

10.XII.2019.

ENZIMI I NJIHOV ZNAČAJ

Enzimi

- *Enzimi su katalizatori biološkog porekla*
- *po hemijskoj prirodi su proteini*
- *u ćeliji obezbeđuju tok i odigravanje hemijskih reakcija*

- Hemijske reakcije u organizmu su inače moguće tj. mogu se odigravati bez enzima
 - bez enzima bi one bile spore
 - proizvodi tih reakcija bi se javljali u smanjenoj koncentraciji
- Enzimi su jako efikasni katalizatori, u jedinici vremena izmene velike količine supstrata

malo istorije...

- Enzimski procesi u organizmu su poznati od davnina (npr. sirenje sira, kišeljjenje testa, prevođenje šire u vino).
- Naziv 'enzim' dao je Kun 1878.godine od reči en - u i zyme - kvasac, jer je pravilno uočio da u kvascu postoji supstanca koja katalizuje reakciju vrenja.
- Naučno proučavanje enzima je počelo u XIX veku kada su stvoreni temelji enzimologije tj nauke o enzimima.
- Prvi enzim je izolovao Samner 1926.g. i to je ureaza u kristalnom obliku - po hemijskoj prirodi je protein. Posle su izolovani i drugi enzimi proteinske prirode.

Nomenklatura

- ili kako dati naziv enzimu-

- trivijalni nazivi: ptijalin, pepsin, tripsin, himotripsin.
- sistemski nazivi: enzimu se daje naziv po imenu supstrata na koji deluje, doda se samo sufiks AZA.
 - ureaza koja deluje na ureu,
 - amilaza deluje na amilum (skrob),
 - arginaza deluje na arginin (aminokiselina).
- najnovije preporuke: enzimu se daje naziv tako da se vidi na koji supstrat deluje i koji tip reakcije katalizuje. Npr. protein hidraza (vrši hidrolizu proteina)

INFORMACIJE KOJE SE MOGU DOBITI PRAĆENJEM

ENZIMSKE AKTIVNOSTI U KRVNOJ PLAZMI:

- ✓ *dijagnoza*
 - ✓ *pracenje toka bolesti*
 - ✓ *odgovor na terapiju*
 - ✓ *prognoza bolesti*
-
- *Idealno je pratiti aktivnost enzima koji je **visoko tkivno-specifičan** (kisela-fosfataza u prostati, ili acetil-holinesteraza u eritrocitima).*

 - *Neki enzimi imaju **tkivno-specifične izoenzimske forme** (laktat-dehidrogenaza) koje je moguće razlikovati elektroforezom.*

Specifičnosti enzima za pojedine organe

- Prema rasprostranjenosti:
 1. organ nespecifični:
enzimi glikolize, oksidacije i disanja
 2. organ specifični:
samo u specifičnim organima (AMI, LIP, arginaza)
 3. organ specifični izoenzimi
prostatična kisela fosfataza

Prilikom lezije tkiva u cirkulaciji se pojavljuju aktivnosti enzima u onakvim međusobnim odnosima kao i u oštećenom organu.

Primena enzima u medicini

1. Dijagnostički indikatori - dijagnostička enzimologija –
Određivanje enzima u plazmi (ređe u tkivima nakon biopsije)
za dijagnozu oboljenja srca, jetre, pankreasa, mišića, kostiju i
drugih tkiva

2. Terapeutski agensi – enzimoterapija

3. Dijagnostička sredstva -

Koriste se kao hemikalije (enzimski regensi) za laboratorijska
određivanja:

Biohemijskih parametara

ELISA testovi - hemostazi, imunohemiji, virusologiji,
citohistologiji,

Molekularnoj biologiji PCR metode

Klinička enzimologija ili dijagnostička enzimologija

- Koji je značaj kliničke enzimologije u laboratorijskoj medicini ?
- 20-25 % analiza su određivanje aktivnosti enzima u kliničkim laboratorijama
- 12-15 enzima su važni u kliničkoj enzimologiji kao biohemijski markeri određenih oboljenja i rutinski se određuju
- Određujemo enzime:
 1. pre svega u plazmi ili serumu
 - Serumski enzimi
 2. Eritrocitima
 - Eritrocitni enzimi

Dijagnostički značaj enzimske analize

- **Detekcija enzimske deficijencije u ćeliji**
 - Urođene greške metabolizma
 - Stečene deficijencije
 - Kod deficijencije vitamina
 - Kod trovanja (trovanje organofosfatnim jedinjenjima holinesteraza)
- **Detekcija oštećenja tkiva merenjem ekstracelularnih enzima u raznim telesnim tečnostima**
 - Serum, plazma, urin, likvor itd

Enzimi su plazmatski markeri oštećenog tkiva

Ciljevi određivanja enzimске aktivnosti u plazmi

1. Utvrditi oštećenje tkiva
2. Identifikovati organ iz koga potiče oštećenje
3. Utvrditi koliki je opseg oštećenja u tkivu
4. Dijagnostikovati osnovne bolesti
5. Uspoređivati aktivnosti enzima
6. Utvrditi prisutnost izoenzima

