

Enzymy

Enzymy jsou bílkoviny, které působí jako **biologické katalyzátory**. Podobně jako ostatní katalyzátory snižují aktivační energii chemické reakce a tím urychlují její průběh. Enzymy neovlivňují hodnotu rovnovážné konstanty reakcí, pouze způsobují, že systém dosáhne rovnováhy rychleji. Účinkem enzymů jsou tak umožněny děje, které by jinak za normálních teplot vůbec neprobíhaly.

Většina reakcí probíhajících v živých organismech probíhá za účasti enzymů. Látky, které podléhají přeměnám v enzymových reakcích, se nazývají **substráty**. Při enzymové reakci se substrát (S) přechodně váže k enzymu (E) za vzniku *komplexu enzym-substrát* (ES).



K vazbě substrátu na enzym dochází v tzv. **aktivním centru**, což je specifická oblast bílkovinného řetězce, která vzniká přiblížením postranních skupin určitých aminokyselin (v řetězci často i dosti vzdálených). Vazba mezi enzymem a substrátem v aktivním centru je zpravidla nekovalentní (vodíkové můstky, elektrostatické a hydrofobní interakce), zřídka může být i kovalentní. V aktivním centru dochází k místnímu zvýšení koncentrace substrátů a jejich optimální orientaci, což vede ke zvýšení reakční rychlosti. Po skončení reakce je produkt (P) uvolněn z aktivního místa enzymu. Katalytický účinek některých enzymů závisí také na neproteinové složce, nazývané obecně jako **kofaktor**. Kofaktory pevně vázané na strukturu enzymů se označují jako *prostetické skupiny* (např. ionty kovů Mn^{2+} , Mg^{2+} , FMN, FAD), kofaktory vázané volněji jako *koenzymy* (např. NADH). Kofaktory jsou často deriváty vitaminů.

Enzymy jsou **vysoce specifické**, katalyzují vždy pouze určitý typ chemické přeměny, působí specificky na jediný substrát (nebo na skupinu strukturně blízké příbuzných látek).

Enzymy jsou **regulovatelné**. Řízenou proteosyntézou může být ovlivněno množství enzymu, které má buňka k dispozici a tím i množství produktů enzymové reakce. Další úroveň regulace enzymové aktivity spočívá v aktivaci a inaktivaci enzymů (např. působením aktivátorů a inhibitorů, částečnou proteolýzou, kovalentní modifikací).

Názvosloví enzymů

V názvosloví enzymů se nejvíce uplatňují triviální názvy. Jsou nejčastěji utvořeny připojením koncovky *-asa* k názvu substrátu (amylasa, lipasa, sacharasa), případně je v názvu zahrnut i typ katalyzované reakce (laktátdehydrogenasa, pyruvátdekarboxylasa). U některých enzymů přetrvávají názvy historické, např. trypsin, pepsin, trombin, rennin).

V současné době je vypracován zcela jednoznačný systém nomenklatury enzymů Mezinárodní biochemickou unií (IUB). Pro každý enzym je zde uveden systémový název a doporučený triviální název. Např. enzym katalyzující transaminační reakci mezi alaninem a 2-oxoglutarátem má systémový název L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferasa, jeho doporučený název je alaninaminotransferasa.

Rozdělení enzymů

Podle zásad nomenklatury IUB se enzymy se rozdělují do základních tříd, z nichž každá má své podtřídy. Každý enzym má své kódové číslo (EC), ze kterého plyne jeho zařazení do třídy, podtřídy a jeho specifické označení.

V následujícím přehledu je uvedeno zjednodušené rozdělení enzymů do 6 hlavních tříd, podle typu katalyzované reakce.

