcií

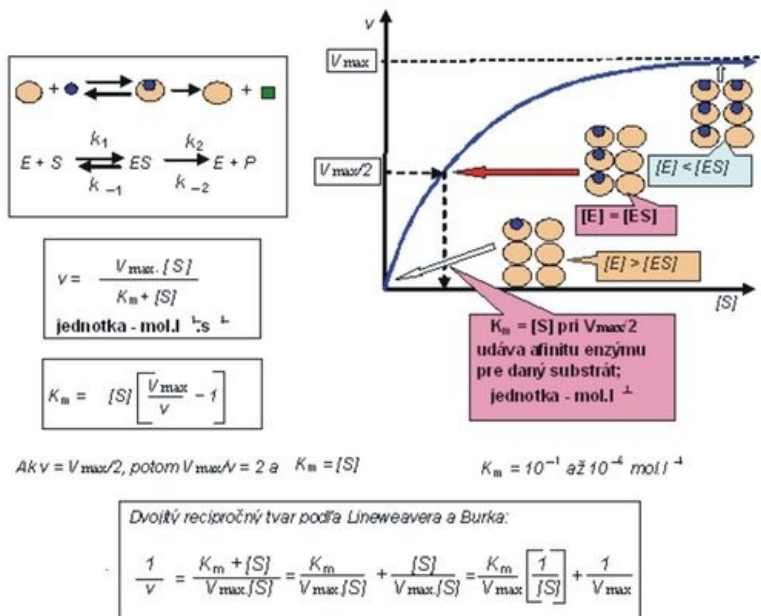
Michaelisová konštanta ( $K_m$ ) je definovaná ako koncentrácia substrátu, pri ktorej je rýchlosť enzýmovej katalyzovanej reakcie polovičná.  $K_m$  je základnou kinetickou konštantou, ktorá je pri daných podmienkach (pH, teplota, zloženie reakčnej zmesi a pod.) pre každú dvojicu enzým – substrát charakteristická. Je vyjadrená vzťahom upravenej rovnice Michaelisa-Mentenovej:

$$K_m = [S] \cdot \left[ \frac{V_{max}}{V - 1} \right]$$

### Stanovenie $K_m$

**$K_m$  môžeme stanoviť (obr. 3):**

- z grafického znázornenia závislosti reakčnej rýchlosti od koncentrácie substrátu, pričom určitú ťažkosť spôsobuje určenie maximálnej rýchlosti s dostatočnou presnosťou
- úpravou rovnice Michaelisa-Mentenovej, v ktorej hyperbolická závislosť je premenená na priamkovú, získavame presnejší vzťah pre výpočet  $K_m$ . Najbežnejšia je úprava podľa Lineweavera a Burka, v ktorej sa vyhodnocujú prevrátané hodnoty rýchlosti a koncentrácie substrátu.

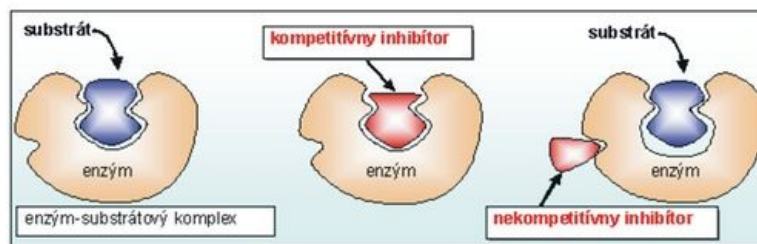


( $V_{max}$  - maximálna rýchlosť,  $K_m$  - Michaelisova konštanta - predpokladom je, že  $[E] = \text{konšt.}$ )