Klasifikacija enzima u dijagnostici

Klasifikacija prema:

- Hemijskoj funkciji – reakciji koju katalizuju
- Mestu delovanja
- Fiziološkom delovanju

Prema mestu njihove funkcije:

1. **Ekstracelularni enzimi** (sekretorni, enzimi lučenja)

Funkciju ostvaruju van ćelije

2. **Intracelularni enzimi**

Aktivni su samo u ćeliji

Uglavnom enzimi osnovnih metaboličkih puteva

Klasifikacija enzima u plazmi



1. Sekretorni enzimi

A. Inkretorni enzimi ili enzimi unutrašnjeg lučenja

- Sintetišu se na endoplazmatičnom retikulumu hepatocita i izlučuju u krv gde ostvaruju svoju funkciju
 - Faktori koagulacije
 - Holinesteraza
 - Ceruloplazmin
 - Lipoproteinska lipaza

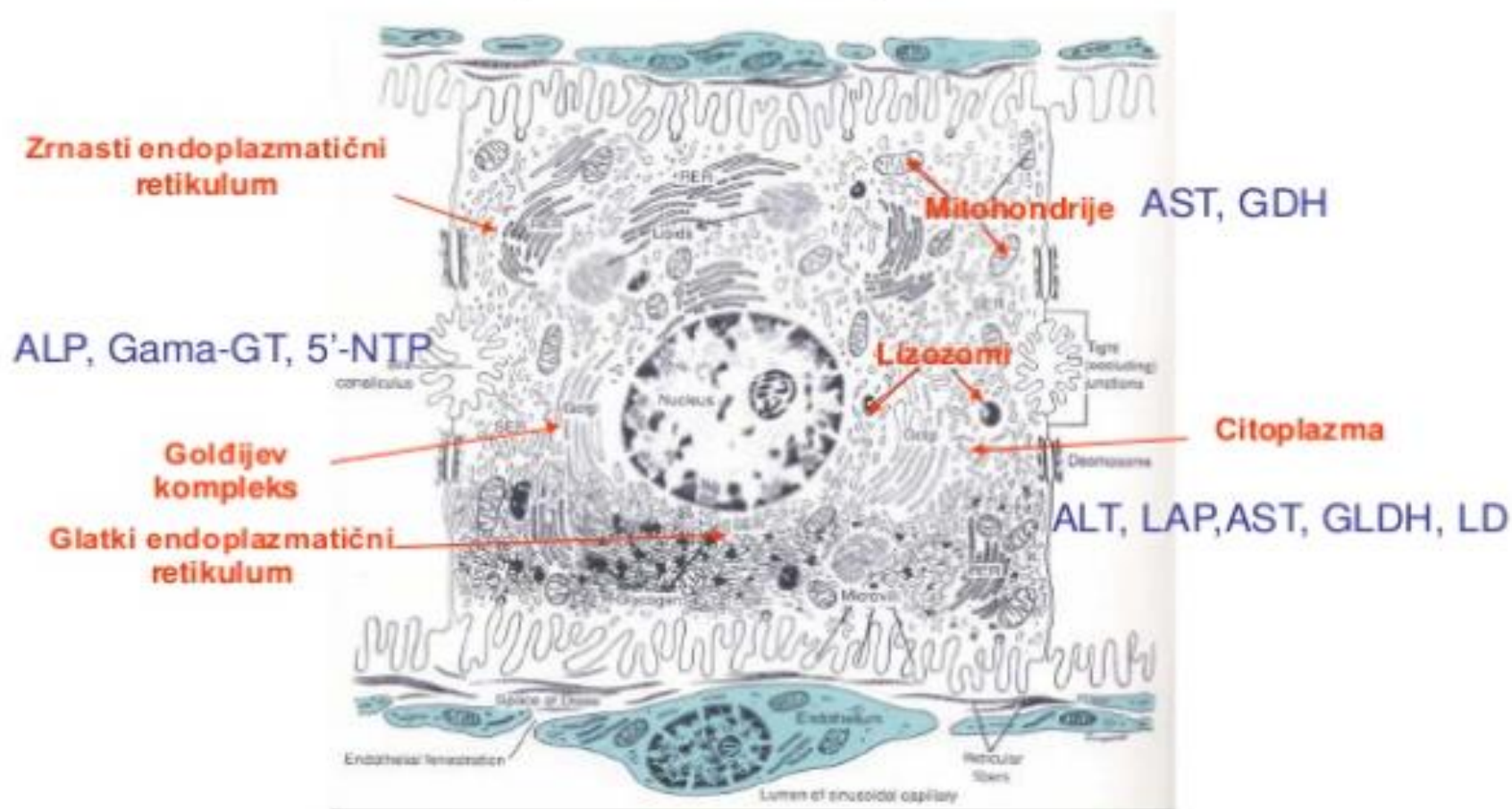
B. Ekskretorni enzimi

- Sintetišu se u fundusu želuca, acinusnom delu pankreasa i sluznici creva
 - Pepsinogen
 - Amilaza
 - Tripsinogen
 - Himotripsinogen
 - Karboksipeptidaza