- 1. Oxidoreduktasy** katalyzují oxidačně redukční reakce. Přenášejí vodík, elektrony, případně vestavují do molekul substrátu kyslík.
- 2. Transferasy** přenáší skupiny atomů z jednoho substrátu na druhý. Na základě charakteru přenášených skupin se rozdělují do podtříd např. aminotransferasy, acyltransferasy, fosfotransferasy atd.
- 3. Hydrolasy** katalyzují hydrolytické štěpení substrátů. Podtřídy se označují podle typu štěpené vazby, např. esterasy, glykosidasy, peptidasy. K hydrolasám patří většina trávicích enzymů, např. pepsin, trypsin jsou peptidasy, dále amylasa, sacharasa, maltasa jsou glykosidasy a lipasy jsou esterasy.
- 4. Lyasy** katalyzují nehydrolytické odštěpení malé skupiny ze substrátu nebo adici malé skupiny na dvojnou vazbu. Při těchto reakcích se štěpí nebo tvoří vazby C-C (např. dekarboxylasy nebo karboxylasy), vazby C-O (např. karbonátdehydratasa) nebo vazby C-N. (V případě, že katalyzují syntézu větší molekuly ze dvou menších se označují také jako synthasy).
- 5. Isomerasy** katalyzují intramolekulární přesuny vazeb nebo skupin v substrátech (dochází k tzv. isomeraci substrátů). Na základě typu isomerace se dělí do podtříd např. epimerasy, racemasy, *cis-trans* isomerasy.
- 6. Ligasy** (synthetasy) katalyzují vznik vazby mezi dvěma substráty za současné hydrolýzy ATP, která poskytuje energii pro vznik nové vazby.

Aktivita enzymů

Při analýze biologického materiálu je často potřeba vyjádřit množství enzymu, které je v něm obsažené. Poněvadž koncentrace enzymů jsou obecně velmi nízké, není běžnými metodami možné zjistit jejich látkovou nebo hmotnostní koncentraci. Namísto koncentrace se uvádí tzv. **katalytická aktivita** enzymu, která hodnotí rychlost, jakou je v enzymové reakci přeměňován substrát na produkt. Jednotkou katalytické aktivity je **katal** (kat). Aktivita 1 kat odpovídá takovému množství enzymu, jehož účinkem se přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu. V běžné praxi se používají jednotky menší např. μ kat, nkat. Katalytická aktivita enzymů v biologických tekutinách se obvykle vztahuje na jednotku objemu např. μ kat/l.

Faktory ovlivňující rychlost enzymových reakcí

Rychlost enzymové reakce může být ovlivňována řadou faktorů, k nejdůležitějším patří následující.

Teplota. Rychlost enzymové reakce stoupá se zvyšující se teplotou (zvýšení teploty o 10 °C zvyšuje rychlost přibližně na dvojnásobek). Při vyšších teplotách se však začíná uplatňovat tepelná denaturace enzymu a při teplotách kolem 60 °C se většina enzymů stává inaktivními. Pro každý enzym existuje teplotní optimum, při kterém je aktivita enzymu je nejvyšší, pro enzymy lidského organismu je v oblasti kolem 37 °C.

pH. Koncentrace H^+ iontů ovlivňuje disociaci ionizovatelných skupin enzymu a substrátu. Hodnota pH, při které enzym vykazuje nejvyšší aktivitu, se označuje jako *pH optimum*. Pro většinu enzymů leží jejich pH optimum v blízkosti neutrální oblasti. Výjimkou je např. pepsin v žaludku, jehož pH optimum je kolem 1,5.

Koncentrace substrátu. Se zvyšující se koncentrací substrátu se zvyšuje rychlost enzymové reakce. Při dostatečně vysoké koncentraci substrátu dochází k *nasycení enzymu substrátem* a další zvyšování koncentrace substrátu již nemá na rychlost reakce vliv. Reakce pak probíhá *maximální rychlostí* (za dané koncentrace enzymu).

Aktivace a inhibice. Katalytickou aktivitu enzymů může ovlivnit navázání některých nízkomolekulárních látek. *Aktivátory* jsou látky zvyšující aktivitu enzymu, *inhibitory* aktivitu snižují.

Jako aktivátory působí často ionty kovů (např. Mg^{2+}), jako inhibitory vystupují různorodé látky (např. sloučeniny podobné strukturou substrátům enzymů, ionty těžkých kovů). Vazba inhibitorů k enzymům může být vratná nebo nevratná. Účinek řady léčiv (např. sulfonamidy, acetylsalicylová kyselina, allopurinol) i toxických látek (např. kyanidy, oxid uhelnatý, ionty těžkých kovů) je založen na jejich inhibičním působení na některý enzym.