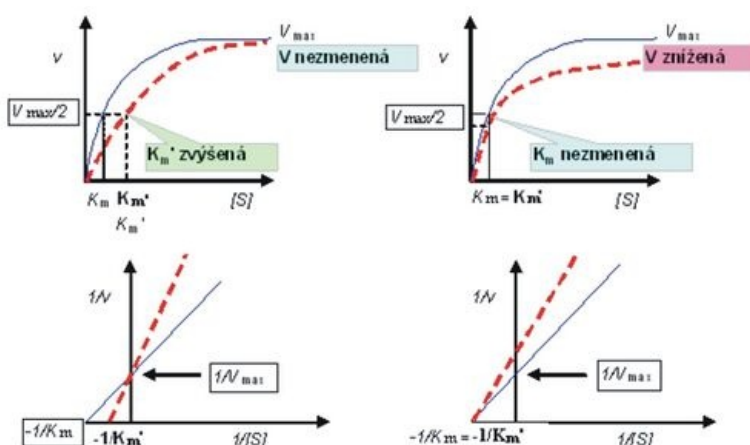
## Typy inhibície enzýmovej aktivity

Enzýmy sa vyznačujú vysokou špecifickosťou voči substrátu (substrátová špecifickosť) i typu katalyzovanej reakcie (účinková špecifickosť). Ich aktivita sa môže rýchlo meniť v závislosti od potrieb bunky i celého organizmu.

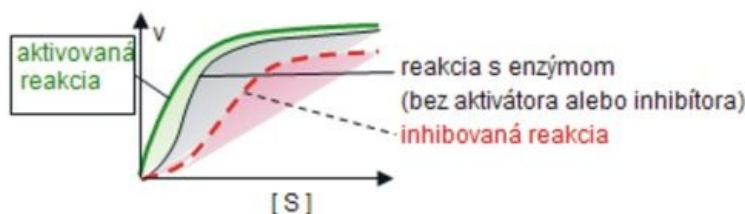
**Aktivátory** stimulujú a **inhibítory** inhibujú rýchlosť enzýmových reakcií. Inhibícia môže byť reverzibilná a ireverzibilná. Pri reverzibilnej inhibícii sa jedná na rozdiel od ireverzibilnej inhibície o nekovalentnú väzbu inhibítora, pričom poznáme inhibíciu kompetitívnu, nekompetitívnu a akompetitívnu. Na obr. 4 je znázornené rozlíšenie medzi kompetitívnym a nekompetitívnym inhibítorom.



Na nasledujúcom obrázku (obr. 5) je vplyv koncentrácie substrátu ( $S$ ) na rýchlosť ( $v$ ) enzýmovej reakcie v závislosti od inhibítora a závislosť  $K_m$  od typu inhibície:



(modrá čiara bez inhibítora, červená s inhibítorom - vľavo kompetitívnym a vpravo nekompetitívnym)



# Faktory ovplyvňujúce rýchlosť enzýmovej reakcie

V živej bunke sú enzýmy usporiadané tak, aby jednotlivé reakcie na seba plynulo nadväzovali, takže často vytvárajú tzv. multienzymové komplexy. V porovnaní s anorganickými katalyzátormi sú enzýmy omnoho účinnejšie, ale aj citlivejšie na vonkajšie vplyvy (teplotu, pH a pod.). Enzymovo katalyzované reakcie prebiehajú v živom organizme (i v skúmavke) rôznou rýchlosťou, ktorá závisí od:

- koncentrácie substrátu
- koncentrácie enzýmu
- teploty
- reakčného prostredia (pH)
- prítomnosti aktivátorov a inhibítorov

## Koncentrácia substrátu

Koncentrácia substrátu, pri ktorej reakčná rýchlosť enzýmom katalyzovanej reakcie zodpovedá polovičnej hodnote maximálnej rýchlosti sa nazýva **Michaelisova konštanta** -  $K_m$  enzýmu danej reakcie (obr. 3).

## Koncentrácia enzýmu

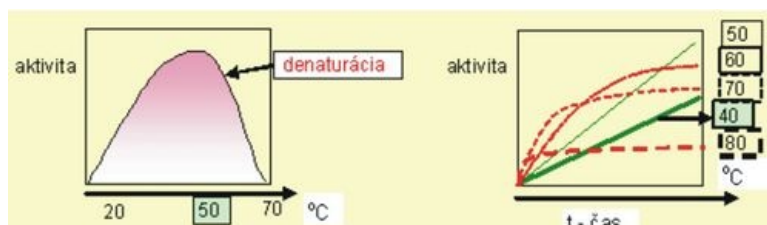
Pre rýchlosť  $V_{max}$  enzýmovej reakcie pri vysokých koncentráciach substrátu platí:

$$V_{max} = k \cdot [E]_T = \text{konšt.}$$

Všetky experimenty pre zistenie vplyvu koncentrácie enzýmu na rýchlosť reakcie sa musia robiť pri nadbytku substrátu, kedy už reakcia nie je závislá na vplyve jeho koncentrácie.