2. Intracelularni enzimi

Lokalizacija enzima u hepatocitima



2. Intracelularni enzimi

- **Citoplazmatski enzimi**

- Rastvorljivi
- Enzimi glikolize, pentoznog šanta, specifične hidrolaze

- **Specifični enzimi organela – subcelularni enzimi**

- Čvrsto vezani - dezmoenzimi

- **Mitohondrijalni**

- Enzimi CLK, oksidativne fosforilacije, AST

- **Lizosomalni**

- Kisele hidrolaze: kiselna fosfataza, beta-glukozidaza
- Prisustvo ovih enzima u krvi ukazuje na autolizu i nekrozu.

- **Membranski enzimi**

- Enzimi transporta
- U četkastom epitelu tankog creva, žučnih kanalića i bubrežnih tubula
- Alkalna fosfataza, alanin aminopeptidaza

- **Podela celularnih enzima**

- Unilokularni enzimi ALT, LDH, GLDH
- Bilokularni enzimi AST i MDH
 - m-enzim nerastvorljiv, c-enzim rastvorljiv

Faktori koji utiču na aktivnost (koncentraciju) enzima u plazmi i serumu

- A. Izlazak enzima iz ćelija u intersticijalni prostor
- B. Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju
- C. Promene u sintezi enzima
- D. Eliminacija enzima tj. klirens enzima

Promene u aktivnosti enzima plazme

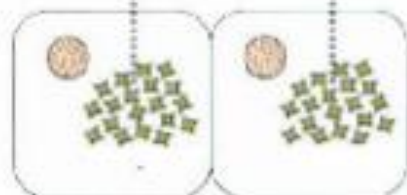
Povećanje aktivnosti enzima

- Povećana permeabilnost membrane
- Citozolni enzimi se oslobađaju
 - Anoksia
 - Poremećaj energetskeg metabolizma
- Ćelijska nekroza
 - Mitohondrijalni enzimi
 - Membranski enzimi
- Indukcija sinteze enzima
 - Lekovi
 - alkohol

Sniženje aktivnosti enzima

- Inhibicija aktivnosti
 - lekovima
- Inhibicija sinteze
 - Oštećenje tkiva
 - Dejstvo lekova

A. Oslobađanje enzima iz ćelija u intersticijalni prostor



Ćelijski enzimi dospevaju u plazmu kao posledica obnove ćelija



A



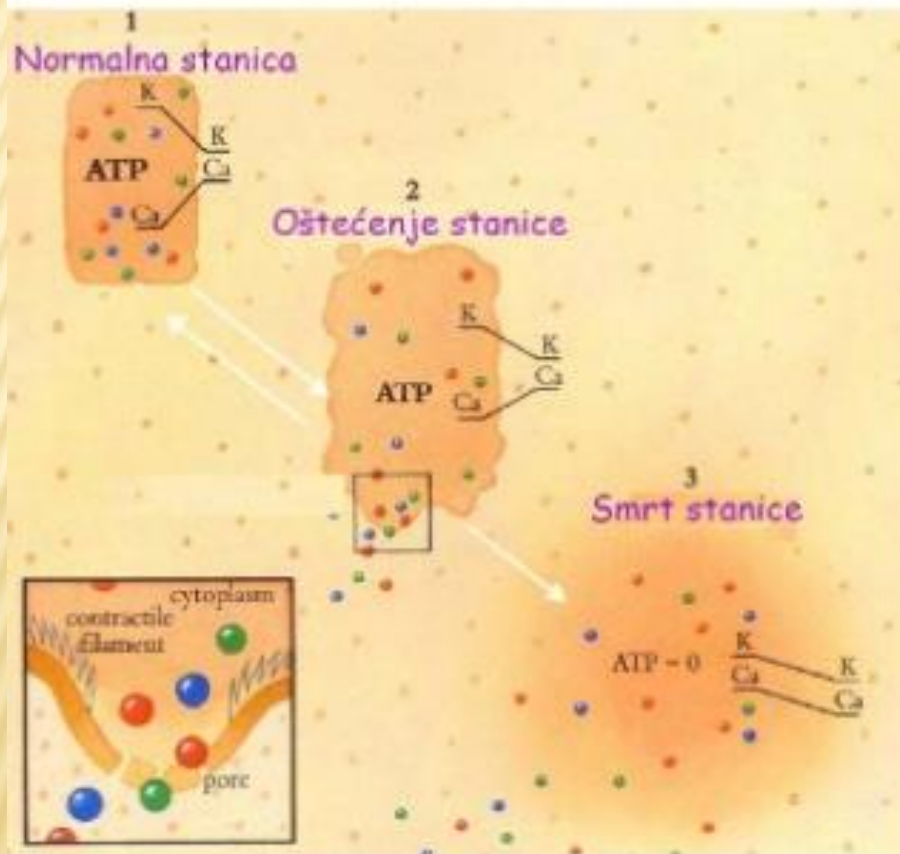
B



Ćelijski enzimi pojačano dospevaju u plazmu kao posledica:
A. Oštećenja ćelija
B. Proliferacije ćelija (B)