Některé enzymy mohou být aktivovány i odštěpením části své molekuly. Neaktivní forma těchto enzymů se označuje jako proenzym (zymogen), do aktivní formy se dostává odštěpením části peptidového řetězce. Tímto způsobem jsou aktivovány např. pepsin v žaludku, trypsin v tenkém střevě, enzymy kaskády krevního srážení a další.

Aktivita některých enzymů může být ovlivněna také fosforylací (katalyzované proteinkinázami) nebo defosforylací (katalyzované proteinfosfatázami).

Izoenzymy

Některé enzymy se mohou vyskytovat ve více formách, které vykazují tentýž katalytický účinek. Liší se však některými fyzikálními a chemickými vlastnostmi (vlivem malých rozdílů v aminokyselinovém složení daném genetickým kódem). Tyto různé formy enzymu se nazývají **izoenzymy**. Lze je od sebe rozlišit fyzikálně-chemickými metodami (např. elektroforézou). Izoenzymy daného enzymu se často nachází v různých typech tkání, čehož se někdy užívá k diagnostickým účelům v lékařství. V klinické biochemii jsou běžné např. izoenzymy laktátdehydrogenasy, alkalické fosfatasy, kreatinkinasy.

Enzymy v diagnostice

Enzymy v plazmě

Enzymy vyskytující se v plazmě lze rozdělit do dvou typů. Jsou to jednak enzymy normálně přítomné v plazmě, které zde mají svou úlohu (např. enzymy kaskády krevního srážení nebo cholinesterasa) a dále enzymy uvolňované z buněk různých tkání, které nemají v plazmě žádnou funkci, jejichž koncentrace je za fyziologických okolností nepatrná.

Buněčné enzymy a sekreční enzymy

Buněčné enzymy jsou enzymy buněčných metabolických dějů. V buňce jsou buď rozpuštěny v cytoplazmě nebo v buněčných organelách, např. mitochondrie, anebo jsou na buněčné struktury vázány. Jako sekreční enzymy jsou označovány enzymy secernované buňkami žláz do extracelulárního prostoru, nikoliv však do plazmy (typicky trávicí enzymy). U „zdravých“ lidí nacházíme v krvi velmi nízká množství obou typů enzymů, v buňce je koncentrace řádově 10^3 – 10^4 krát vyšší. Nález malých množství těchto enzymů v plazmě je důsledkem přirozené obměny buněk.

Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plazmě

Patologické uvolňování enzymů z buněk je nejčastěji důsledkem zvýšené permeability buněčné membrány (poškození např. chemickými látkami, anoxie, hypoxie, zánět, viry), které může vést až k degradaci buněk. Při odumírání buňky se aktivují fosfolipasy a odbourání fosfolipidů cytoplazmatické

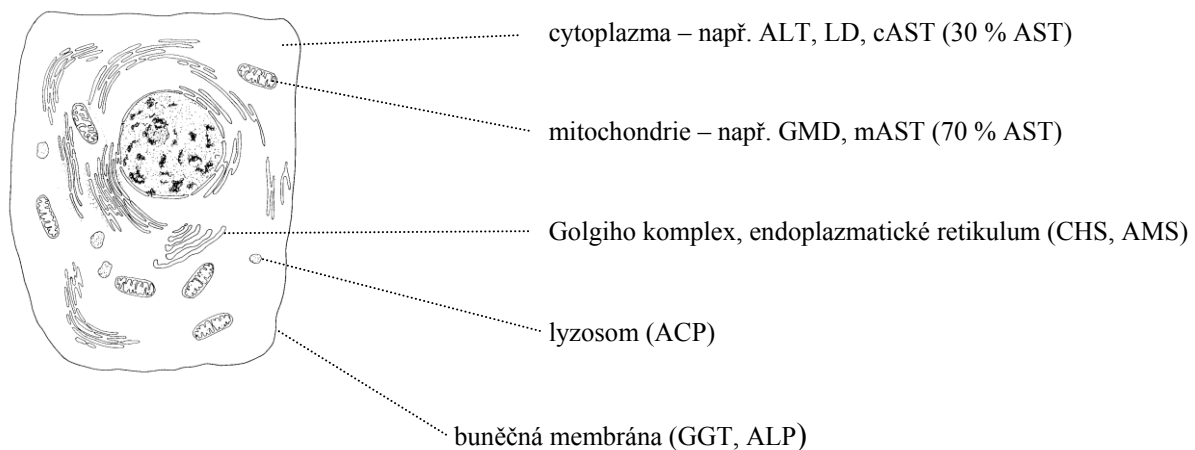
membrány vede k jejímu „proděravění“. Důsledkem je průnik makromolekul z cytoplazmy do extracelulárního prostoru a odtud do krve.

