

Enzymy II

**Mechanismus enzymové reakce, metaloenzymy,
kinetika, aktivita, enzymy v lékařství**

Aktivní místo enzymu

- malá část molekuly, trojrozměrné uspořádání
- hluboká štěrbina, povrchová prohlubeň
- účastní se postranní řetězce AK vzdálených v primární struktuře
- místo je skutečně **aktivní** - flexibilita proteinu umožňuje indukované přizpůsobení konformace, která odpovídá substrátu
- substrát vázán relativně slabě

Mechanismy

- -přiblížení a orientace
- - acidobazická katalýza
- pnutí a deformace (tranzitní stav, -lytické reakce)
- kovalentní katalýza (přechodná kovalentní vazba mezi E a S1-S2)

Příklad: Aktivní místa tří proteinas

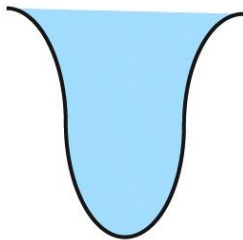
Určité postranní řetězce AK určují substrátovou specifitu

Peptidové vazby přednostně štěpené:

chymotrypsin – velkých hydrofobních AK (Phe, Trp),

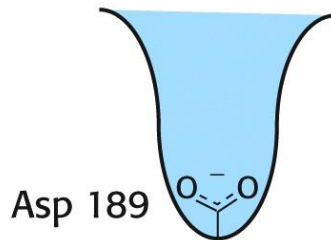
trypsin – delších kladně nabitých řetězcích (Arg, Lys),

elastasa – malých hydrofobních skupinách (Gly, Ala).



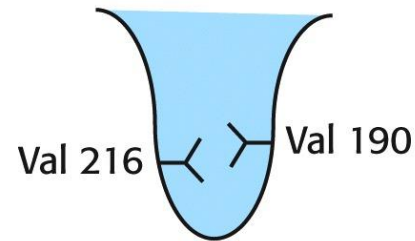
Chymotrypsin

hluboká, relativně hydrofobní kapsa



Trypsin

hluboká kapsa se zbytkem Asp (záporný náboj)



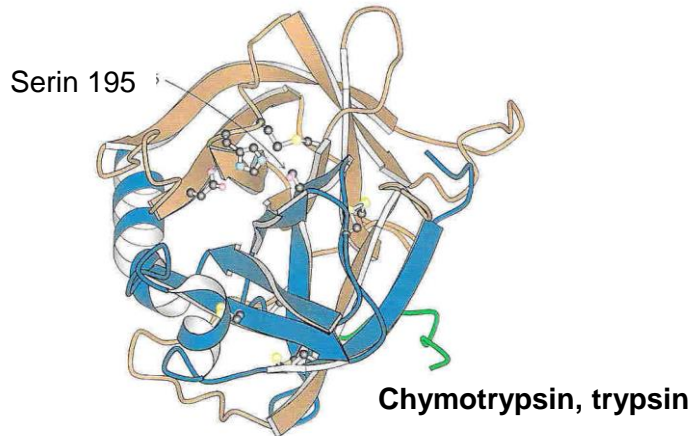
Elastase

dva zbytky valinu tvoří ústí malé hydrofobní kapsy

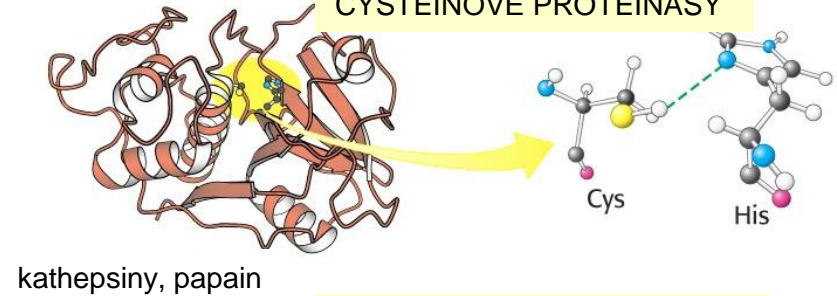
Příklady proteinas

- různé uspořádání aktivního místa
- různá substrátová specifita
- různý katalytický mechanismus

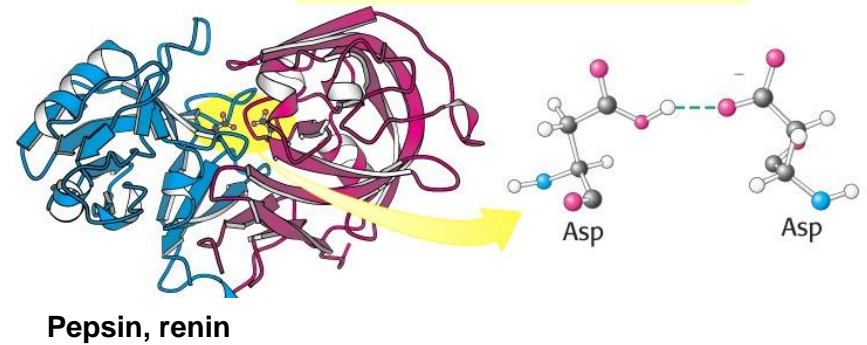
SERINOVÉ PROTEASY



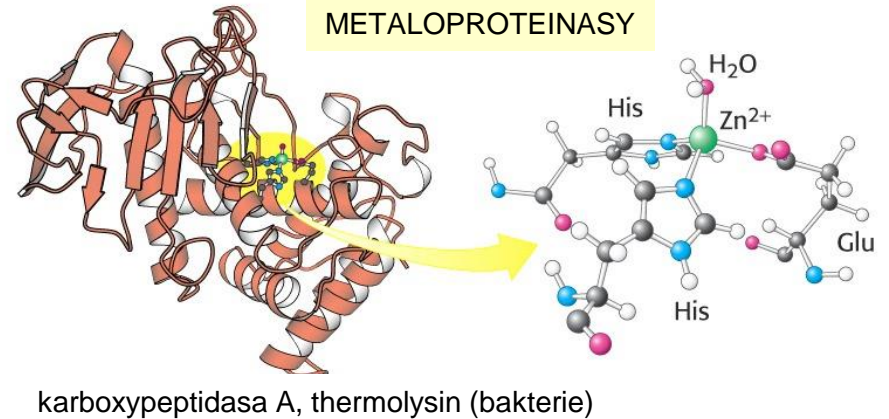
CYSTEINOVÉ PROTEINASY



ASPARTÁTOVÉ PROTEINASY

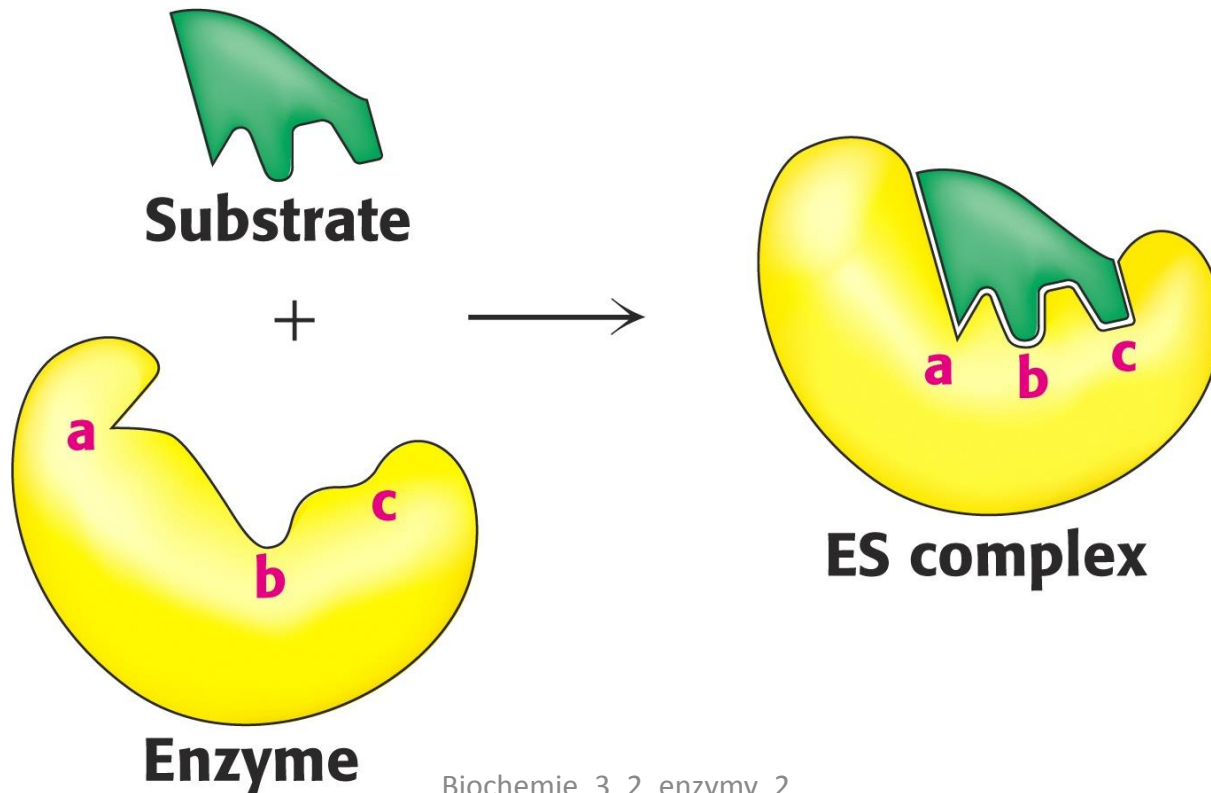


METALOPROTEINASY



Vazba substrátu na enzym

- vazba substrátu do aktivního místa vyvolá odpovídající konformační změnu molekuly enzymu – **indukované přizpůsobení**
- vytvoří se komplex enzym-substrát (ES)

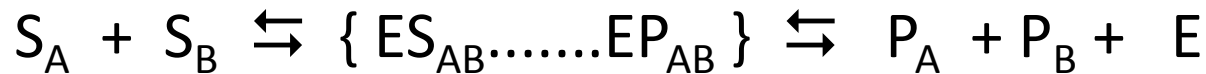


Katalytický mechanismus závisí na počtu substrátů

- **Monosubstrátové reakce**



- **Dvousubstrátové reakce (častější)**

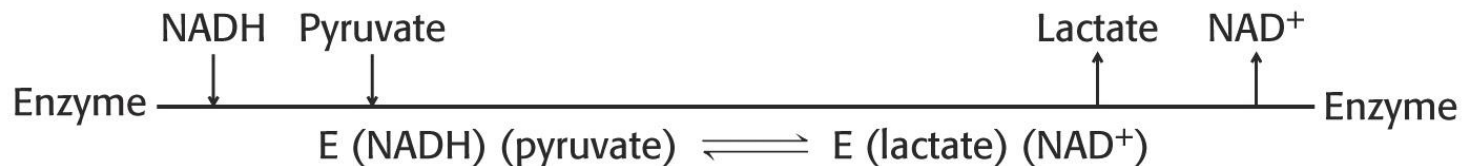


Sekvenční reakce: oba substráty se navážou na enzym a pak proběhne chemická přeměna a uvolnění produktů

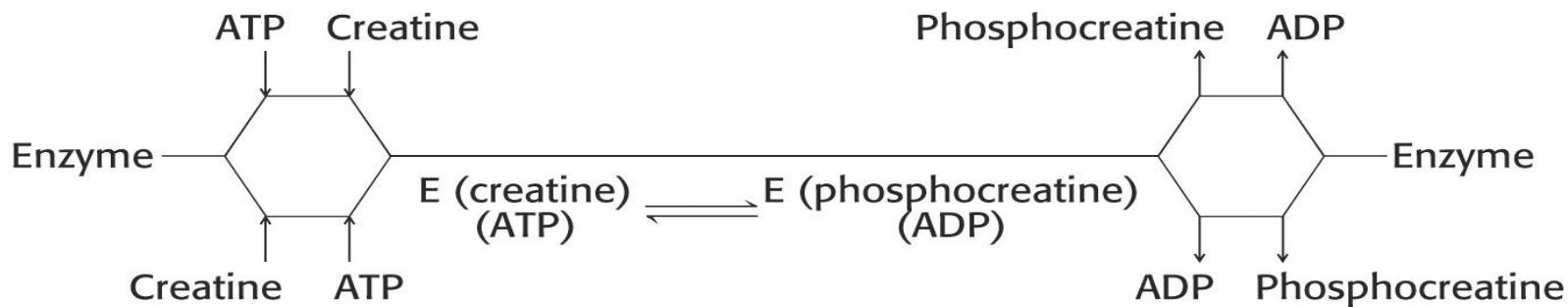
Ping-pongové reakce: typický pro aminotransferasy, jeden substrát se naváže, přemění a uvolní, pak totéž s druhým substrátem