Irreverzibilno oštećenje ćelije

A. Oslobođanje enzima iz ćelija u intersticijalni prostor



- Uloga ćelijske membrane u održavanju integriteta ćelije pa i enzima u ćeliji
- Zavisnost procesa od **ATP**
- Oštećenje ćelijske membrane u stanjima hipoksije
 - Poremećaj Na/K-pumpe
 - Poremećaj u sadržaju vode i smežuranje ćelije
 - Ulazak kalcijuma i stimulacija intracelularnih enzima
 - Stvaranje slobodnih radikala
 - Smrt ćelije

Uzroci oštećenja i smrti ćelija

- **Hipoksija**
 - ateromatozni plakovi, trombi: neadekvatna oksigenacija
 - gubitak kapaciteta vezivanja kiseonika: trovanje CO i anemija
- **Hemikalije i lekovi:**
 - olovo, živa;
 - lekovi, alkohol, duvan
- **Fizički agensi**
 - Trauma, ekstremno visoke temperature, radijacija, električna energija, toksini
- **Mikrobiološki agensi**
 - virusi, bakterije, gljive, protozoe i helminti
- **Imuni mehanizmi**
 1. Anafilaksa
 2. Citotoksičnost – liza ćelije
 3. Bolest imunih kompleksa
 4. Hipersenzitivnost ćelija
- **Genetski defekti**
 - Poligensko nasleđe – dijabet, giht
 - Mendelijeve bolesti vezane za X-hromozom, urođene greške metabolizma, bolesti sa varijabilnim modelom nasleđivanja
- **Nutricione bolesti:**
 - malnutricija proteina, deficijencija vitamina i minerala, gojaznost.

B. Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju

- Kada se jednom uspostave uslovi za izlazak enzima iz oštećenih ćelija brzina i količina enzima koja prelazi u cirkulaciju zavisi od više faktora:
- Koncentracioni gradijent
- Difuzija
 - Brže izlaze male molekule
- *Prelaz enzima iz eritrocita i endotelnih ćelija u krv*
 - Vrlo brz
- *Prelaz iz intersticijalnog prostora u cirkulaciju:*
 1. **Direktan kroz zidove kapilara**
 - velika permeabilnost kapilara
 - jetra, delimično i u srcu
 2. **Putem limfne drenaže**
 - manja permeabilnost kapilara
 - GIT, pankreas, srce

B. Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju

- **Uticaj intracelularne lokacije enzima na efluks enzima**
- **Oslobađanje membranskih enzima**
 - Disocijacija ili degradacija
- **Oslobađanje enzima vezanih za organele**
 - Mitohondrijalni enzimi
 - Teže oslobađanje
 - Ireverzibilno razgradnja ćelije

Primeri

1. Infarkta miokarda

Nekroza tkiva

24 sata posle IM enzimski profil u cirkulaciji odražava profil u tkivu miokarda

2. Hronične bolesti jetre

Uticaj sinteze enzima i brzine uklanjanja iz cirkulacije

GGT - ektoenzim

C. Promene u sintezi enzima

- Normalno : minimalne količine intracelularnih enzima u plazmi zbog oslobađanja enzima u plazmu
- Smanjeno oslobađanje enzima zbog smanjene sinteze enzima
 - Genetski defekt u sintezi enzima
 - Hipofosfatemija na alkalnu fosfatazu
 - Nulti ili silent alel kod serumske holinesteraze
- Povećana sinteza enzima
 - Veći klinički značaj
 - Povećanje broja i aktivnosti osteoblasta
 - Kod dece u periodu rasta i kod bolesti kostiju
- Indukcija sinteze enzima
 - Gama-GT prilikom uzimanja lekova
 - barbiturata i fenitoina
 - alkohola

