

08.XII.2017.

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 reagensi) 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 enzimske 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



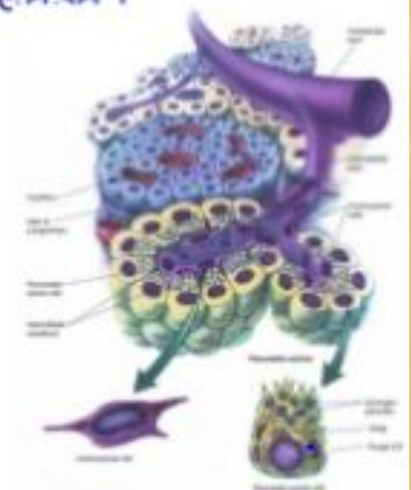
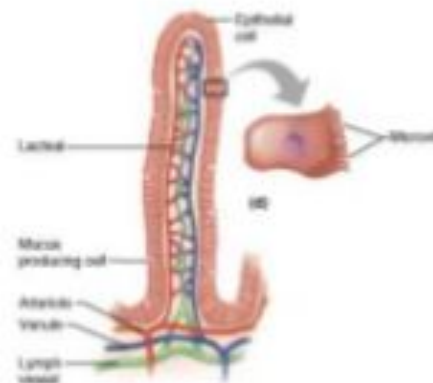
1. Sekretorni enzimi