Sekvenční reakce:

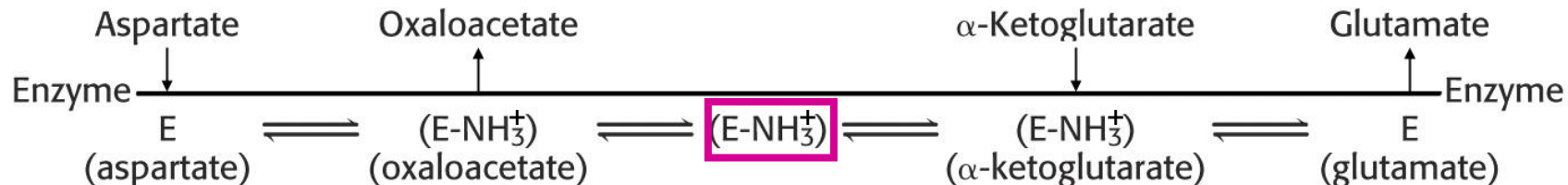
uspořádané – substráty se vážou na E v definovaném pořadí



nahodilé

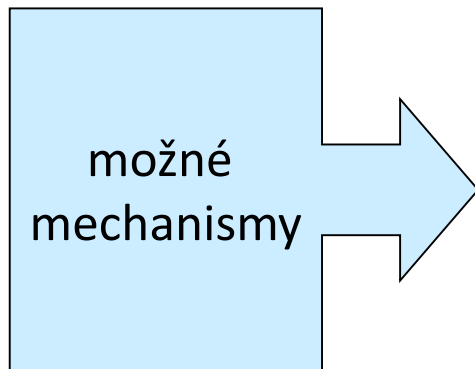


Ping-pongové reakce:



Katalytické skupiny

- k realizaci chemické přeměny v aktivním místě jsou použity tzv. katalytické skupiny
- nukleofilní (cystein -SH, serin -OH)
- kyselé (Asp, Glu), bazické (His, Arg, Lys)

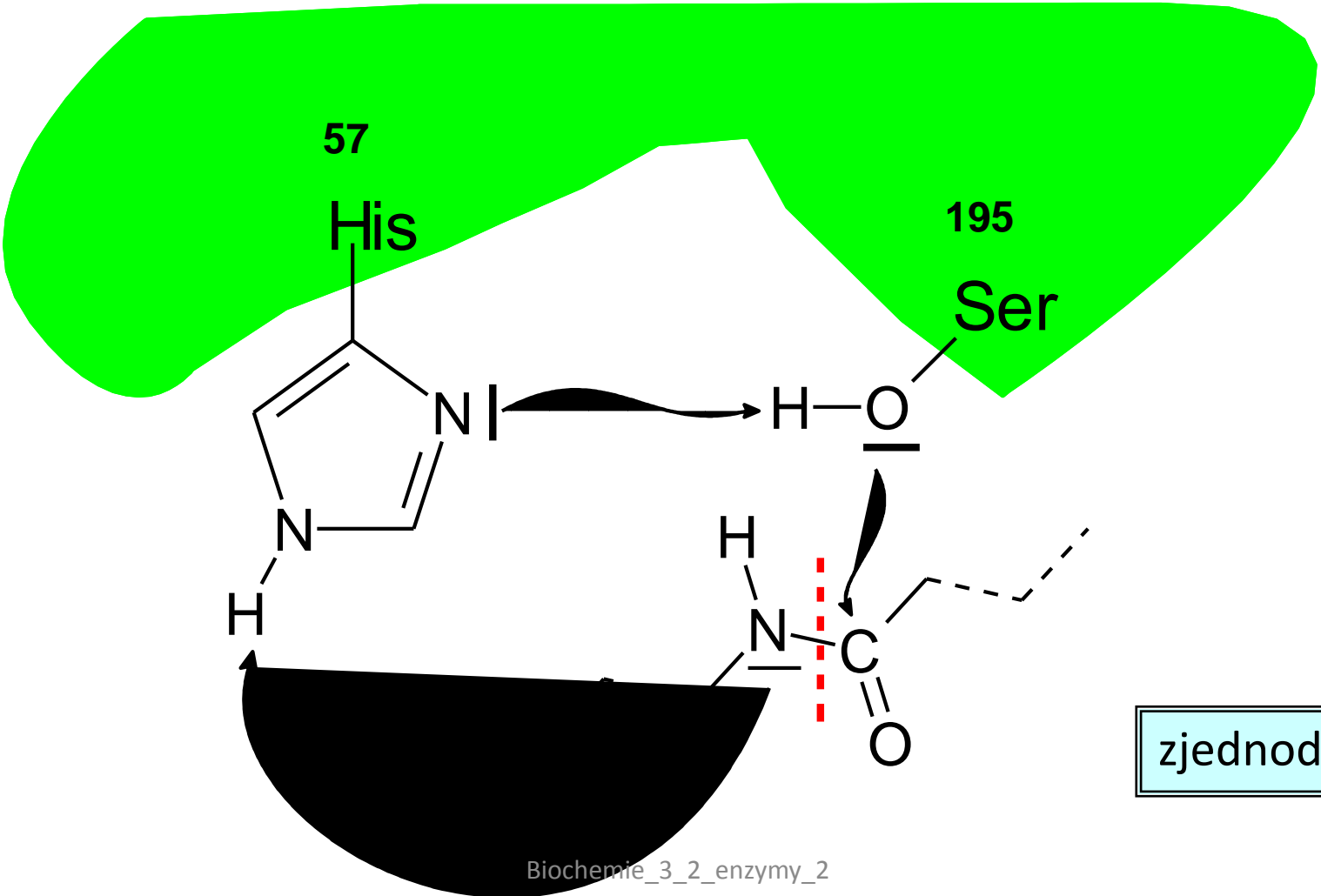


- acidobazický (transfer protonu)
- přechodná kovalentní vazba
- katalýza kovovým iontem (metaloenzymy)
- elektrostatické interakce (bez vody)
- deformace substrátu

Příklad: aktivní místo chymotrypsinu

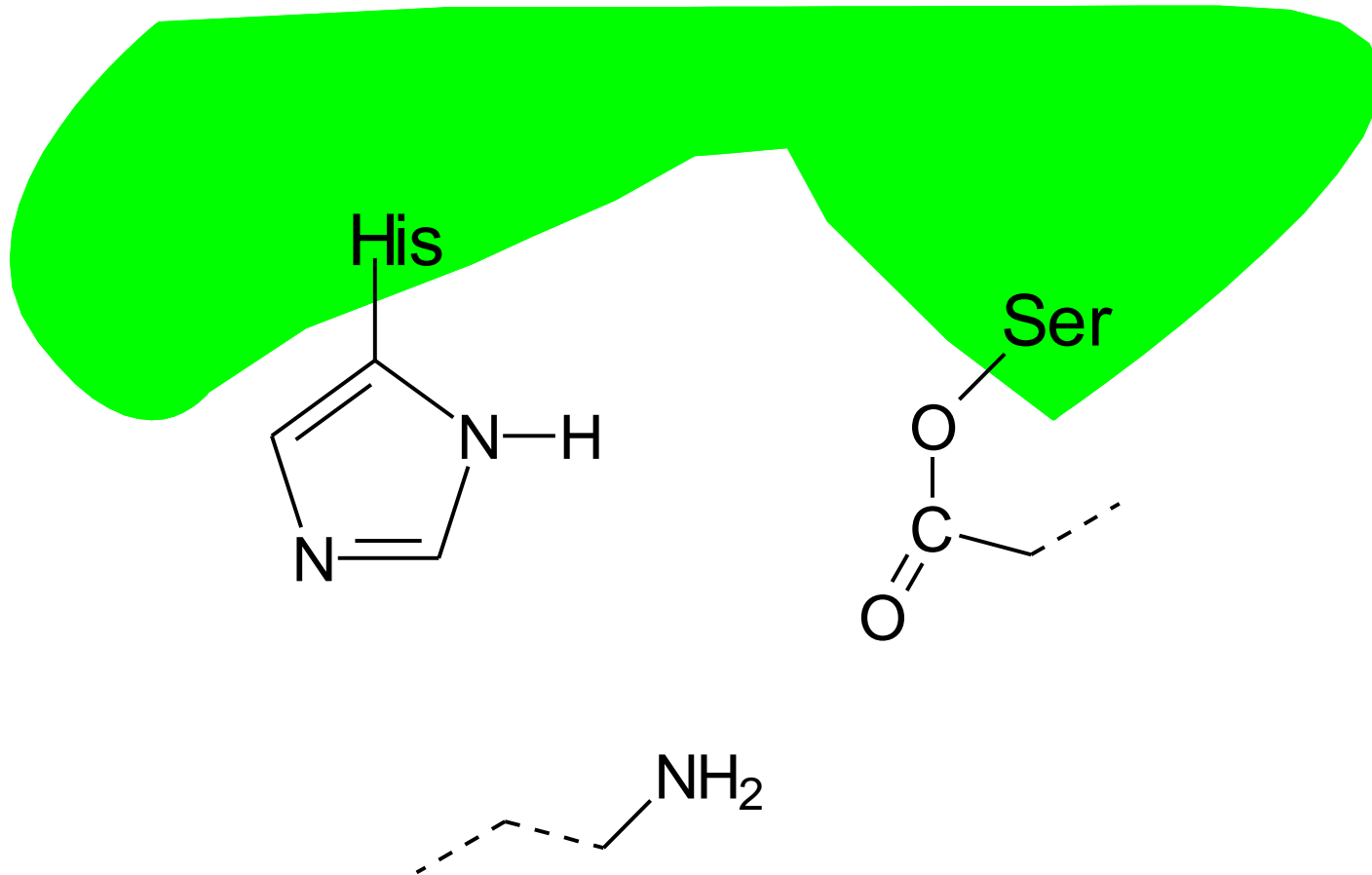
Nukleofilní atak -OH serinu na karbonylový uhlík peptidové vazby

⇒ serinová proteasa



Aktivní místo chymotrypsinu:
peptidové vazby

rozštěpení

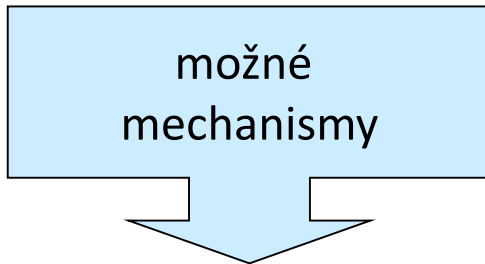


Metaloenzymy

- obsahují **funkční** kovové ionty, které se přímo účastní katalyzované reakce, ionty kovu vázány poměrně pevně (Enz-M)
- některé enzymy potřebují ionty kovů pouze k **aktivaci**, v tom případě jsou vázány slabě (Enz ...M), ionty dvojmocných kovů, Ca^{2+} (koagulační faktory), Mg^{2+} (kinasy)

Kation kovu je součástí ternárního komplexu

- tři složky vytvářejí komplex:
enzym (Enz), substrát (S) a kationt kovu (M)
- různé typy (můstkových) komplexů Enz-S-M, Enz-M-S, někdy vznikají cyklické komplexy



- do vakantních orbitalů mohou přijímat elektronový pár nukleofilu za vzniku σ -vazby
- mohou tvořit cheláty s vhodnými skupinami enzymu či substrátu \Rightarrow deformace struktury \Rightarrow napětí, které usnadňuje chemickou přeměnu
- koordinační sféra kovu působí jako trojrozměrný templát \Rightarrow stereospecifická kontrola

Molybden

- Součást některých oxidoreduktas
- Součást kofaktoru – molybdopterin
- **Xanthinoxidasa** (xanthin \rightarrow kys. močová)
- **Sulfitoxidasa** ($\text{HSO}_3^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$)