D. Eliminacija enzima iz cirkulacije

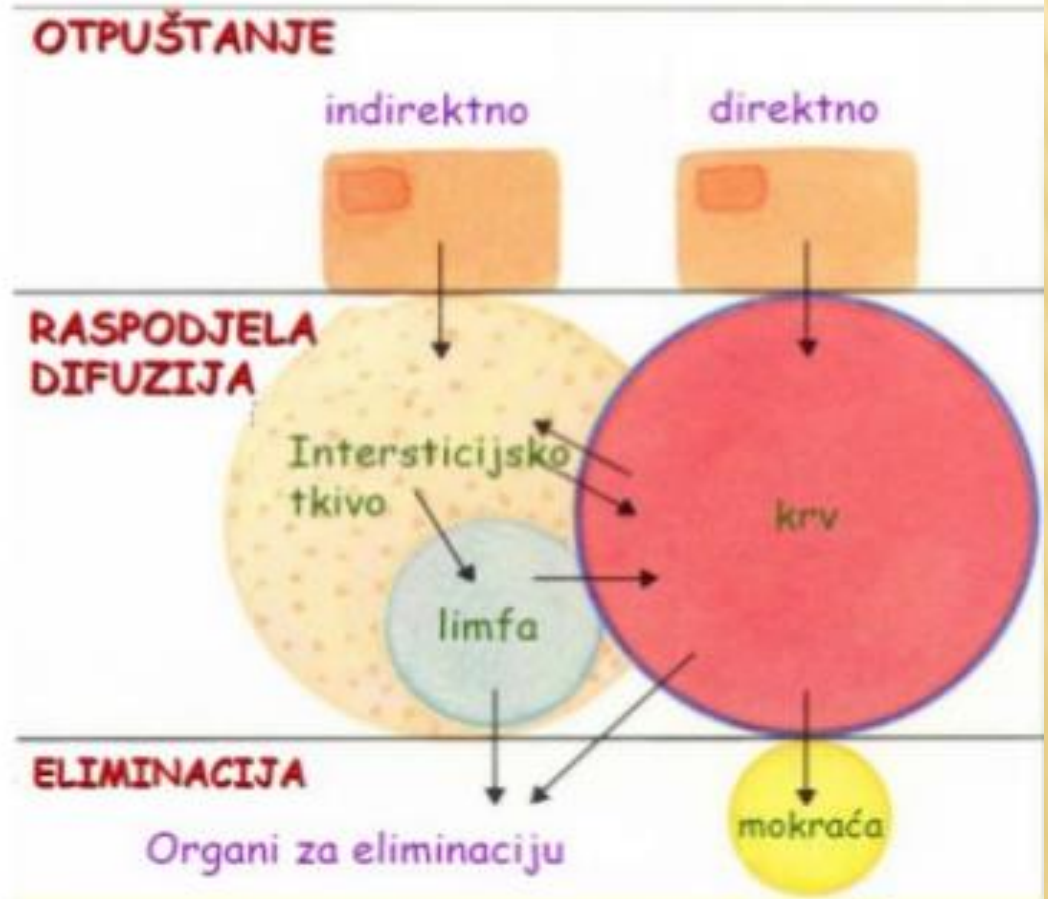
Klirens enzima putem:

1. Urina (amilaza)
2. RES

kostna srž, slezina i jetra

(Kupferove ćelije)

CK, AK, mAST i cAST, MD



Enzimoterapija

- Oralno davani lekovi
- Tretman raznih bolesti:
 - pankreasa, GIT
 - Inflamatornih oboljenja
 - Edema
 - Autoimunih bolesti
 - Virusnih bolesti : herpes i AIDS
 - Kancera
- Primeri lekova:
- Pancreatin – tripsin, himotripsin, lipaza, amilaza
- Wobenzym – pankreasni enzimi i biljni proteolitički enzimi
- – tripsin, himotripsin, papain (Carica papaya), bromelain (ananas)

Enzimi kao terapijski agensi kod urođenih grešaka u metabolizmu

- Urođene greške metabolizma su posledica deficijencije određenih enzima.
- Teoretski bi enzimoterapija i nadoknada enzima koji nedostaje trebalo da ukloni simptome
- Problem je što enzimi ne prolaze kroz ćelijsku membranu, a mogu prouzrokovati i imuno reakciju
- Rešenje problema je primena lipozoma tj lipoproteinskih partikula u koje je enzim inkorporiran
- Dolazi do fuzije lipozoma i membrane i na taj način enzim ulazi u ćeliju
- Lipozomi štite enzim i od imunog odgovora organizma i od enzima degradacije
- Primena kod lizozomalnih bolesti deponovanja