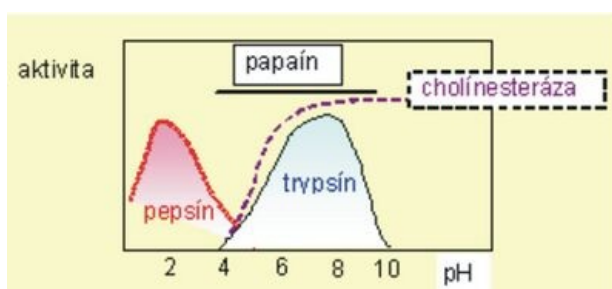
## Vplyv teploty na aktivitu enzýmov

Ďalším významným faktorom, ktorý ovplyvňuje katalytickú aktivitu enzýmu je **teplota** (obr. 6). So zvyšovaním teploty sa zvyšuje aktivita enzýmov (v rozmedzí od 20–50 °C) približne dvojnásobne. Pri vyšších teplotách sa postupne rýchlosť reakcie znižuje, pretože enzýmy denaturujú (až na výnimky – napr. enzýmy termostabilných baktérií). Teplota, pri ktorej enzým vykazuje maximálnu aktivitu sa nazýva **teplotné optimum** enzýmu. Pre väčšinu enzýmov je teplotné optimum v rozmedzí 35–45 °C. Pri teplotách okolo bodu mrazu reakcie takmer neprebiehajú. K uchovávaniu biologického materiálu sa využíva hlbokého zmrazenia na –20 °C, kedy sa enzýmové reakcie úplne zastavujú.



## Vplyv pH na aktivitu enzýmov

Jedným z faktorů, který výrazně ovlivňuje aktivitu enzýmu je **hodnota pH** prostredia. Použitie silne kyslých alebo silne alkalických roztokov môže zapríčiniť až denaturáciu enzýmu a tým stratu biologických vlastností. Menej drastické zmeny pH prostredia ovplyvňujú aktivitu zmenou stupňa disociácie funkčných skupín enzýmu a substrátu, prípadne k zmenou konformácie molekuly enzýmu. To zmení schopnosť substrátu viazať sa s enzýmom. Väčšina enzýmov vykazuje maximálnu aktivitu v rozmedzí hodnôt pH 5–8 a táto oblasť sa nazýva optimum pH. Pochopiteľne existujú výnimky a niektoré enzýmy majú pH-optimum pri značne odlišných hodnotách, napr. pre pepsín je to pH 1,5–2,5 alebo pre alkalickú fosfatázu 9,5–9,7. Graficky vyjadrená závislosť rýchlosti reakcie od pH má obvykle tvar zvonovitej krivky s vrcholom pri optimálnom pH (obr. 7).



Katalytickú aktivitu enzýmu taktiež ovplyvňuje zmena iónovej sily roztoku a zloženie pufru, oxidoredukčné podmienky, ionizujúce žiarenie alebo prídavok inhibítorov či aktivátorov.

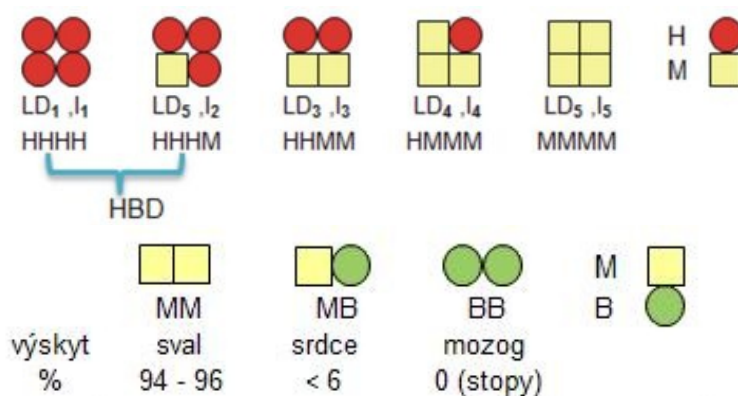
# Enzymy v klinickej diagnostike

Enzymy v bunkách ovplyvňujú biologické pochody tým, že sa zúčastňujú regulácie metabolických a funkčných procesov. Poškodenie buniek môže viesť k zmenám v aktivitách enzýmov a po poškodení buniek sa enzýmy môžu uvoľniť do krvi. Z hľadiska samotných biochemických metód je u pacienta potrebné hodnotiť dynamiku zistených zmien a nie je možné sa spoliehať len na posúdenie jedného vyšetřovaného parametra.