Zdroje Mo: luštěniny, celozrnné obilniny

Zinek

- Mnoho enzymů
- **Alkoholdehydrogenasa** (ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH+H⁺)
- **Karbonátdehydratasa** (H₂O + CO₂ ⇌ H₂CO₃)
- **Karboxypeptidasy** (štěpení polypeptidů od C-konce)
- **Cu, Zn-superoxiddismutasa** (cytosolová izoforma)
 - O₂⁻ + 2 H⁺ → O₂ + H₂O₂)

(2

Zdroje Zn: červené maso, koryši, luštěniny, slunečnicová a dýňová semínka, celozrnné obilniny

Měď

- Četné oxidoreduktasy
- **Ceruloplazmin (ferrooxidasa)** ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)
- **Cytochrom-c-oxidasa** (DŘ, přenos el. na O_2)
- **Monoaminoxidasy** (MAO, inaktivace biogenních aminů, vzniká H_2O_2 , LCH II s. 60, Harper s. 565)
- **Dopaminhydroxylasa** (dopamin \rightarrow noradrenalin)
- **Lysyloxidasa** (vyzrávání kolagenu, Lys \rightarrow aLys)

Zdroje Cu: játra, maso, kakao, luštěniny, ořechy

Mangan

- Četné hydrolasy, dekarboxylasy, transferasy
- **Mn-superoxiddismutasa** (mitochondriální izoforma)
- **Arginasa** (Arg → močovina + ornithin)
- Syntéza proteoglykanů + glykoproteinů

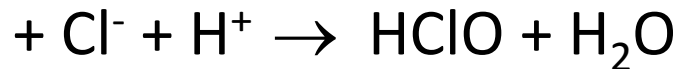
Zdroje Mn: luštěniny, celozrnné obilniny, ořechy

Železo

- Hemové enzymy, nehemové přenašeče

- **Katalasa** (hem, $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$)

- **Myeloperoxidasa** (hem, neutrofily)



- **Cytochromy** (hem, přenašeče elektronů v DŘ)

- **Fe-S proteiny** (nehem, přenos elektronů v DŘ)

Zdroje Fe: výrobky z vepřové, husí, kachní krve, (červené) maso, játra, žloutek, ořechy

Selen

- Několik enzymů (redoxní reakce), Se je vždy v selenocysteinu
- **Glutathionperoxidasa** (2)
$$\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{G-S-S-G}$$
- **Dejodasy thyroninů** (thyroxin T4 → trijodthyronin T3)
- **Thioredoxin reduktasy** (ribosa → deoxyribosa)
- **Selenoprotein P** (plazma, antioxidační funkce ?)

Zdroje Se: hlavonožci, mořské ryby, luštěniny

Základní pojmy z kinetiky

- reakce: $S \rightarrow P$ (S = substrát, P = produkt)
- definice **reakční rychlosti**:

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} > 0 \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{l.s}} \right]$$

Poznámka: takto je definována **průměrná reakční rychlost**,
okamžitá rychlost: $d[S]/dt$ (derivace, podíl dvou nekonečně malých čísel)

Na čem závisí rychlost reakce?

- na koncentraci substrátu [S]
- na teplotě
- na přítomnosti efektoru (katalyzátoru, inhibitoru)

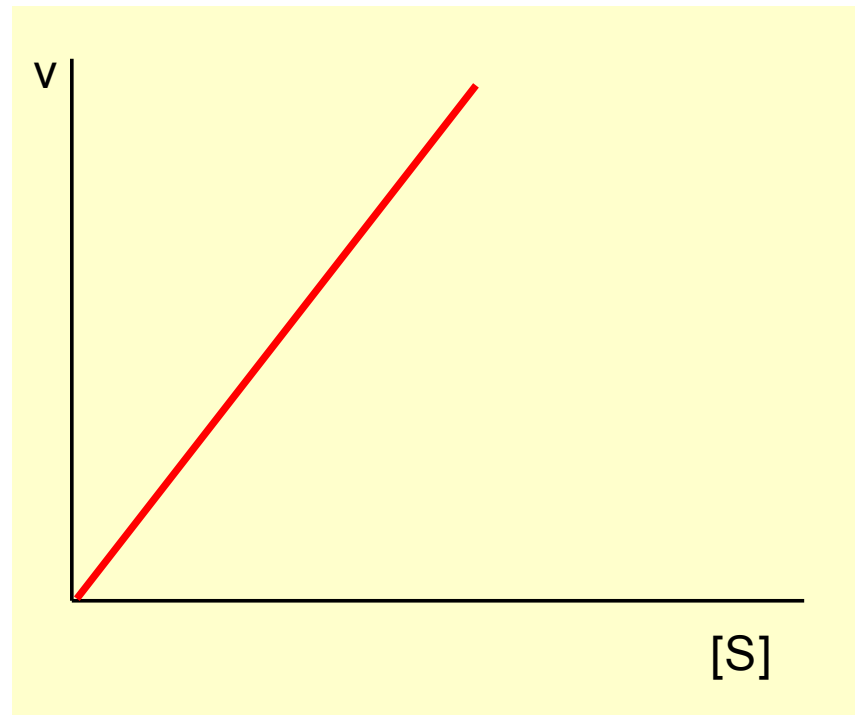
U enzymových reakcí navíc:

- koncentrace enzymu [E]
- pH

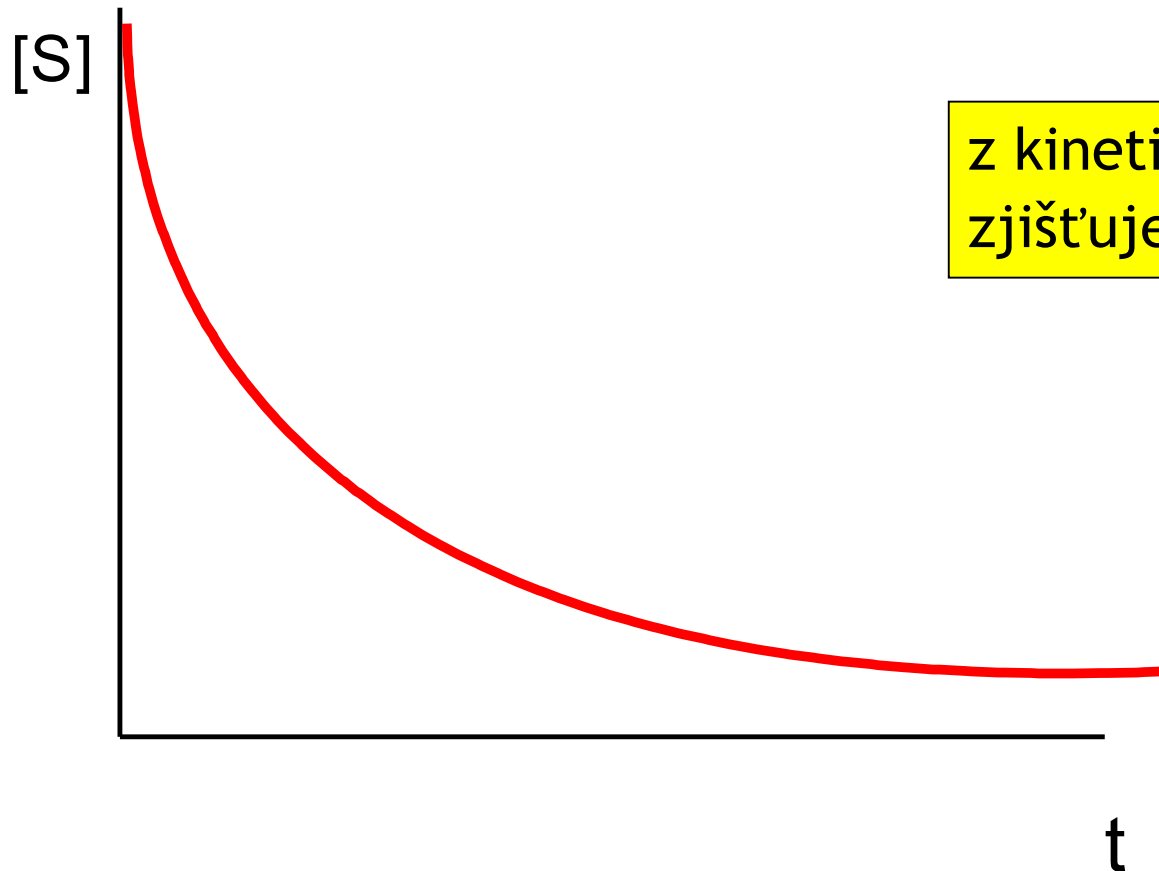
Kinetická rovnice pro reakci $S \rightarrow P$

$$v = k [S] = k [S]^1 \Rightarrow \text{reakce 1. řádu}$$

k = rychlostní konstanta



Koncentrace substrátu během reakce
klesá \Rightarrow kinetická křivka

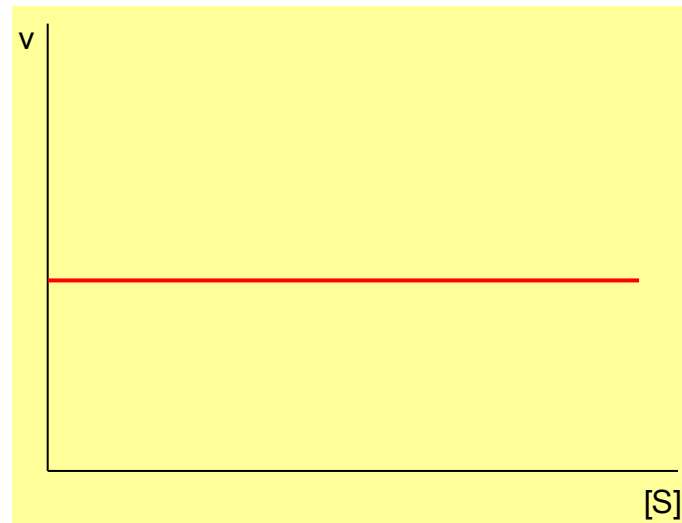


z kinetické křivky se
zjišťuje rychlost

Reakce 0. řádu je zvláštní případ

- rychlost reakce nezávisí na koncentraci substrátu
- $v = k [S]^0 = k \cdot 1 = k = \text{konstanta}$
- nastává při velkém nadbytku S, takže jeho úbytek je prakticky zanedbatelný

u enzymových reakcí
pouze v laboratorních
podmínkách



Počáteční rychlost v_0

- rychlost změřená dříve než vznikne významnější množství produktu
- nejvyšší hodnota rychlosti
- „virtuální veličina“
- není ovlivněna úbytkem substrátu ani vratnou přeměnou produktu
- **stanovuje se z kinetických křivek**