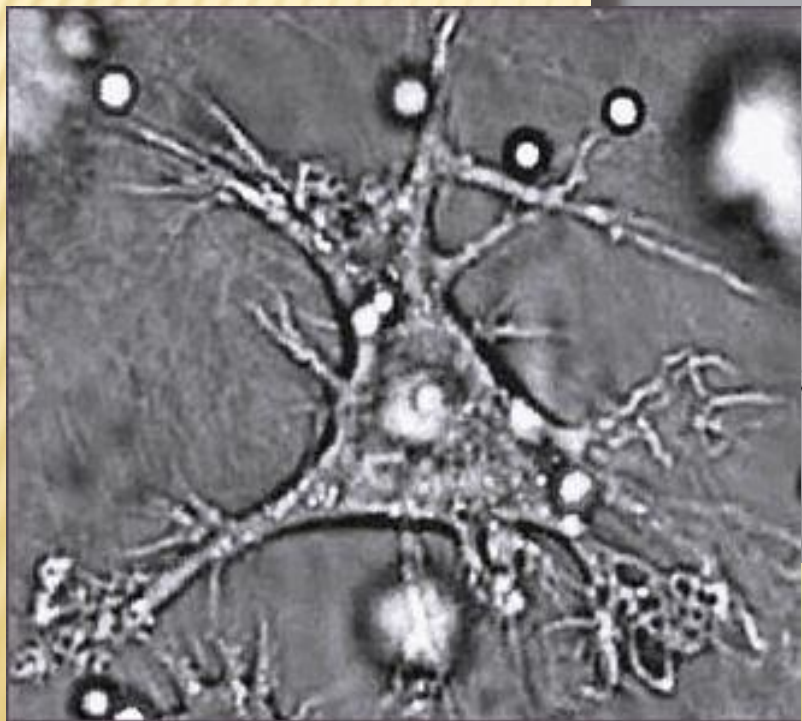
Enzimi kao terapijski agensi

- Primena enzimoterapije kod infarkta miokarda
- Upotreba enzima da liziraju ugrušak tj fibrinska vlakna
- Streptokinaza
 - Iz bakterije genus *Streptococcus*
- Urokinaza i plasmin, koji su normalno prisutni u krvi
 - Ovi enzimi se daju u vidu infuzije i to vrlo rano kao bi sprečili ozbiljnija oštećenja
- Aktivatori plazminogena
 - Prevede inaktivni plazminogen u plasmin koji je prirodni fibrinolitički enzim
 - Aktivatori plazminogena se dobijaju genetskim inženjeringom

Enzimi kao ciljna terapija

- Enzimi sudeluju u metaboličkim procesima i specifičnim reakcijama i samim tim su idealni ciljevi
- Problem je što je većina enzima u ćeliji i to u organelama tako da enzim mora da prođe više membrana da bi delovao.
- Lekovi deluju na aktivnost enzima
 - Povećanje aktivnosti
 - Smanjene aktivnosti
 - Obično se koristi lek koji deluje na regulatomi enzim metaboličkog puta
 - Dejstvo leka zavisi i od kontrolnog mehanizma enzimske reakcije
 - U slučaju feedback mehanizma taj mehanizam kontrole prevazilazi efekat leka
- Lekovi stimulišu gensku ekspresiju, stimulišu sintezu i povećavaju količinu enzima
 - Povećana je onda i aktivnost enzima
- Lekovi su najčešće inhibitori enzima i oni se koriste u sledećim bolestima
 - Psihijatriji, antihipertenzivi, bakterijske infekcije, virusne infekcije (retrovirusi) i kancer

EX VIVO GENSKA TERAPIJA – VAKCINA PROTIV Ca



Selekcija enzimskog testa za dijagnozu ili prognozu

Enzimaska dijagnostika obuhvata:

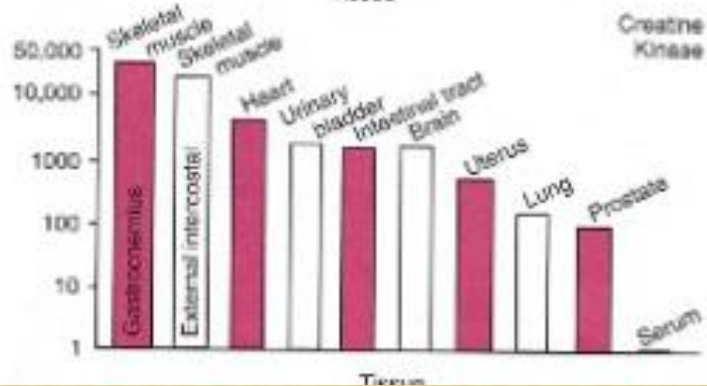
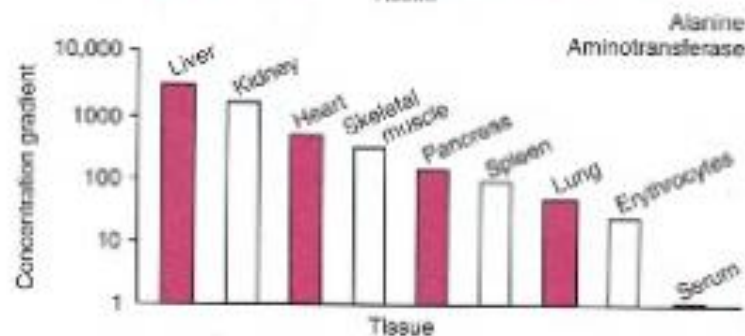
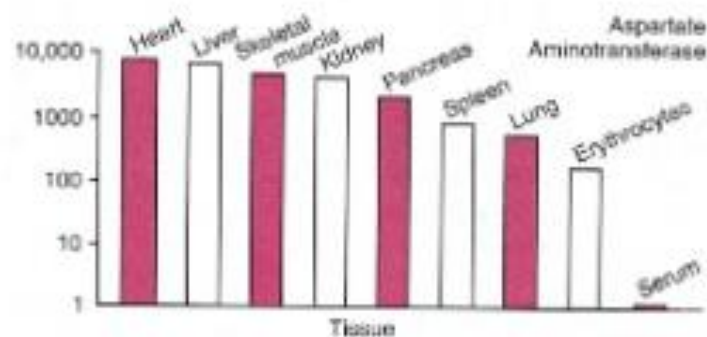
1. Određivanje organo specifičnih enzima
2. Određivanje izoenzimske raspodele u organima
3. Određivanje enzimskih profila u poremećajima funkcije određenog organa i izračunavanje određenih koeficijenata (odnosa)
4. Praćenje enzimske aktivnosti u toku određenih vremenskih intervala