Příčinou zvýšené hladiny enzymů v krvi může být také jejich zvýšená syntéza. Např. při zvýšené aktivitě osteoblastů při růstu kostí se v krvi zvyšuje hladina alkalické fosfatasy. Proto u dětí jsou referenční hodnoty ALP v séru 3–7krát vyšší než u dospělých. Některé léky a také alkohol indukují zvýšenou syntézu jaterních enzymů GGT a ALP.

V některých případech nastává zvýšené uvolňování enzymů z buněk, aniž by bylo spojenou s buněčnou smrtí nebo zvýšenou syntézou. Např. ethanol způsobuje expresi mitochondriální AST, její přesun na povrch hepatocytů a následné uvolnění do krve. Příjem potravy indukuje uvolnění střevní alkalické fosfatasy do lymfy a následně může být dočasně zvýšena hladina enzymu i v krvi. Řada jaterních enzymů (ALP, GGT, 5'-nukleotidasa, leucinaminopeptidasa) je vázána na povrchu hepatocytů, které jsou v kontaktu se žlučovými kanálky. Zvýšená koncentrace žlučových solí při zadržení odtoku žluče může vyvolat uvolnění membránových fragmentů s navázanými enzymy do cirkulace.

V některých případech může být zvýšená hladina enzymu v plazmě vyvolána jeho nedostatečným odstraňováním z cirkulace. Např. malé enzymy, amylasa a lipasa, jsou z oběhu odstraňovány glomerulární filtrací. Renální selhání zvyšuje jejich hladinu v krvi. Proti některým enzymům se v krvi vytváří protilátky a dochází ke tvorbě komplexů enzym-protilátka (tzv. makroenzymy). Poločas těchto enzymů v krvi potom kopíruje poločas imunoglobulinu (3 týdny).

Subcelulární lokalizace některých enzymů v jaterní buňce



Hlavní diagnostické enzymy jaterní buňky jsou lokalizovány v různých oblastech hepatocytu. ALT a cytoplazmatický izoenzym AST se nachází v cytoplasmě. Při membránovém poškození (např. virovém, nebo chemickou látkou) jsou tyto enzymy uvolněny a dostávají se do sinusoidu. Důsledkem je zvýšení hladiny v plazmě. Mitochondriální AST je primárně uvolněna při poškození mitochondrií, např. při působení alkoholu. ALP a GGT se nachází na kanalikulárním povrchu hepatocytů a uvolňují se zejména při cholestáze v důsledku působení žlučových kyselin na membránu. GGT se nachází

rovněž v mikrosomech, kde je indukována některými léky. Podávání těchto léků pak zvyšuje hladinu GGT v plazmě.

Využití enzymů v klinické diagnostice

V klinické diagnostice je stanovení enzymů požadováno z důvodu:

- detekce poškození určité tkáně,
- identifikace počátku poškození tkáně,
- stanovení rozsahu poškození,
- odhad závažnosti poškození buněk,
- diagnózy základních onemocnění,
- diferenciální diagnózy onemocnění v rámci poškozeného orgánu.