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

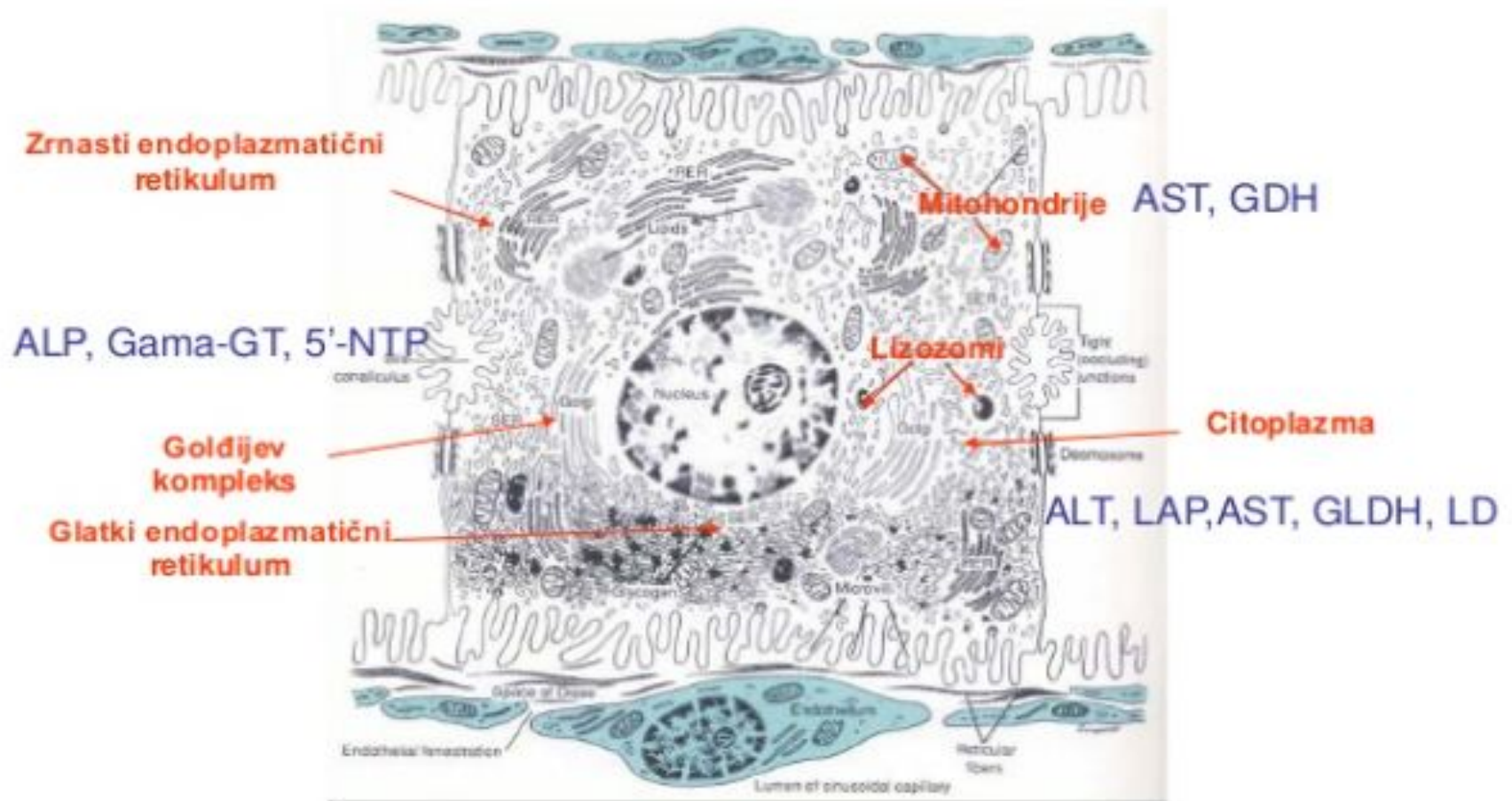
B. Ekskretorni enzimi

- 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

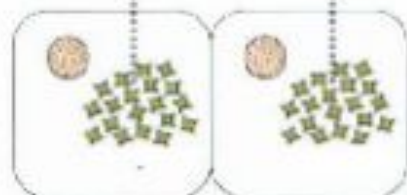
Povećanje aktivnosti enzima

- Povećana permeabilnost membrane
- Citozolni enzimi se oslobađaju
 - Anoksia
 - Poremećaj energetskeg metabolizma
- Čelijska 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



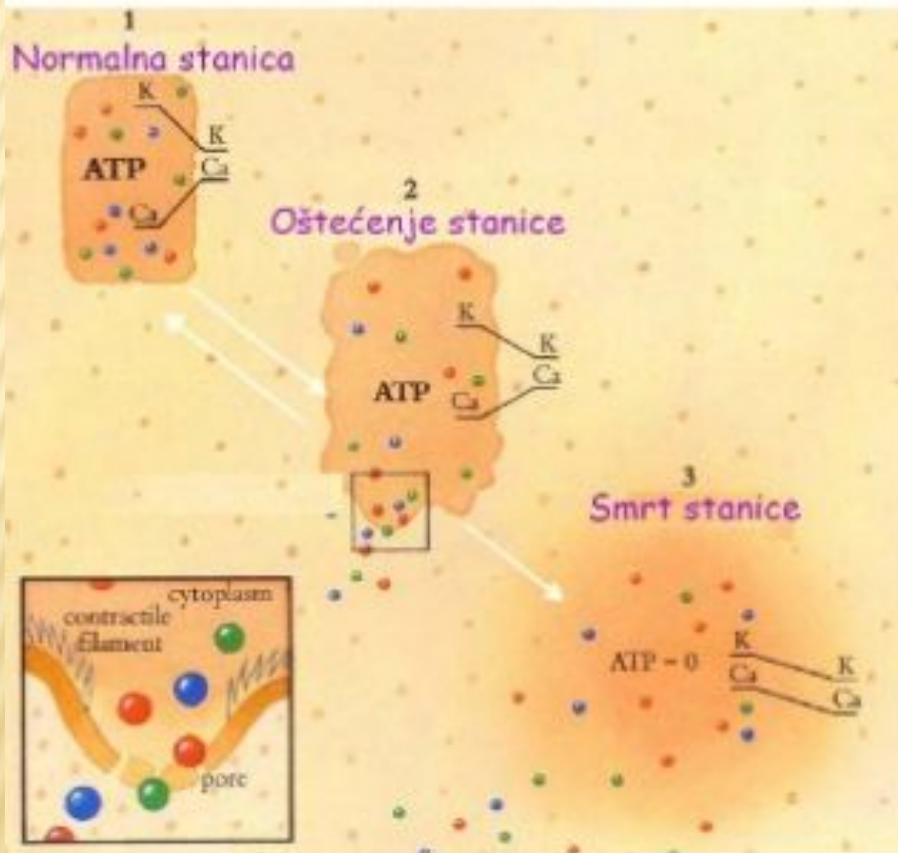
B

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:

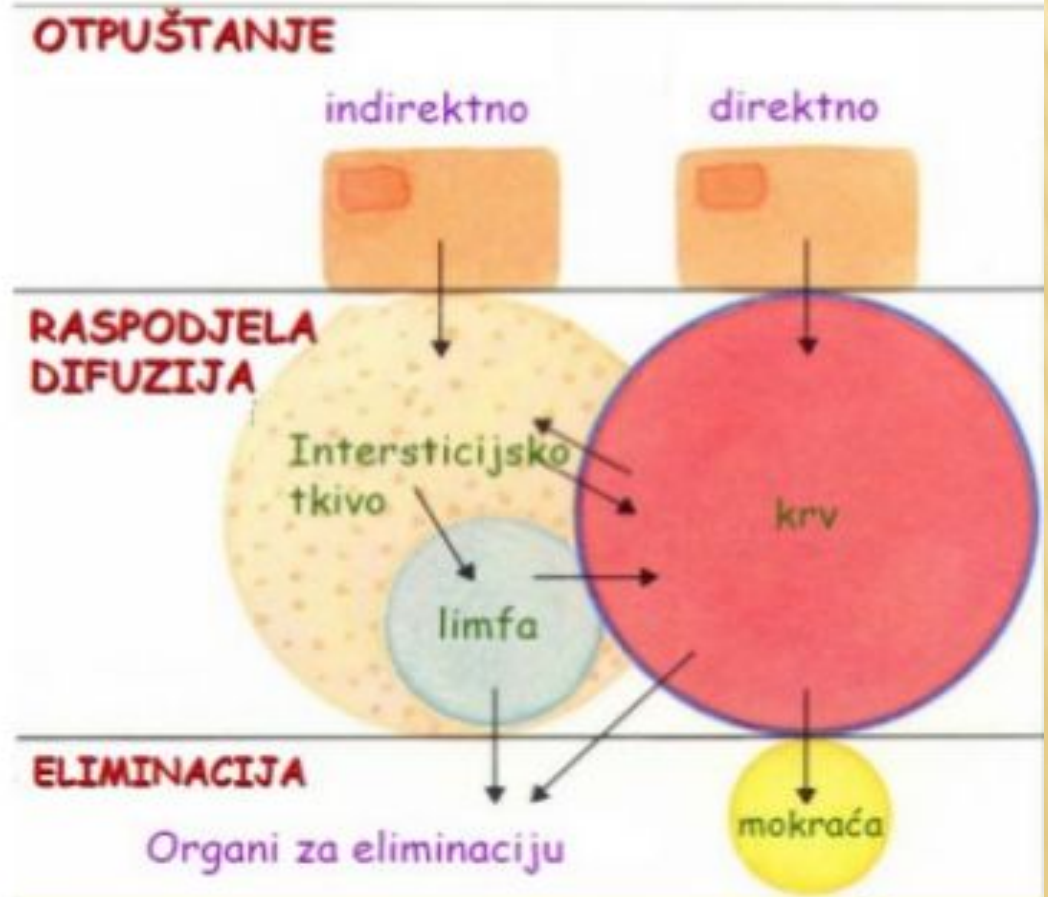
1. Urina (amilaza)

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

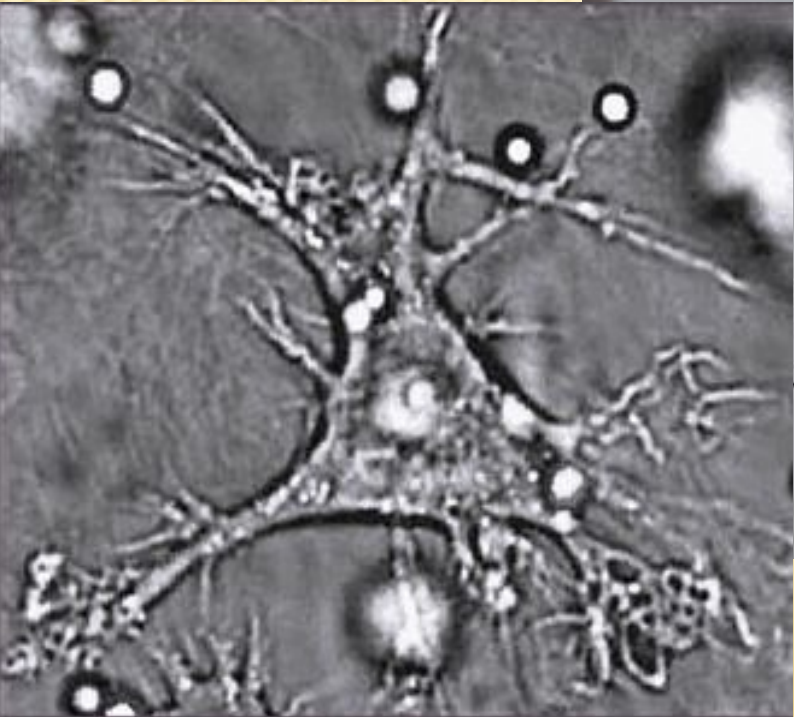
Enzimi kao terapijski agensi

- 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:

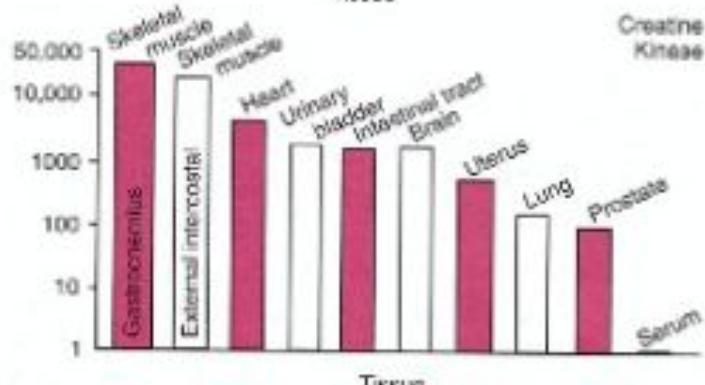
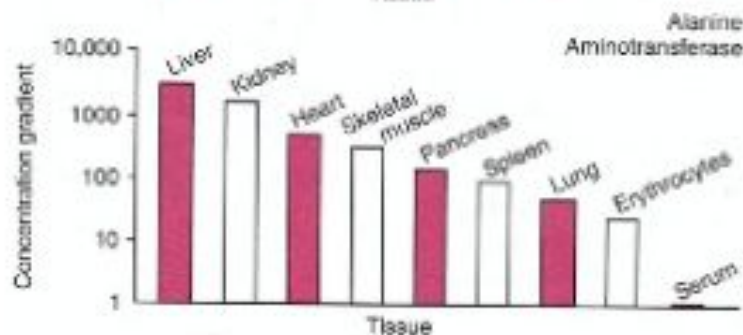
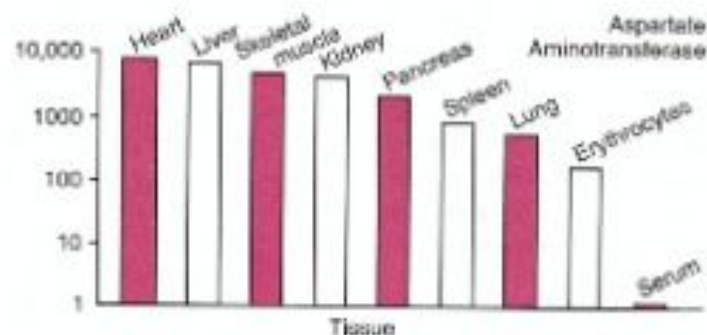
1. Određivanje organo specifičnih enzima
2. Određivanje izoenzimske raspodele u organima
3. Određivanje enzimskih profila u poremećajima funkcije određenog organa i izračunavanje određenih koeficijenata (odnosa)
4. Praćenje enzimske aktivnosti u toku određenih vremenskih intervala

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 gradienti 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