Selekcija enzimskog testa

1. Određivanje organo specifičnih enzima

Izbor enzima koji će se meriti u serumu za dijagnozu ili prognozu zavisi od većeg broja faktora. Važan faktor je distribucija enzima u raznim tkivima.

Koncentracioni gradijenti između raznih tkiva i seruma za AST, ALT i CK



1. Određivanje organo specifičnih enzima

Enzimi kao tkivni markeri

	Serum	Eritrociti	Jetra	Srce	Mišić
AST	1	x15	x7000	x8000	x5000
ALT	1	x7	x3000	x400	x300
LD	1	x300	x1500	x1000	x700
CK	1	<1	<10	x10000	x50000

Osetljivost

Specifičnost

Enzimski profil

Selekcija enzimskog testa

Metode za dijagnostikovanje oboljenja organa pomoću serumskih enzima uključuju:

1. Određivanje organo specifičnih enzima

- Primer: lipaza iz pankreasa

2. Određivanje izoenzima ili izoformi enzima → veća organo-specifičnost

- Pankreasni izoenzim alfa-amilaze
- Koštana izoforma alkalne fosfataze

TABLE 22-2 Distribution of Diagnostically Important Enzymes

Enzyme	Principal Sources of Enzyme in Blood	Principal Clinical Applications
Alanine aminotransferase	Liver	Hepatic parenchymal disease
Alkaline phosphatase	Liver, bone, intestinal mucosa, placenta	Hepatobiliary disease, bone disease
Amylase	Salivary glands, pancreas	Pancreatic disease
Aspartate aminotransferase	Heart, liver, skeletal muscle, erythrocytes	Hepatic parenchymal disease
Creatine kinase	Skeletal muscle, heart	Muscle disease, myocardial infarction
γ -Glutamyltransferase	Liver, pancreas, kidney	Hepatobiliary disease
Lactate dehydrogenase	Heart, erythrocytes, lymph nodes, skeletal muscle, liver	Hemolytic and megaloblastic anemias, leukemia and lymphomas, oncology
Lipase	Pancreas	Pancreatic disease
5'-Nucleotidase	Liver	Hepatobiliary disease

3. Enzimski profili

Određivanje nekoliko enzima (enzimski profil) i posmatranje relativne enzimске aktivnosti, izračunavanje određenih koeficijenata