Tkáňová distribuce diagnosticky významných enzymů

Poškozená tkáň může být diagnosticky nepřímo lokalizována buď ze stanovení aktivity tkáňově specifických enzymů nebo izoenzymů v krvi. Tkáňově specifické enzymy se vyskytují přednostně v určité tkáni nebo mají v dané tkáni vysokou aktivitu. Příklady tkáňově specifických enzymů jsou uvedeny v následující tabulce.

Orgán	AST	ALT	LD	LD ₁	CK	GGT ⁺	ALP	ACP	AMS	LPS	CHS
Játra	x	xx	x			xxx	x				xxx
Myokard	x	x	x	xx	xx						
Sval	x	x	x		xx						
Žlučovod							xx				
Ledviny	x		x	x		x	x				
Kosti							xx	x			
Erytrocyty*	x		x	x				xx			
Prostata								xxx			
Pankreas	x					xx			xx	xxx	
Parotis									xx		

* v erytrocytech 100krát více LD než v plazmě

⁺ nízká orgánová specifičnost, snadno indukovatelný

Expresí izoenzymů je většinou pro každou tkáň určena geneticky. Proto stanovení izoenzymů v krvi umožňuje identifikovat poškozenou tkáň, z které pocházejí (např. pankreatická lipasa, CK-MB, LD₁).

Klinicky významné enzymy

AST *aspartátaminotransferasa*

ALT *alaninaminotransferasa*

poměr $AST / ALT > 1$

$AST / ALT < 1$

LD *laktátdehydrogenasa*

HBD *hydroxybutyrátdehydrogenasa*

GGT *gama-glutamyltransferasa*

ALP *alkalická fosfatasa*

ACP *kyselá fosfatasa*

CK *kreatinkinasa*

AMS *amylasa ($M_r \sim 50\ 000$)*

LPS *lipasa*

PSA *prostatický specifický antigen*

CHE *cholinesterasa*

Příčiny zvýšené aktivity v séru

infarkt myokardu;
hepatopatie;
krevní choroby; svalová poškození

hepatopatie;
srdeční onemocnění;
alkoholické jaterní choroby, infarkt myokardu
virová hepatitida

LD_{1,2} – infarkt myokardu, hemolytické anemie;
LD₃ – plicní embolie;
LD_{4,5} – hepatopatie, nemoci kosterního svalstva

aktivita podjednotek H (LD_{1,2}), infarkt myokardu

hepatopatie (zánět, alkohol, léky);
test chronické konzumace alkoholu;
cholestáza

jaterní izoenzym – nemoci žlučových cest;
kostní izoenzym – nemoci kostí (Pagetova choroba,
rachitis, nádory), *fyzilogicky zvýšen v období růstu*

prostatický izoenzym – tumory prostaty;
kostní izoenzym – metastázy tumorů do kostí,
marker osteoporózy

CK-MB – především infarkt myokardu;
ale též při regeneraci kosterních svalů, chronických svalových
onemocnění a akutním renálním selhání;

CK-MM – nemoci kosterního svalstva,
intramuskulární injekce, tělesná aktivita

pankreatický izoenzym – akutní pankreatitida;
slinný izoenzym – parotitida

akutní pankreatitida;
akutní zvrát chronické pankreatitidy

karcinom prostaty

Příčiny snížené aktivity v séru

chronické hepatopatie,
alkoholicko-toxická hepatitida (intoxikace organofosfáty);
ukazatel jaterní proteosyntézy

Enzymy jako léčiva. Enzymy mohou být využívány také jako léčiva. Nedostatek trávicích enzymů v tenkém střevě může být nahrazen preparáty na bázi extraktů z vepřového pankreatu, které obsahují lipasu, trypsin a amylasu. Léková forma musí být taková, aby chránila účinnou látku před rozkladem v kyselém prostředí žaludku (denaturace) a umožnila její postupné uvolnění až v alkalickém prostředí duodena. Dalším příkladem je využití enzymů streptokinasy a urokinasy jako fibrinolytik. Tyto enzymy po aplikaci intravenózně (příp. intraarteriálně) mají fibrinolytický účinek, tj. rozpouštějí krevní sraženiny v cévách.