Závislost v_o na koncentraci substrátu

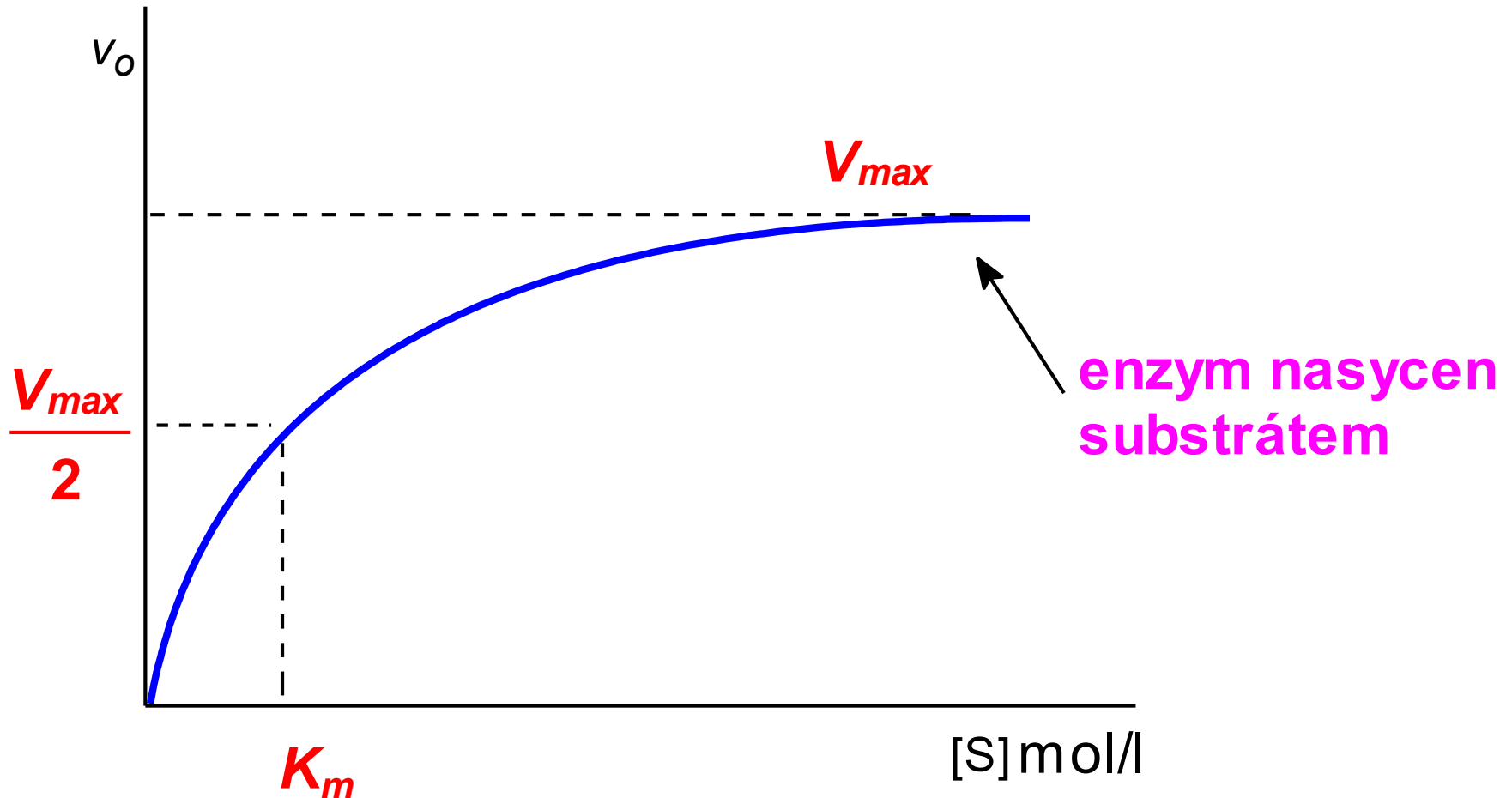
- rovnice Michaelise a Mentenové
- pro jednosubstrátové reakce

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

V_{\max} = maximální rychlost (pro danou koncentraci enzymu)

K_m = Michaelisova konstanta

Grafickým vyjádřením předchozí rovnice je saturační křivka



Jestliže $[S] \ll K_m$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{\max}}{K_m} [S] = k[S]^1$$

Při **nízkých koncentracích substrátu** se reakce řídí **kinetikou 1. řádu**

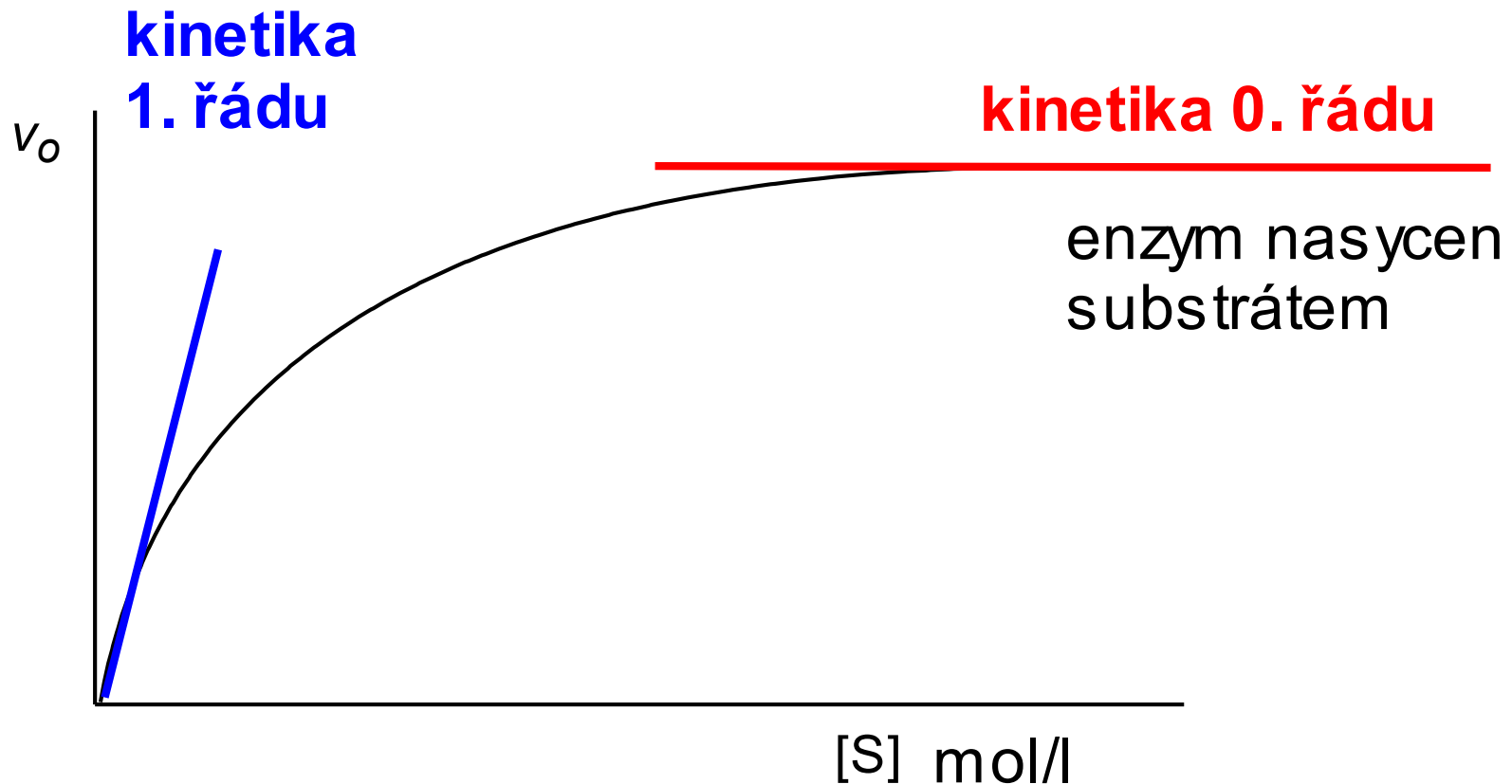
Jestliže $[S] \gg K_m$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} = V_{\max} \frac{[S]}{[S]} = V_{\max} = k[S]^0$$

Při vysokých koncentracích substrátu se reakce řídí **kinetikou 0. řádu**

Dvě oblasti v saturačním grafu

srovnejte se snímky 19 a 21



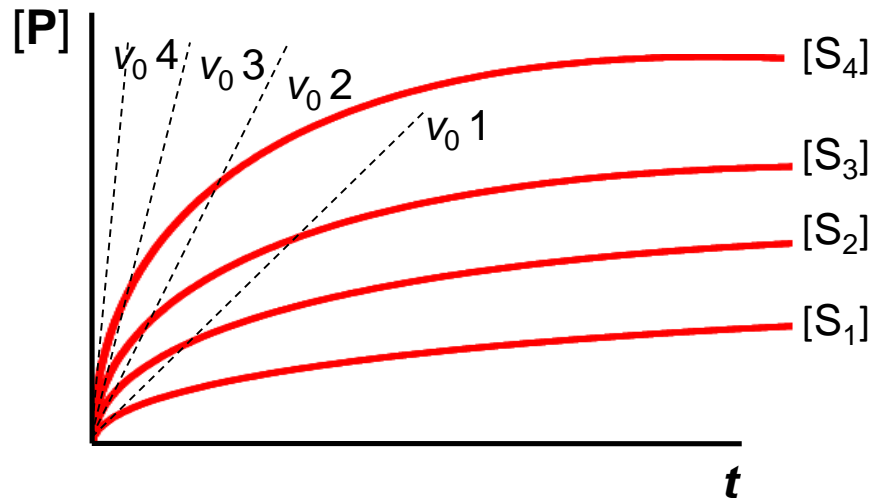
Jestliže $[S] = K_m$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + [S]} = V_{\max} \frac{[S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2}$$

Biochemický význam K_m

- koncentrace substrátu, při níž reakce probíhá polovinou maximální rychlosti
- při této koncentraci je enzym z 50 % nasycen
- K_m má rozměr koncentrace (mol/l)
- K_m je nepřímo úměrná afinitě enzymu pro daný substrát
- existuje-li více strukturně podobných substrátů, ten který má nejmenší K_m se považuje za nejpřirozenější pro daný enzym

Jak se získá saturační křivka?



- sada pokusů, konstantní koncentrace enzymu,
- různé koncentrace substrátu, rozpětí 2-3 řády
- z jednotlivých kinetických křivek se stanoví v_0
- v_0 se graficky vynesou proti příslušným $[S]$
- vznikne hyperbolická saturační křivka

Rozlišujte

Kinetická křivka

- časový záznam

jedné reakce

- $[P] = f(t)$

Saturační křivka

- závislost získaná

z **mnoha** stejných reakcí

(viz předcházející sn.)

- $v_o = f([S])$

Hodnoty V_{\max} a K_m charakterizují kinetické vlastnosti enzymu

- snadno se zjistí z linearizovaného grafu
- Lineweaver-Burk
- dvojí reciproké vynesení
- $1/v_o$ se vynáší proti $1/[S]$

Matematické odvození reciprokého vztahu

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{[S] + K_m}{[S]} = \frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{[S]}{[S]} + \frac{K_m}{[S]} \right)$$

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Reciprokový vztah je rovnice přímky

