

BIOCHEMIA I BIOFIZYKA

dr hab. Grażyna Wilczek

WYKŁAD 3

20.11.2025

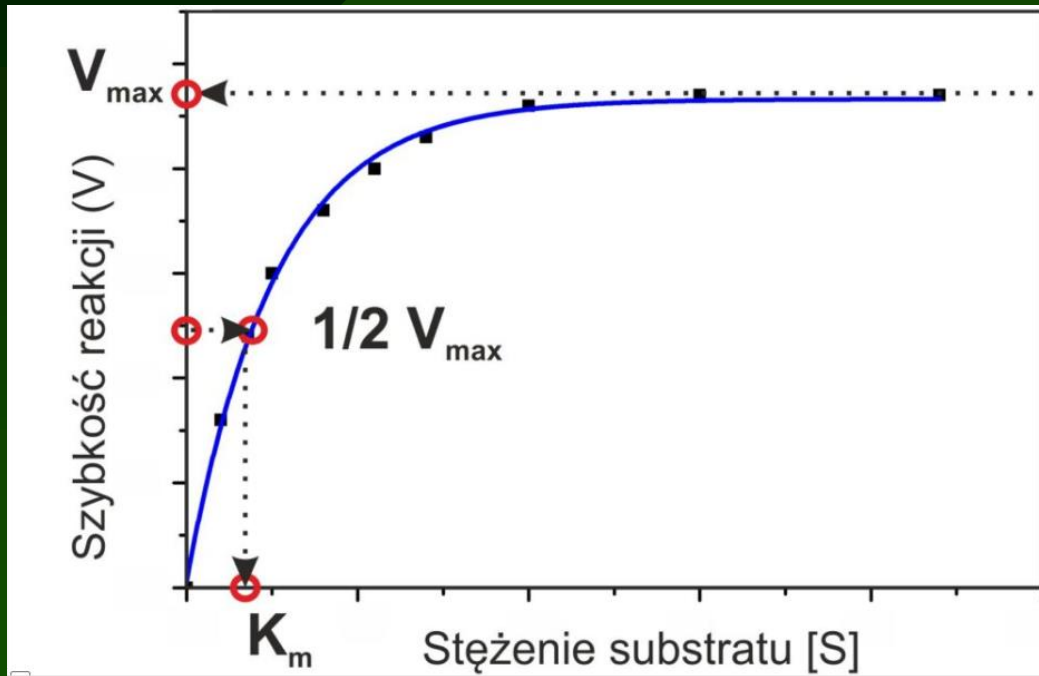
- Enzymy c.d.
- Enzymy w diagnostyce medycznej
- Charakterystyka biochemiczna
wybranych narządów

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA SZYBKOŚĆ REAKCJI ENZYMATYCZNEJ

Szybkość reakcji enzymatycznych zależy od:

- Stężenia substratu
- Stężenia enzymu
- Warunków, w jakich jest przeprowadzana reakcja (temperatura, pH, obecność aktywatorów, lub inhibitorów).

Szybkość katalizowanej przez enzym reakcji zależy nieliniowo od stężenia substratu i ma kształt hiperboli. Oznacza to, że w miarę zwiększania się stężenia substratu szybkość reakcji tylko początkowo gwałtownie rośnie po czym przyrost szybkości stopniowo zwalnia, aż osiąga wysycenie



Częstym zjawiskiem jest spowolnienie reakcji gdy powstaje dużo produktu. W ten sposób organizm zabezpiecza się przed akumulacją zbyt dużej ilości substancji chemicznych, które w wysokim stężeniu mogłyby wywrzeć toksyczny efekt na komórkę - **inhibicja produktowna**.