## Izoformy enzýmov

Stanovenie izoenzýmov má význam pre zvýšenie diagnostickej špecifity. Rozlišujeme **pravé izoenzýmy**, ktoré sú kódované rôznymi štruktúrnymi génmi a pseudoizoenzýmy, ktoré majú rovnaký genetický základ, ale líšia sa posttranslačnými úpravami (posttranslačné varianty napr. ALP – **pseudoizoenzýmy** žľazových ciest, nádorových buniek). Pravé izoenzýmy vznikajú:

- modifikáciou génov v rôznych lokusoch (rovnaké u všetkých ľudí, vznikli v priebehu evolúcie), napr. izoenzýmy AST – mitochondriálne, cytoplazmatické alebo ALP – črevné, tkanivovo nešpecifické (pečeň, kosť, obličky), placentárne, fetálne;
- modifikáciou génov v rovnakom lokuse, rôznej alely (vrodenej variácie génu), napr. glukóza-6-P-dehydrogenáza bola z erytrocytov rôznych ľudí izolovaná vo viac ako 150 izoformách;
- ako tzv. hybridné izoenzýmy kombináciou minimálne 2 podjednotiek kódovaných odlišnými štruktúrnymi génmi, napr. laktátdehydrogenáza (LD, obr. 8) obsahujúca podjednotky H (heart) a L (muscle) alebo kreatínkináza (CK, obr. 9) zložená z podjednotiek B (brain) a M (muscle).



## Využitie stanovenia izoenzýmov v sére

Izoenzýmy katalyzujú rovnakú reakciu, ale ich molekuly sa líšia svojimi fyzikálno chemickými, kinetickými a imunologickými vlastnosťami. Tieto rozdiely sa môžu prejavovať napríklad vzťahom izoenzýmov k inhibítorom, v špecifite katalyzovaných reakcií, v rôznej odolnosti voči denaturačným vplyvom, majú rôzne pH optima a líšia sa v bielkovinovej zložke.

## Enzymy v krvi

Stanovenie aktivít enzýmov v sére patrí spolu s ďalšími metódami klinickej biochémie medzi dôležité vyšetřenia, ktoré pomáhajú lekárovi určiť či potvrdiť diagnózu a informujú o priebehu ochorenia. Aby boli správne interpretované hodnoty enzýmových aktivít, je potrebné poznať faktory, ktoré ich aktivitu v sére ovplyvňujú a ktoré určujú aj vhodnosť vyšetřenia určitých enzýmov v priebehu ochorenia.

## Faktory ovplyvňujúce aktivitu enzýmov v krvi

### Pôvod a úloha enzýmov

Enzymy, ktoré sa nachádzajú v plazme môžeme rozdeliť na **sekréčne** a **bunkové**. **Sekréčne enzýmy** sa uvoľňujú do prostredia a môžeme ich rozdeliť na:

- **funkčné enzýmy plazmy** – ich úlohou je katalyzovať reakcie prebiehajúce v krvnom riečisti. Patria sem napr. enzýmové komplexy zúčastňujúce sa na zrážaní krvi. Niektoré z týchto enzýmov vznikajú v pečeni a preto ich aktivita v plazme pri jej poškodení klesá.
- **funkčné enzýmy GIT (špecifické)** – katalyzujú reakcie prebiehajúce v GIT a tým umožňujú trávenie a vstrebávanie zložiek prijatej potravy. Do tejto skupiny patria napr. pankreatické enzýmy (napr. amyláza, lipáza, trypsin). Pri prekážke v cestách, ktorými sa tieto enzýmy dostávajú do tráviacej rúry, alebo pri väčšom poškodení buniek v ktorých sa tvoria, aktivita týchto enzýmov v sére stúpa.