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

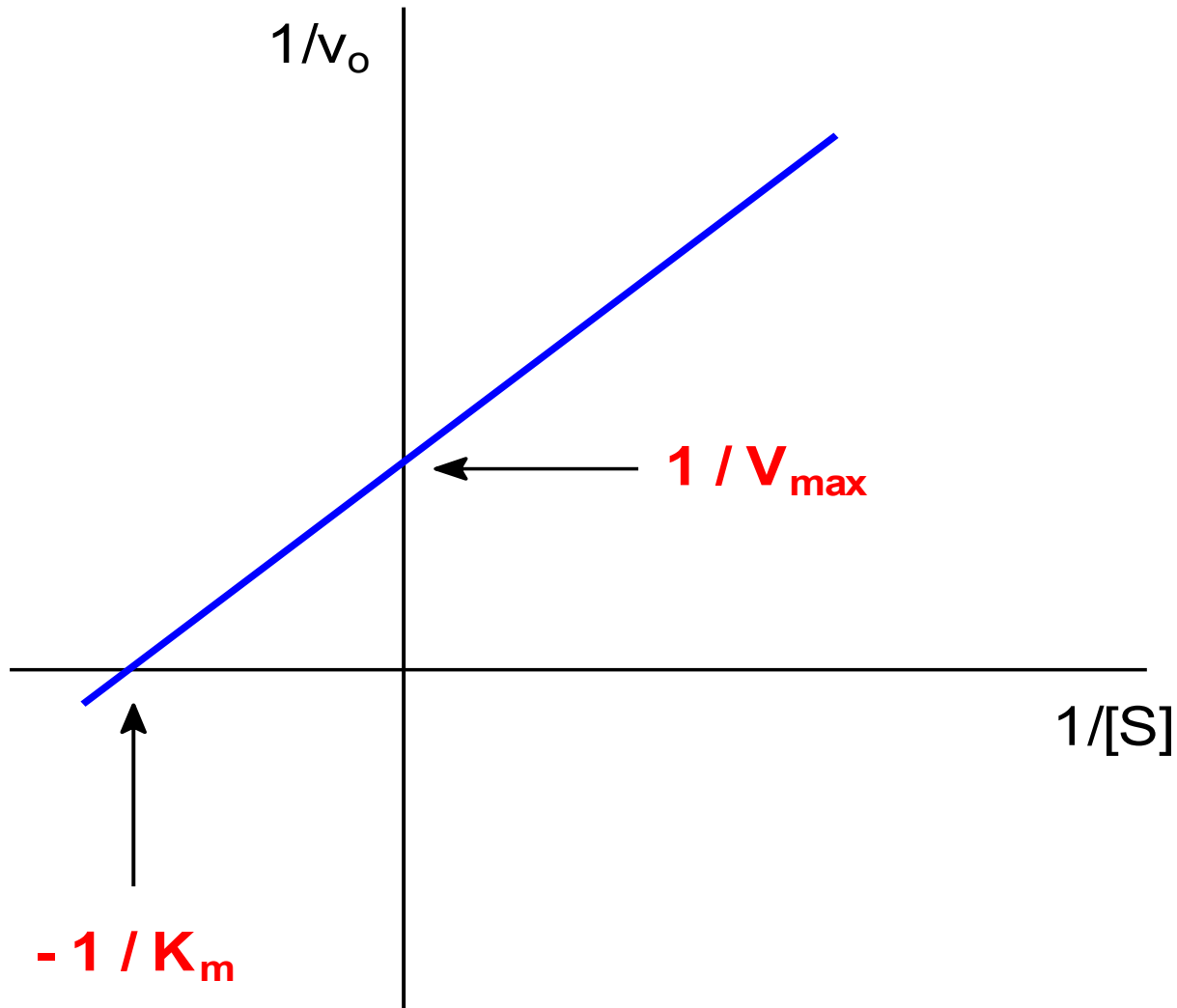
$1/v_o$ závisle proměnná

$1/[S]$ nezávisle proměnná

K_m/V_{\max} směrnice přímky

$1/V_{\max}$ úsek na ose závisle proměnné

Linearizovaný graf: $1/v_o$ jako funkce $1/[S]$



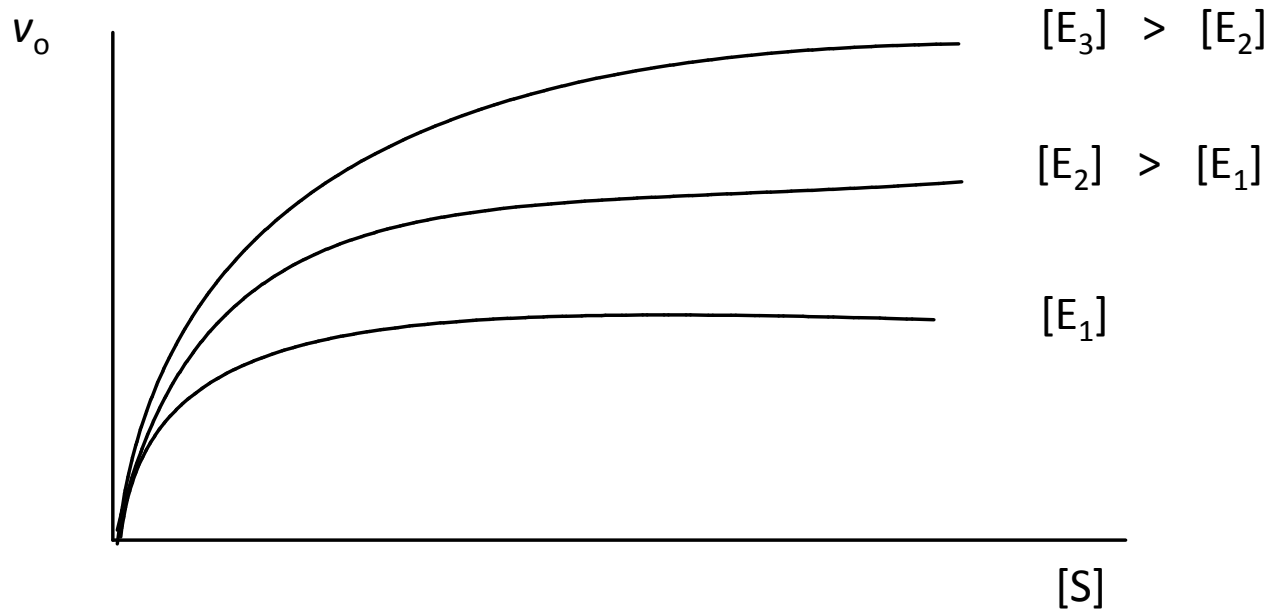
Koncentrace enzymu [E] také ovlivňuje rychlost

nasycený enzym: $v_o = k [E]_t = k [ES]$

$[E]_t$ je celková (totální) koncentrace enzymu

$[E]_t = [E] + [ES]$ obecně

Saturační křivky pro různé koncentrace enzymu



K_M se nemění, V_{max} se zvyšuje

Jak zjistit množství enzymu v biologickém materiálu?

- velmi obtížné
- nízké (stopové) koncentrace enzymů
- přítomno mnoho dalších bílkovin
- běžné chemické reakce jsou nepoužitelné
- nejsou specifické pro odlišení jednotlivých enzymů

Množství enzymu v biologickém materiálu lze stanovit dvojím způsobem

- **katalytická koncentrace**
- **$\mu\text{kat/l}$**
- stanoví se produkt enzymové reakce
- **většina klinicky významných enzymů**
- **hmotnostní koncentrace**
- **$\mu\text{g/l}$**
- stanoví se enzym (jako antigen, imunochemicky)
- jen některé, např. tumorové markery

Katalytická aktivita enzymu

- zavedena jednotka **katal**, 1 kat = mol/s
- **jeden katal je katalytická aktivita enzymu, při které se v reakci přemění jeden mol substrátu za sekundu**

mezinárodní jednotka **IU** (international unit)

1 IU = $\mu\text{mol}/\text{min}$

Převodní vztahy:

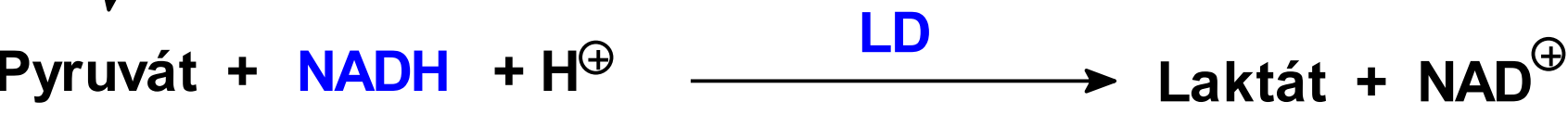
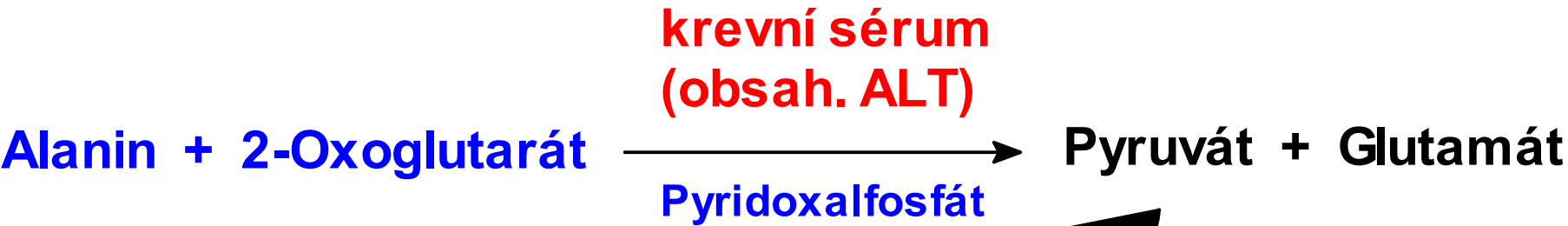
1 μkat = 60 IU

1 IU = 16,6 nkat

Katalytická koncentrace enzymu

- aktivita je vztažena na **objem biologické tekutiny**
(krevní sérum)
- jednotky mkat/l, μ kat/l

Metodika stanovení ALT (všechny složky jsou bezbarvé)



optický test
Semináře, s.18

Legenda:
složky reakční směsi
vzorek s enzymem

při reakci klesá absorbance
 $\Delta A / \Delta t$

Stanovení katalytické aktivity v laboratoři

- optimální podmínky (teplota, pH, kofaktory)
- měří se $\Delta[S]$ nebo $\Delta[P]$ v určitém časovém intervalu
- kinetika 0. řádu, $[S] \gg K_m \Rightarrow$ nasycený enzym,
rychlost je konstantní, blíží se V_{\max}

Dvě metody pro zjištění katalytické koncentrace

Charakteristika	Kinetická metoda	Metoda konstantního času
Co se měří	[S] nebo [P]	[P]
Jak	kontinuálně (např. po 10 s)	po urč. čase (např. 10 min) je reakce inhibována
Kinetická křivka hodnocena	ano	ne
Co se stanoví / počítá	počáteční rychlost v_o	průměrná rychlost
Zhodnocení metody	přesná	méně přesná

Uvědomte si, že

katal. koncentrace enzymu = rychlost chemické reakce

$$[\text{kat/l}] = [\text{mol/l.s}]$$

Inhibice enzymů (snížení aktivity)

Ireverzibilní

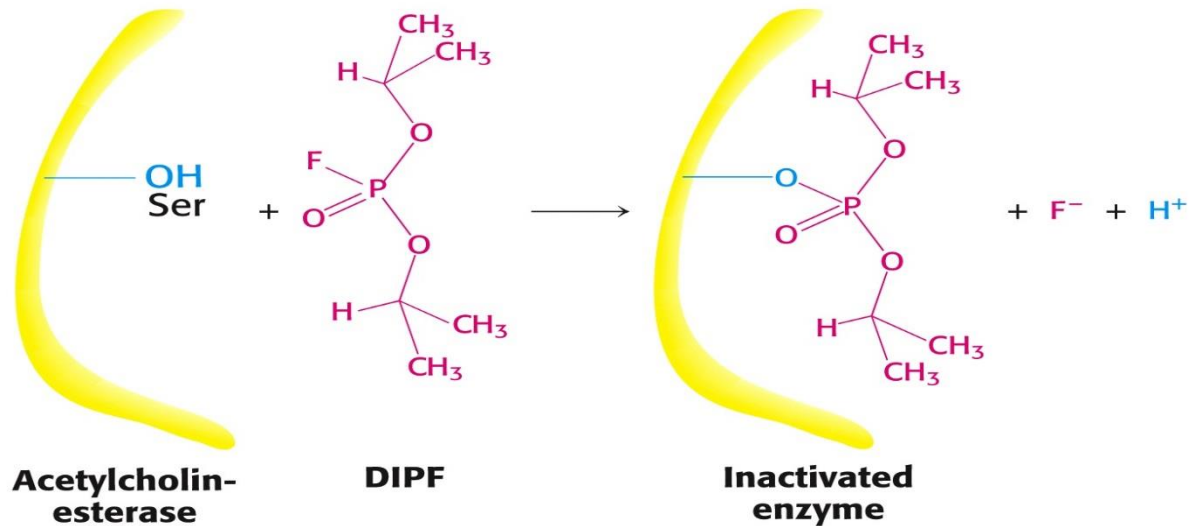
- inhibitor pevně vázán na enzym (akt. místo)
- organofosfáty
- ionty těžkých kovů
- kyanidy

Reverzibilní

- inhibitor volně vázán
- rovnováha $E+I \rightleftharpoons E-I$
- inhibitor lze odstranit (dialýza, gel. filtrace)
- dva základní typy:

kompetitivní, nekompetitivní

Příklad ireverzibilní inhibice

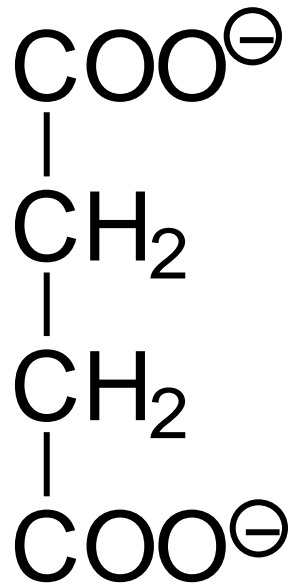


Diisopropylfluorofosfát DIPF (organofosfát) inhibuje acetylcholinesterasu fosforylace serinového zbytku

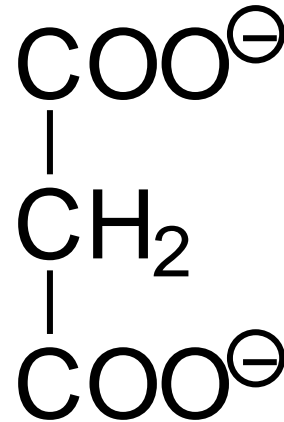
Kompetitivní inhibice

- inhibitor je strukturně podobný substrátu
- váže se do aktivního místa
- soutěží s přirozeným substrátem o vazebné místo