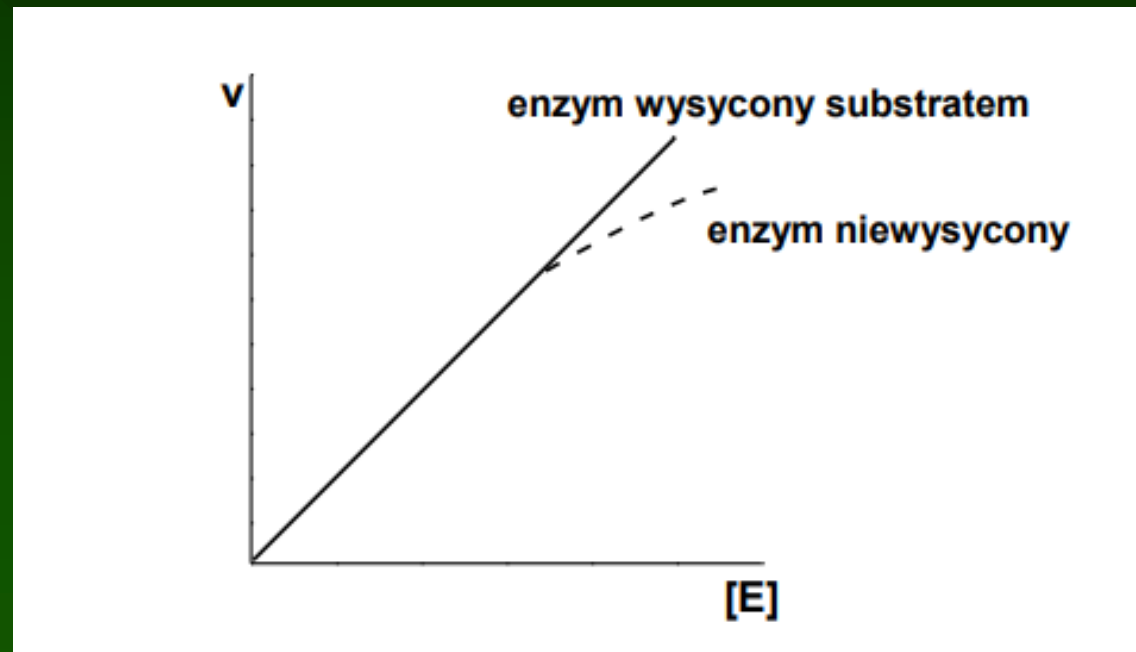


Wykres zależności szybkości reakcji enzymatycznej V od stężenia substratu $[S]$, gdzie:

$V_{\max}$ – **maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej, osiągnięta dla nieskończenie wysokiego stężenia substratu.**

K_m stała Michaelisa oznaczająca stężenie substratu, przy jakim szybkość reakcji katalizowanej przez enzym osiąga połowę $V_{\max}$.

Szybkość reakcji enzymatycznej rośnie wprost proporcjonalnie do **stężenia enzymu**, pod warunkiem że pomiar będzie prowadzony w warunkach wysycenia enzymu substratem i przy niezmiennych pozostałych parametrach reakcji (pH, temperatura).