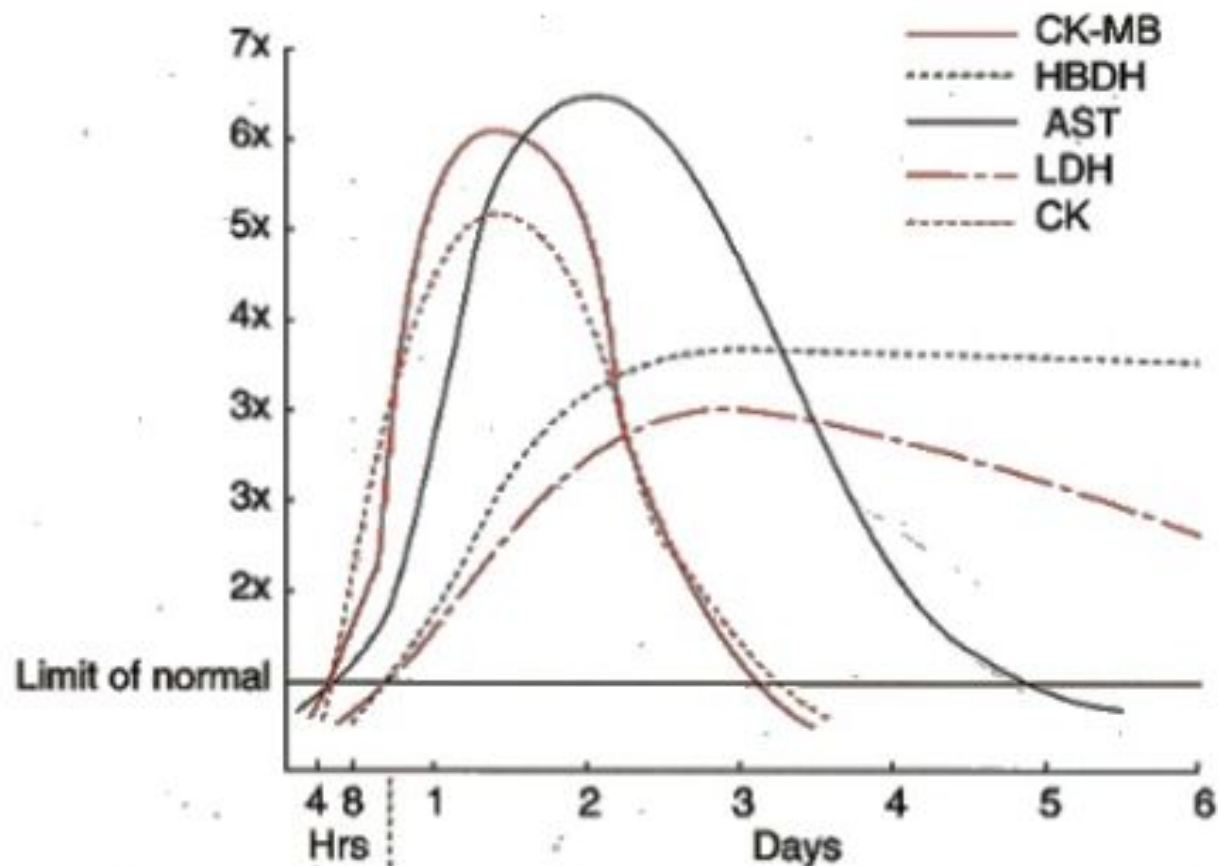
ALP
AcP

4. Praćenje enzimske aktivnosti u toku određenih vremenskih intervala

Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda

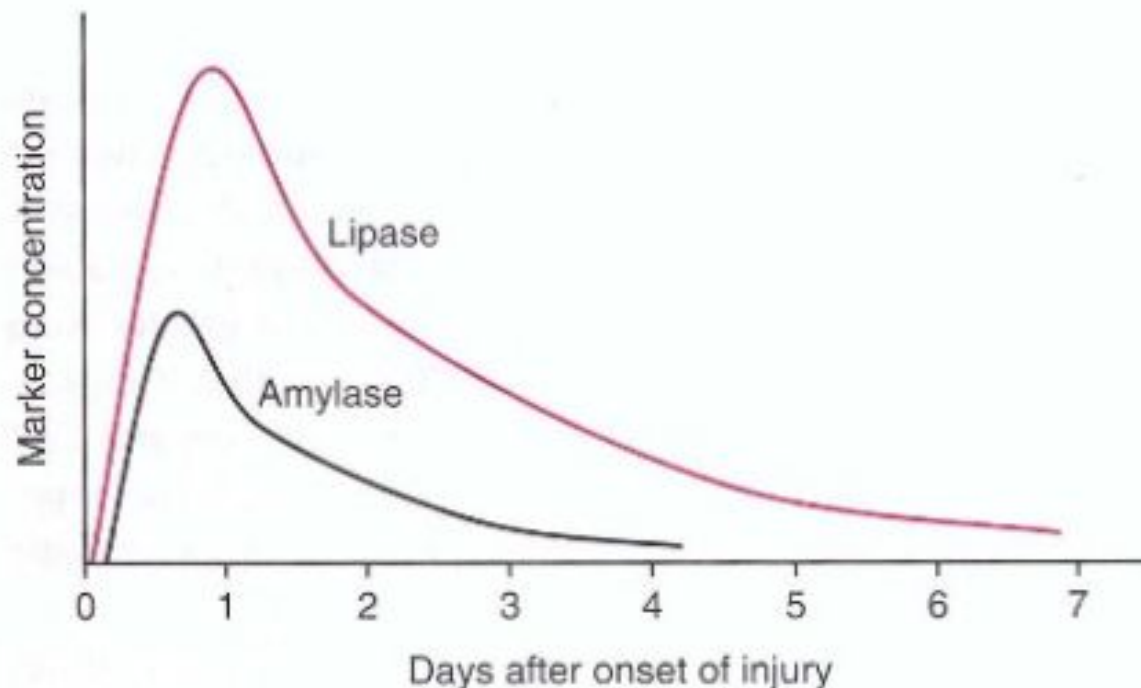
Dijagnostički prozor enzima

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