Přirozený substrát vs. kompetitivní inhibitor



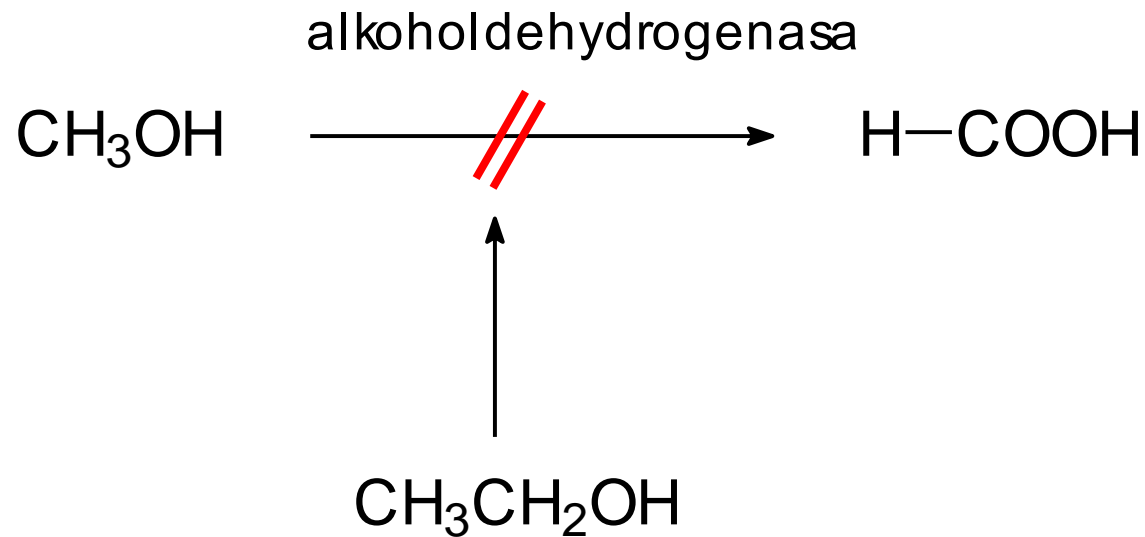
sukcinát



malonát

malonát je inhibítozem sukcinátdehydrogenasy

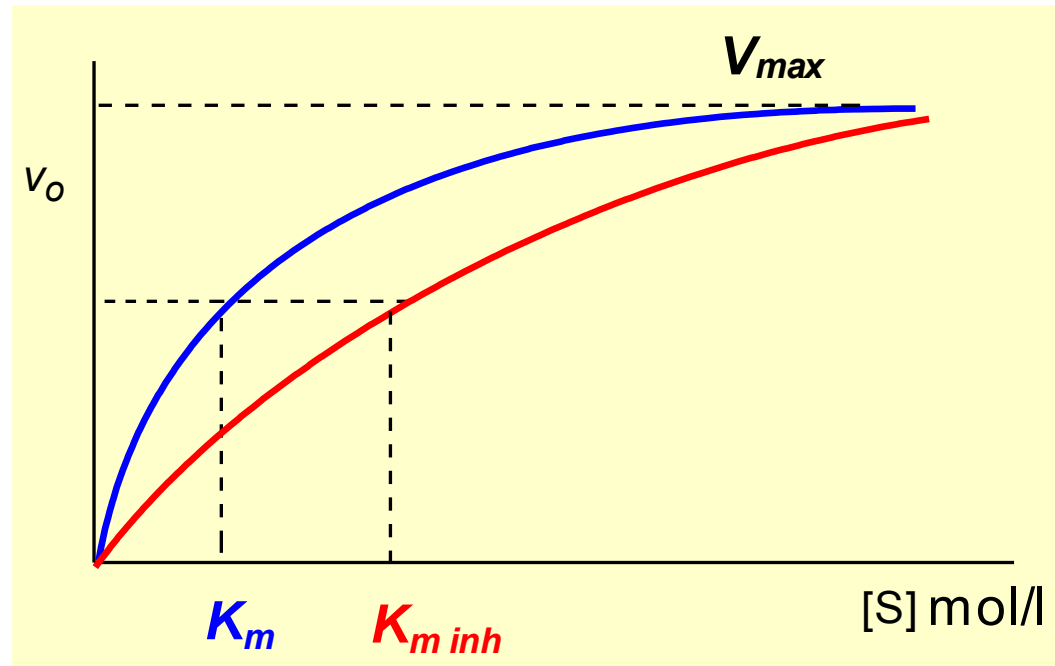
Otrava methanolem se léčí ethanolem



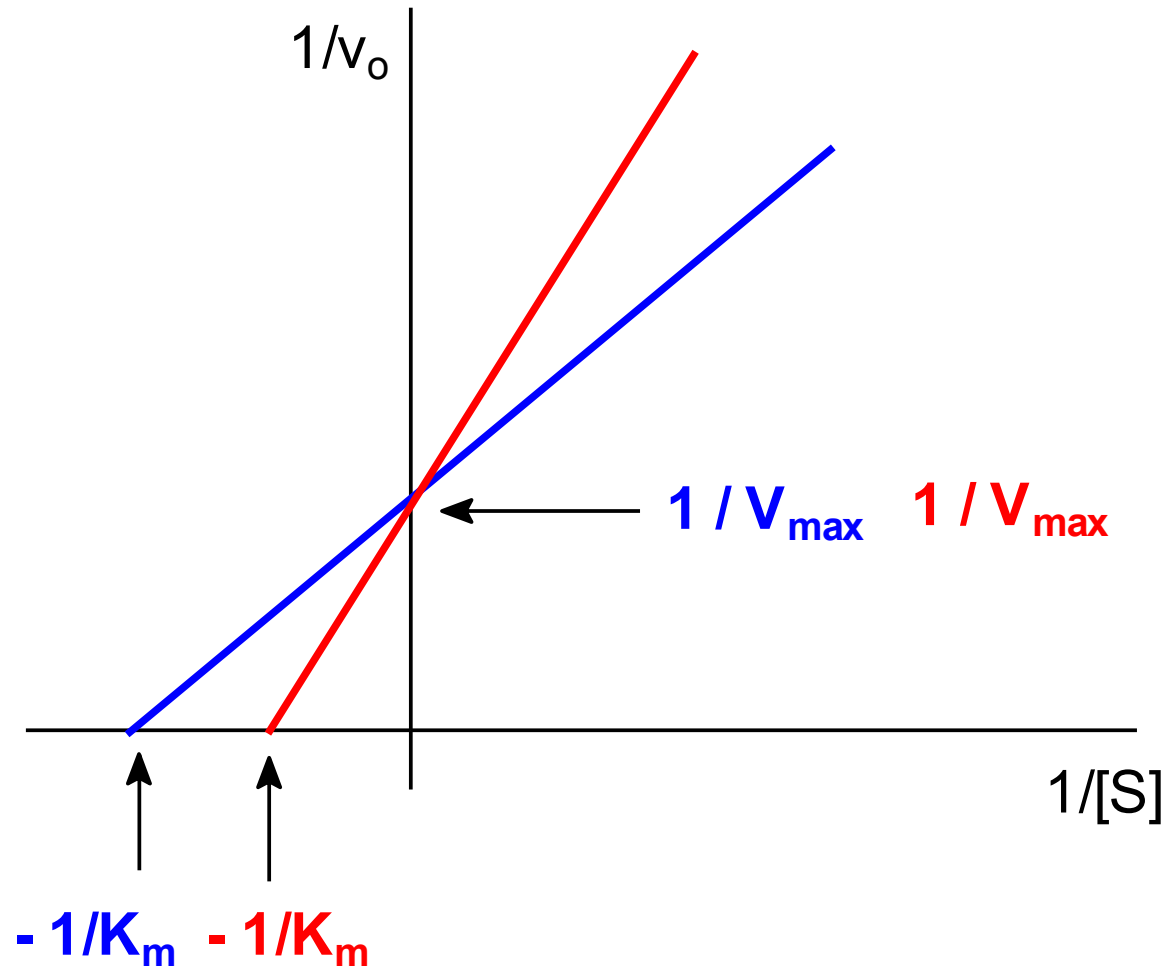
Vznik toxických produktů je inhibován ethanolem, který vytěsňuje methanol z vazebného místa enzymu – kompetitivní inhibice dehydrogenace methanolu

Kompetitivní inhibice

- maximální rychlost je dosažena až za vyšších hodnot [S]
- V_{max} se nemění
- K_m se zvyšuje