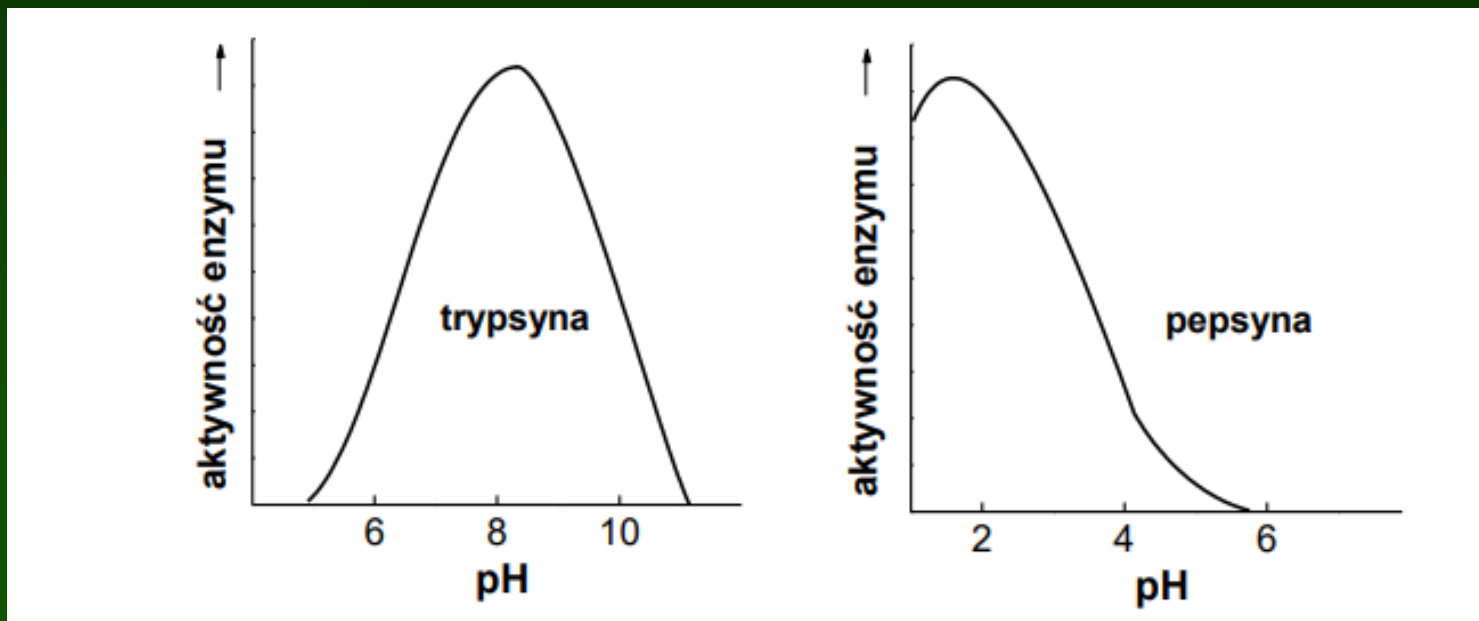
Wpływ **TEMPERATURY** na szybkość reakcji enzymatycznych

- nie jest prostą zależnością, gdyż pozostaje w ścisłym związku z białkową naturą enzymów.
- **szybkość reakcji enzymatycznej zwiększa się ze wzrostem temperatury, jednakże tylko w takim jej zakresie, w którym enzym jest stabilny i zachowuje pełną aktywność.**
- Szybkość reakcji enzymatycznych wzrasta przeciętnie dwukrotnie przy każdym wzroście temperatury o 10°C w zakresie temperatur nie powodujących denaturacji danego enzymu ($Q_{10} = 2$).

Większość enzymów wykazuje maksymalną aktywność w środowisku o określonym pH.

Optimum pH jest bardzo ważną wartością liczbową charakteryzującą enzym.

Enzymy jako białka posiadają grupy zdolne do jonizacji, stąd też zmiany aktywności enzymatycznej przy różnych pH mogą być wywołane zmianami w stopniu zjonizowania enzymu, kompleksu ES, a także samego substratu.