Mišića i srca

CK
AST
LDH
ALD
GP

Jetre

ALT
AST
ALP
GGT
5NT
CHE
AST/ALT

Pankreasa

Amilaza
Lipaza
Tripsin
Himotripsin
Elastaza-1

Kosti

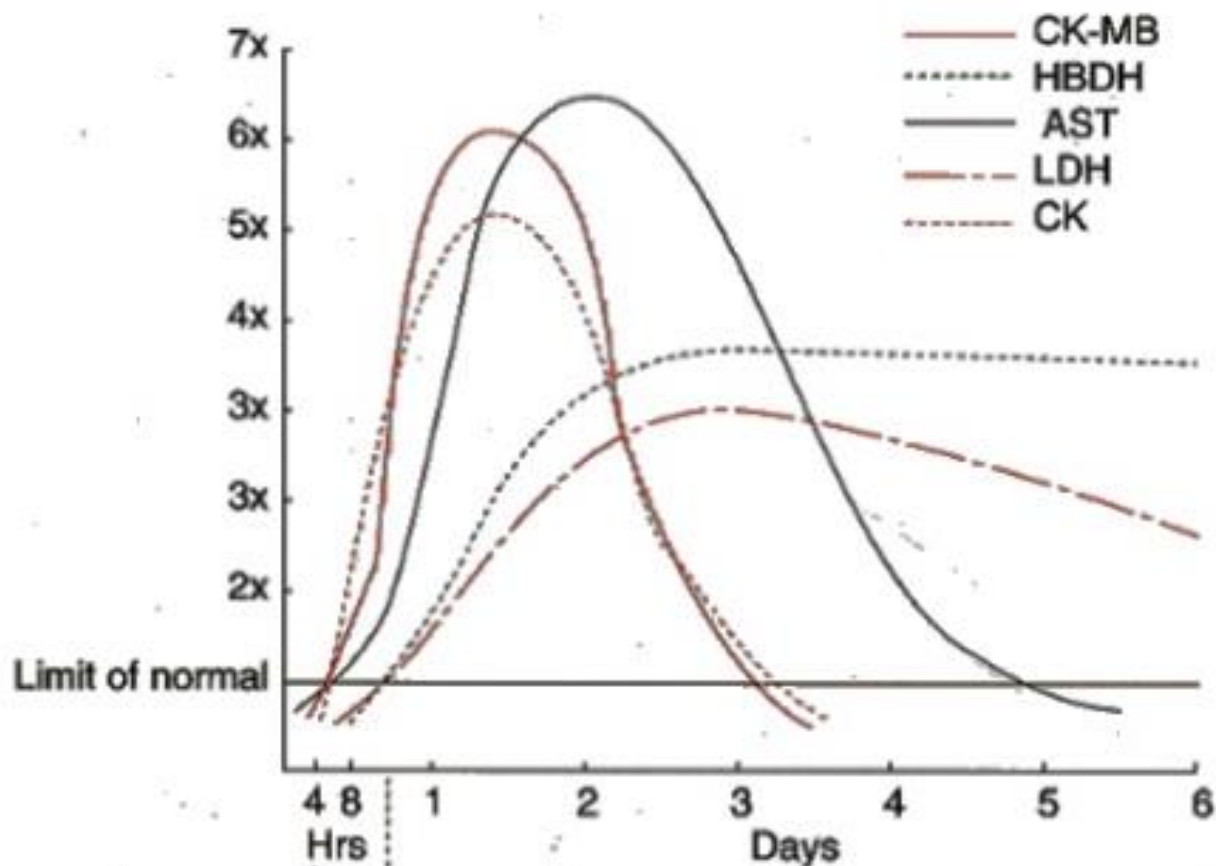
ALP
AcP

4. Praćenje enzimske aktivnosti u toku određenih vremenskih intervala

Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda

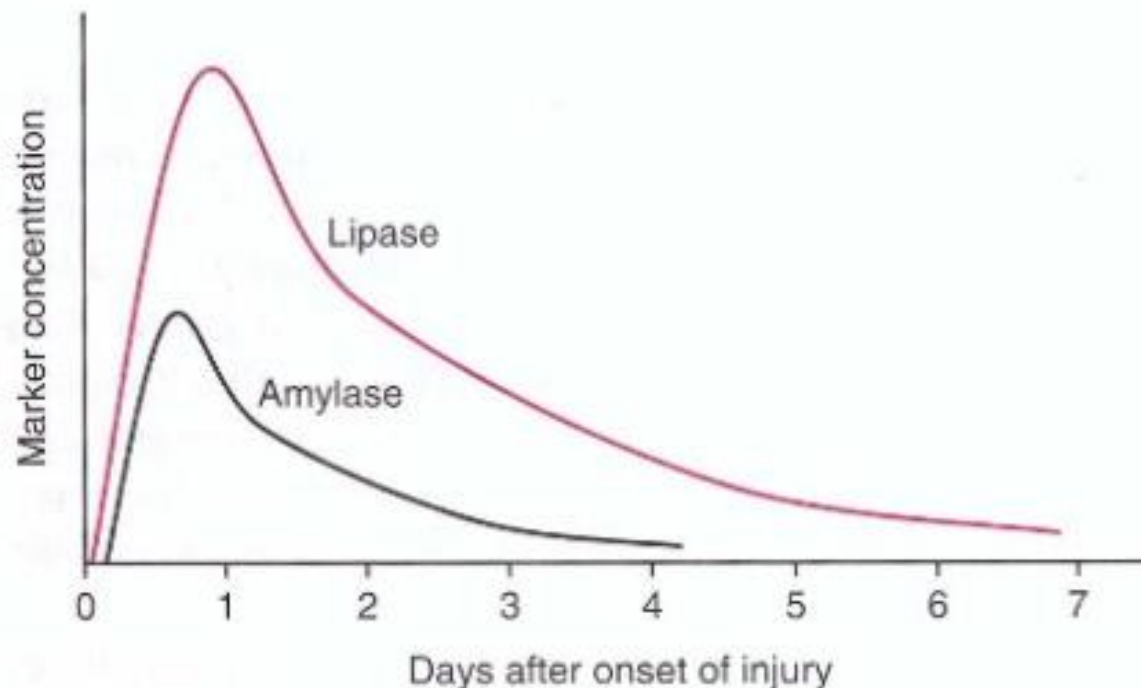
Dijagnostički prozor enzima

Rani i kasni markeri



4. Praćenje enzimske aktivnosti u toku određenih vremenskih intervala

Dinamika promena enzima u akutnom pankreatitisu



Dinamika promena lipaze i amilaze nakon akutnog pankreatitisa

1. Veće vrednosti lipaze 3x URL
2. Duže ostaju povišene vrednosti u serumu