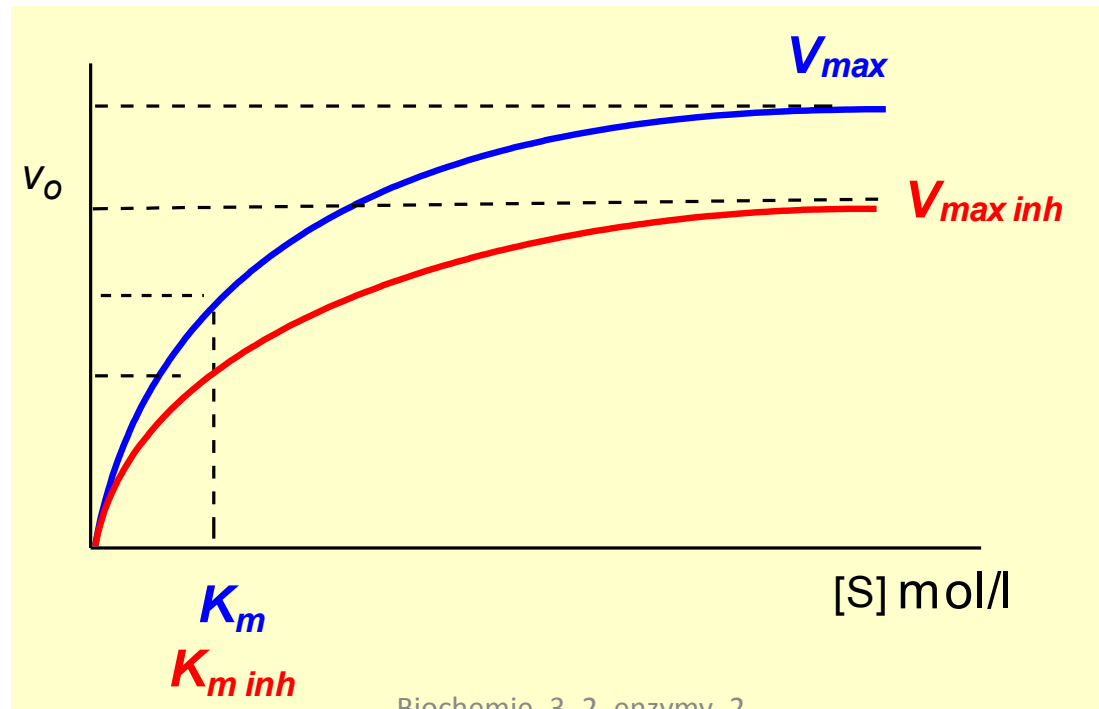


Kompetitivní inhibice

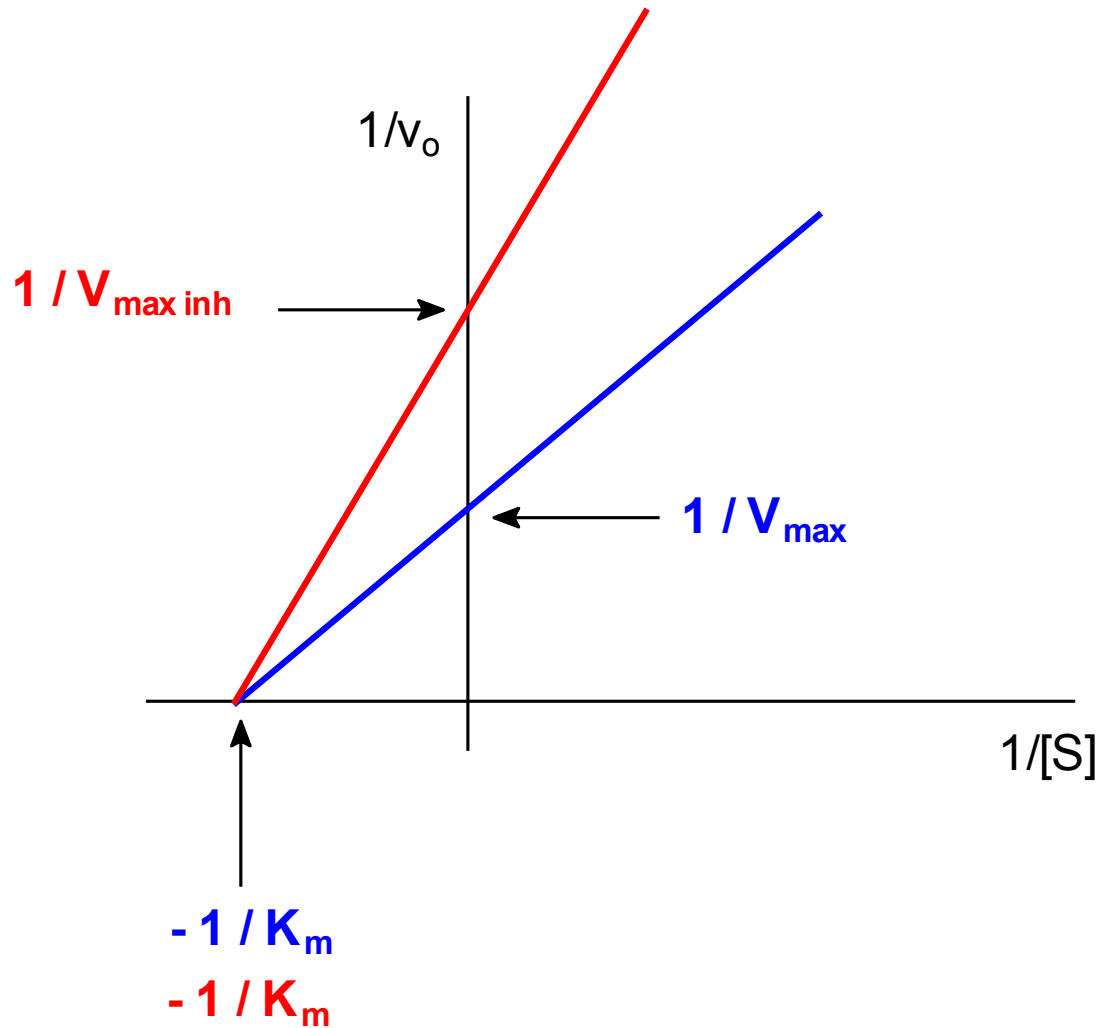


Nekompetitivní inhibice

- Inhibitor se váže mimo aktivní centrum na E i na komplex E-S
- K_m se nemění (aktivní místo je volné pro substrát)
- V_{max} se snižuje, protože klesá koncentrace funkčního komplexu E-S



Nekompetitivní inhibice



Mnohá léčiva jsou inhibitory enzymů

- Acetylsalicylová kyselina (cyklooxygenasa)
- Ibuprofen (cyklooxygenasa)
- Statiny (HMG-CoA reductasa) – hypolipidemika, snižují syntézu cholesterolu (lovastatin)
- Inhibitory ACE (angiotensin konvertující enzym) – léčba hypertenze (enalapril)
- Reverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy (neostigmin) – nervosvalové choroby, pooperační atonie střev
- Selektivní inhibitory mozkové acetylcholinesterasy (rivastigmin, galantamin) - Alzheimerova choroba

Antibiotika inhibují enzymy nutné pro určitý životní děj bakterií

- Peniciliny – inhibují transpeptidasy (výstavba buněčné stěny)
- Tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol – inhibice proteosyntézy
- Fluorované chinolony (ciprofloxacin) – inhibice bakteriální gyrasy (topoisomerasy II) (rozplétání DNA během replikace)

Regulace enzymové aktivity

(tři obecné způsoby)

1. Regulace množství molekul enzymu
2. Regulace biologické aktivity enzymu
3. Dostupnost a koncentrace substrátu a/nebo kofaktoru (*in vivo* méně významný faktor)

Regulace množství enzymu

- **Řízená proteosyntéza enzymu**

konstitutivní a indukovaná exprese genů, regulace rychlosti transkripce, posttranskripčních úprav RNA, regulace rychlosti translace a posttranslačních úprav

- **Řízená degradace enzymu**

specifické intracelulární proteinasy – určují rozdílné biologické poločasy enzymů

Regulace biologické aktivity enzymu

- Izoenzymy (jeden typ reakce je regulován odlišně v různých tkáních)
- Aktivace enzymu částečnou a nevratnou proteolýzou
- Vratná kovalentní modifikace enzymu
- Allosterická regulace

Izoenzymy

- katalyzují stejnou reakci, ale liší se primární strukturou a tedy fyz.-chem. a kinetickými vlastnostmi
- mají často různou tkáňovou distribuci
- stanovují se elektroforézou
- **izoformy** – obecnější termín (zahrnují ještě pseudoizoenzymy, posttranslační varianty)

Kreatinkinasa (CK) je dimer a tvoří tři izoenzymy

Izoenzym	Výskyt	Procento celk. aktivity	Zvýšení
CK-MM	svaly	94-96 %	svalové trauma
CK-MB	srdce	do 6 %	infarkt
CK-BB	mozek	stopy	poranění mozku

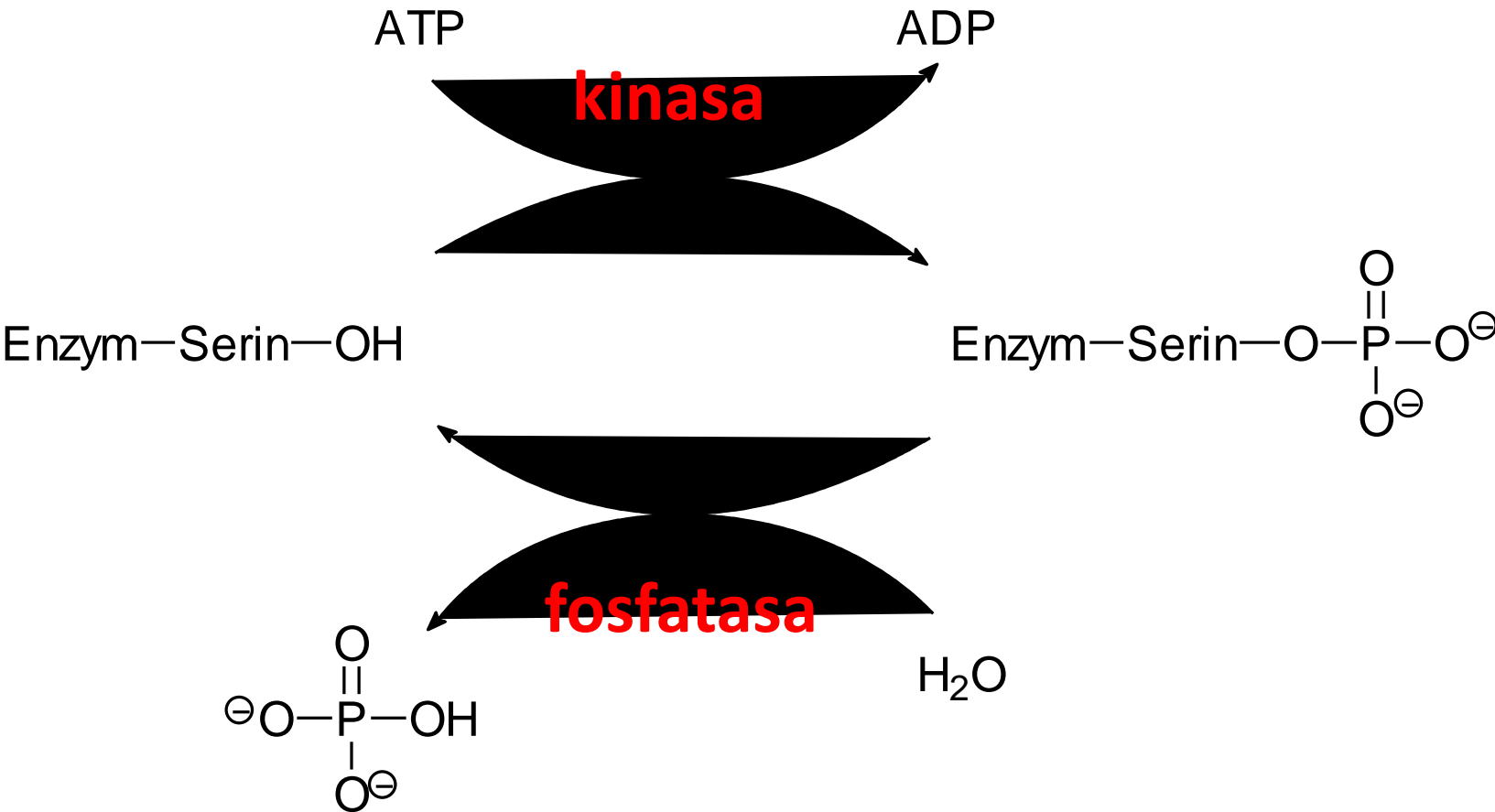
Aktivace enzymu částečnou proteolýzou

- Aktivní enzym vzniká nevratným odštěpením určité sekvence z molekuly proenzymu
- Proteinasy v GIT (pepsinogen → pepsin)
- Faktory krevního srážení
- Proteinasy (kaspasy) aktivované v průběhu apoptózy

Reverzibilní kovalentní modifikace enzymu

- **fosforylace**, katalyzují kinasy,
přenos fosforylu $-\text{PO}_3^{2-}$ z ATP na $-\text{OH}$ skupinu
enzymu (Ser, Thr, Tyr)
- vratný děj (defosforylaci) katalyzují **fosfatasy**,
hydrolýza esterově vázaného fosfátu
- Jiné modifikace: karboxylace, acetylace, ...

Fosforylace a defosforylace enzymu



Příklad

Glykogenfosforylasa

- Katalyzuje štěpení glykogenu anorg. fosfátem
- Fosforylovaný enzym je **aktivní**
- Defosforylovaný enzym je **neaktivní**

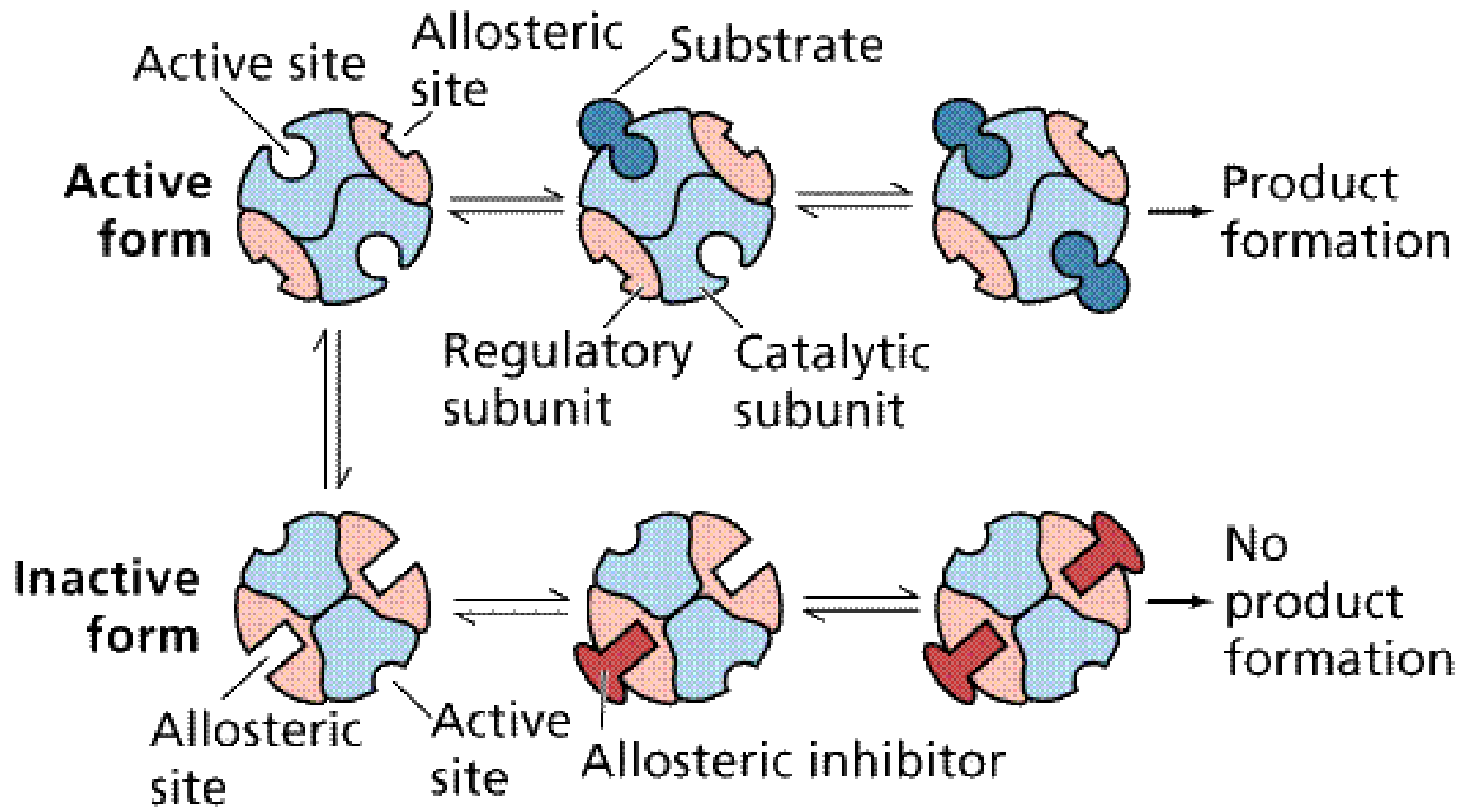
Glykogensynthasa

- Katalyzuje syntézu glykogenu z UDP-glukosy
- Fosforylovaný enzym je **neaktivní**
- Defosforylovaný enzym je **aktivní**