**Bunkové enzýmy** predstavujú veľkú skupinu enzýmov, ktoré majú svoju úlohu v metabolizme buniek a do krvného riečiska sa dostávajú pri ich rozpade alebo poškodení. Výrazne stúpa ich aktivita v sére pri poškodení orgánov z ktorých pochádzajú. Patria sem napr. transaminázy, kreatínkináza, glutamátdehydrogenáza. Malá časť týchto enzýmov sa uvoľňuje do krvného riečiska aj za fyziologických podmienok.



**Aktivity jednotlivých enzýmov v bunkách** Špecifické úlohy orgánov a buniek úzko súvisia s ich metabolizmom. Rozličné orgány a bunky preto obsahujú aj rozdielne množstvá enzýmov (tab. 2). Rozličné aktivity enzýmov v orgánoch patria medzi hlavné faktory, od ktorých závisí aj zmena ich aktivít v sére. Vzhľadom na neustálu prestavbu orgánov, môžeme ich aktivitu v sére dokázať aj za fyziologických podmienok.

**Tab. 2 Aktivity vybraných enzýmov**

Enzým	Pečeň	Srdce	Kostrový sval	Erytrocyty	Sérum
	nkat.g-1				nkat.ml-1
AST	980	870	600	13,34	0,4
ALT	580	48	57	1,7	0,4
LD	2 420	2 068	2 450	600	4
CK	12	5 830	33 840	< 0,1	0,83
GMD	630	18	8	< 0,1	0,06
Aldoláza	95	82	800	16,7	0,07

Ďalším faktorom, ktorý vplýva na hladinu enzýmov v krvi je **rýchlosť uvoľňovania enzýmov do séra**, ktorá môže byť ovplyvnená predovšetkým väzbou enzýmu na bunkové častice, fyzikálno chemickými vlastnosťami molekuly enzýmu a lokalizáciou enzýmu v bunke. Enzýmy, nachádzajúce sa v cytoplazme sa pri poškodení bunkovej membrány môžu uvoľniť do prostredia skôr ako napr. enzýmy viazané v mitochondriách. Enzýmy sa do krvného riečišťa dostávajú nielen pri rozpade bunky, ale aj po jej poškodení napr. nedostatkom kyslíka, či škodlivými látkami. Tieto procesy môžu zvýšiť priepusnosť bunkovej membrány a za týchto podmienok zohrávajú dôležitú úlohu aj veľkosť, náboj a tvar bielkovinovej molekuly enzýmu ako aj jeho lokalizácia.

K rozhodujúcim faktorom, ktoré ovplyvňujú úroveň aktivity enzýmu v sére a čas trvania jej vzostupu po uvoľnení do krvi, patria **inaktivácia a eliminácia** enzýmov. Obidva faktory závisia od vlastností molekúl enzýmov a systémov, ktoré enzýmy eliminujú. Na vyjadrenie poklesu aktivity enzýmov v sére používame ako ukazovateľ rýchlosť inaktivácie alebo eliminácie – **biologický polčas rozpadu enzýmu ( $t_{1/2}$ )**, ktorý vyjadruje za aký čas poklesne aktivita enzýmu na polovičnú hodnotu. Biologický polčas patrí medzi faktory, ktoré bezprostredne vplyvajú na diagnostické využitie jednotlivých enzýmov (vhodnosť ich vyšetrenia v priebehu ochorenia). V nasledujúcej tabuľke sú uvedené vybrané polčasy eliminácie niektorých dôležitých enzýmov v sére.

Enzým	$t_{1/2}$	Enzým	$t_{1/2}$
amyláza	3–6 h	ALT	47 h
lipáza	3–6 h	LD1	113 h
LD5	10 h	HBD	113 h
CK	15 h	GMT	3–4 dni
AST	17 h	ALP	3–7 dni
GMD	18 h	CHS	10 dní

Nie zanedbateľný vplyv na aktivitu enzýmov v krvi má aj **charakter chorobného procesu**. Fáza a rozsah poškodenia tkaniva chorobným procesom určuje i množstvo uvoľnených enzýmov z buniek do plazmy. Tento pochod môže byť ovplyvnený stupňom cievneho zásobenia v mieste patologických zmien, rýchlosťou cirkulácie v tejto oblasti a prítomnosťou/chýbaním zápalovej bariéry, ktorá ohraničuje poškodenú časť tkaniva od okolia.