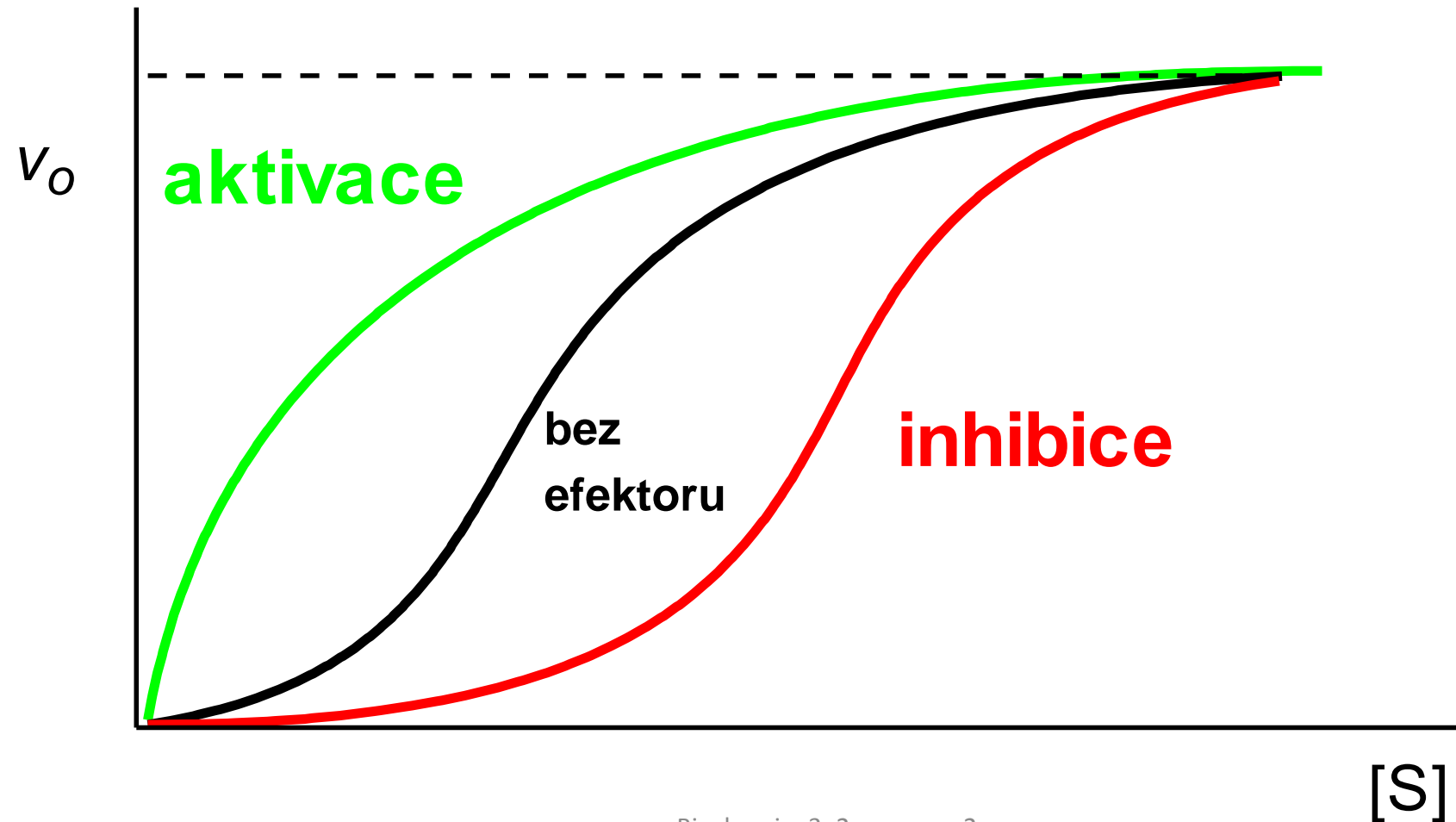
Allosterické enzymy jsou oligomerní

- více podjednotek, často regulační a katalytická
- na enzym se váže efektor strukturně odlišný od substrátu, často produkt
- váže se do allosterického místa – **jiné než aktivní místo**
- vazba vyvolá změnu konformace enzymu \Rightarrow změna aktivity - allosterická aktivace nebo inhibice

Allosterické enzymy jsou oligomerní



Saturační křivka allosterických enzymů je sigmoidní



Kooperativní efekt

- u oligomerních enzymů a proteinů
- více podjednotek \Rightarrow více vazebných míst
- navázání substrátu (nebo jiné látky) na jednu podjednotku indukuje změny konformace u ostatních, že se další molekuly vážou snadněji (obtížněji)
- příklad: hemoglobin \times myoglobin

Trojí využití enzymů v lékařství

1. enzymy jako **indikátory** patologického stavu
2. enzymy jako **analytická činidla** v klin. biochemii
3. enzymy jako **léčiva**

Příklady enzymů v klinické diagnostice

Při poškození buněk se zvyšuje aktivita intracelulárních enzymů v extracelulární tekutině

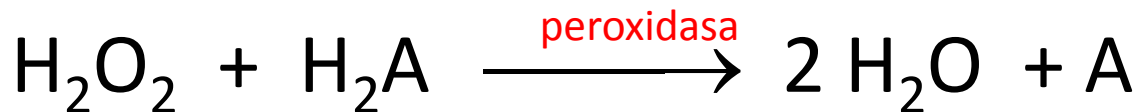
Enzym	Referenční hodnoty	Interpretace zvýšení
ALT	do 0,9 μ kat/l	hepatopatie
CK	do 4 μ kat/l	myopatie, infarkt myokardu
PSA	do 4 μ g/l	karcinom prostaty

ALT alaninaminotransferasa, CK kreatinkinasa, PSA prostatický specifický antigen

Enzymy jako analytická činidla

Enzym	Původ enzymu	Stanovení
Glukosaoxidas	<i>Aspergillus niger</i>	glukosa
Peroxidas	křen (<i>Armoracia</i> sp.)	glukosa
Lipasa	<i>Candida</i> sp.	triacylglyceroly
Cholesteroloxidas	<i>Pseudomonas</i> sp.	cholesterol
Urikasa	<i>Candida</i> sp.	kyselina močová
Bilirubinoxidas	<i>Myrothecium</i> sp.	bilirubin
Ureasa	bob (<i>Canavalia</i> sp.)	močovina
Laktátdehydrogenasa	<i>Pediococcus</i> sp.	ALT, AST
<i>Taq</i> polymerasa	<i>Thermus aquaticus</i>	PCR metoda

Enzymové stanovení glukosy



bezbarvý
chromogen

barevný produkt
(měří se absorbance)

Princip stanovení glukosy v analyzátorech

Osobní glukometry

- určené pro osobní kontrolu u diabetiků
- glukosaoxidas je zakotvena na pevné fázi
- vznikající H_2O_2 se stanovuje jiným způsobem
(pomocí Pt-elektrody)
- na displeji se ukáže koncentrace glukosy (mmol/l)

Osobní glukometr



Pankreatické enzymy v terapii

- směs enzymů (lipasy, amylasy, proteiny)
získaná z vepřových pankreatů
- indikace: sekreční nedostatečnost pankreatu různé etiologie, cystická fibróza
- užívání: 3 × denně při jídle
- řada přípravků volně prodejných

acidorezistentní
tobolky,
rozpadají se
až v duodenu

Asparaginasa v terapii leukémie

- Katalyzuje hydrolýzu amidové skupiny asparaginu
- $\text{Asn} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Asp} + \text{NH}_3$
- L-asparagin je nezbytný pro proteosyntézu některých nádorových buněk, Hydrolýza Asp vede k omezení proliferace
- Indikace: akutní lymfoblastické leukemie, viz Semináře str. 19

Enzymová fibrinolytika

- léčiva, která rozpouštějí krevní sraženiny v cévách
- streptokinasa (bakteriální, **není enzym**), urokinasa (lidská)
- štěpí plazminogen na plazmin – ten vyvolá degradaci fibrinu a trombolýzu
- indikace: žilní trombóza, plicní embolie, akutní IM

Proteasy v lokální a systémové terapii

- **Lokální působení:** fibrinolyzin, chymotrypsin, kolagenasa
- po lokální aplikaci vedou k lýze nekrotické tkáně, nepoškozují zdravé buňky (obsahují inhibitory proteas)
- hnisavé rány, bércové vředy, diabetické gangrény, dekubity apod.
- **Celkové působení:** Trypsin, chymotrypsin, rostlinné proteasy - papain (papaya), bromelain (ananas)
- některé studie naznačují protizánětlivý účinek, ovlivnění imunity u autoimunitních onemocnění
- indikace: pomocná léčiva při revmatoidní artritidě, traumatické záněty a otoky, lymfedémy, záněty žil apod.
- volně prodejné přípravky (Wobenzym, Phlogenzym aj.)

Příklad 1

Při enzymové reakci byl do roztoku substrátu v pufru přidán vzorek obsahující enzym (0,1 ml).

Po 5 min bylo stanoveno 0,2 mmol produktu.

Jaká je katalytická koncentrace enzymu ve vzorku?

Příklad 1 - Řešení

$$t = 5 \text{ min} = 5 \cdot 60 \text{ s} = 300 \text{ s}$$

za 300 s ... vzniklo 0,2 mmol produktu

za 1 s ... $x = 0,2/300 = 6,7 \cdot 10^{-4}$ mmol / na 0,1 ml vzorku

na 1 litr vzorku = $6,7 \cdot 10^{-4} \cdot 10^4 = 6,7 \text{ mmol/l.s} = \mathbf{6,7 \text{ mkat/l}}$

Příklad 2

Reakční směs obsahovala:

2,5 ml pufru

0,2 ml roztoku koenzymu NADH (optický test)

0,1 ml krevního séra

0,2 ml roztoku substrátu

Po 60 s byl pokles absorbance koenzymu $\Delta A = 0,03$.

$\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ l/mol.cm}$, šířka kyvety $l = 1 \text{ cm}$.

Jaká je katalytická koncentrace enzymu?

Příklad 2 - Řešení

Vzorek séra byl zředěn: $V_{\text{kon}}/V_{\text{puv}} = 3,0 / 0,1 = 30$

Lambertův-Beerův zákon: $\Delta A = \varepsilon \Delta c l$ / za urč. čas $\Delta t \Rightarrow$

z toho odvodíme změnu koncentrace za 60 s:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l \cdot \Delta t} = \frac{0,03}{6220 \cdot 1 \cdot 60} = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l.s}$$

Nutno násobit zředěním: $30 \cdot 8 \cdot 10^{-8} = 2,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l.s} =$

$2,4 \cdot 10^{-6} \text{ kat/l} = \mathbf{2,4 \mu\text{kat/l}}$