Pri interpretácii zvýšených hladín enzýmov v sére je dôležité posúdiť aj ďalšie faktory ako sú napr. vek, pohlavie, telesná aktivita, bilancia tekutín, lieky, alkohol, ale aj interferencia z hľadiska orgánových zmien, či interferencie z metodických príčin – tzv. **nešpecifické ovplyvňovanie aktivity enzýmov**.

## Diagnosticky významné enzýmy

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené vybrané klinicky významné enzýmy.

Enzým (skratka)	Zvýšené hodnoty	Znížené hodnoty
Alanínaminotransferáza (ALT)	rôzne ochorenia pečene	
Alkalická fosfatáza (ALP)	fyziologické v období rastu a v gravidite, ochorenia pečene a žlčových ciest, ochorenia kostí, rekonvalescencia po zlomeninách, niektoré nádory	znížená funkcia štítnej žľazy, Wilsonova choroba, nedostatok zinku
Amyláza (AMS)	zápal pankreasu, zápal gl. parotis, rôzne ochorenia orgánov v brušnej dutine	
Aspartátaminotransferáza (AST)	ochorenia pečene, poškodenie priečne pruhovaného svalu, poškodenie srdcového svalu	zlyhanie pečene
Elastáza	ochorenia pankreasu	
3-hydroxybutyrátdehydrogenáza (HBDH)	sledovanie priebehu ochorenia infarktu myokardu	
Glutamyltransferáza (GMT)	ochorenie žlčových ciest a pečene (najmä toxické poškodenie – lieky, alkohol)	
Cholinesteráza (CHS)		ochorenia pečene, intoxikácia organofosfátmi, hyperkatabolizmus
Kreatínkináza (CK)	infarkt myokardu (CK-MB), ochorenia kostrového svalstva, intramuskulárne injekcie, telesná aktivita (CK-MM), ochorenia mozgu, niektoré nádory (CK-BB)	
Kyslá fosfatáza (ACP)	nadprodukcia parathormónu, nádory prostaty, nádory kostí	
Laktátdehydrogenáza (LD)	infarkt myokardu, anémie (LD1,2), pľúcne embólie (LD3), ochorenia pečene, ochorenia kostrového svalstva (LD4,5), nádory (LD3–5)	
Lipáza (LPS)	zápal pankreasu	
Trypsín	ochorenia pankreasu	juvenilný diabetes, cystická fibróza
Tymidínkináza	nádory, vírusové infekcie	
Väčšina koagulačných faktorov	poruchy koagulácie	poruchy koagulácie

## Distribúcia diagnosticky významných enzýmov v tkanivách

V nasledujúcej tabuľke je uvedená distribúcia vybraných klinicky významných enzýmov.

Enzým	ACP	ALP	AMS	ALT	AST	CK	GMT	CHS	LD	LPS
Erytrocyty	**				*				*	
Kosti	*	**								
Kostrový sval				*	*	**			*	
Myokard					*	**			*	
Obličky				*	*		*		*	
Pankreas			**		*		**			***
Pečeň				*	*		***	***	*	
Prostata	***									
Žlčové cesty		**								

LD je príkladom enzýmu, ktorý sa vyskytuje nielen v tkanivách schopných anaeróbného metabolizmu (erytrocyty, svaly), ale aj v orgánoch, v ktorých dochádza k oxidácii laktátu cez pyruvát a acetylCoA (srdce, neuróny) alebo glukoneogenéze (pečeň). Zvýšená hladina LD v plazme môže indikovať poškodenie takéhoto orgánu, čo môžeme využiť v diagnostike. CK séra pochádza z 96 % z kostrového svalstva a 4 % z myokardu. Pri poškodení kostrového svalstva stúpa celková aktivita CK. Pri podozrení na infarkt myokardu je dôležité vylúčiť poškodenie kostrového svalstva.