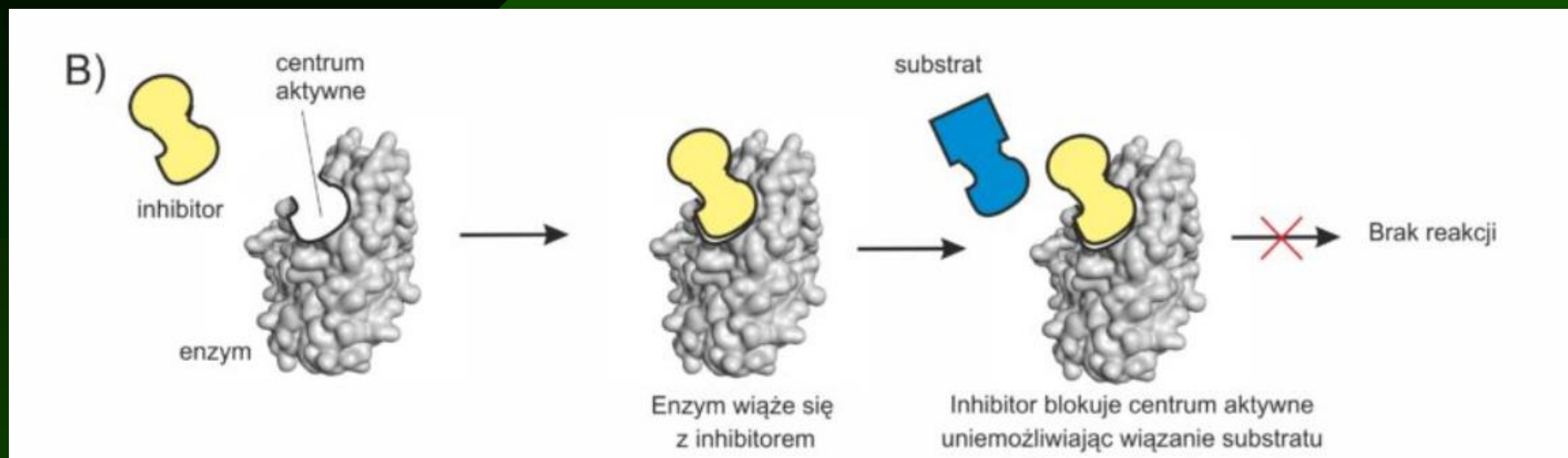


TYPY INHIBICJI ENZYMÓW:

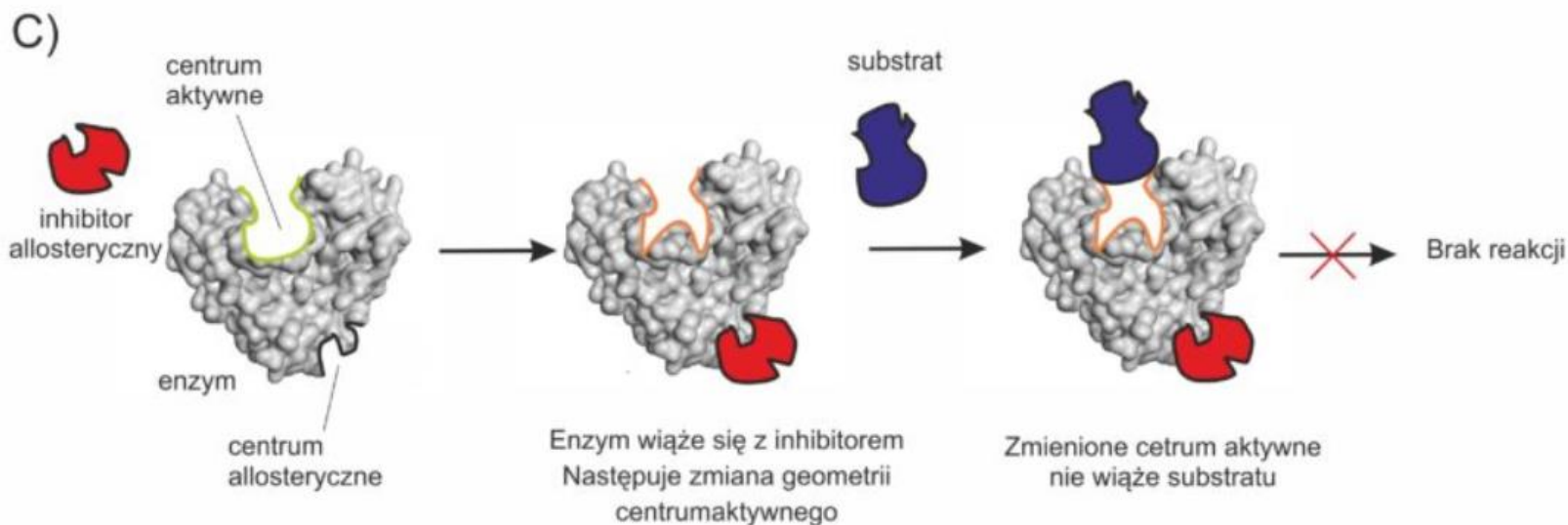
- odwracalny i nieodwracalny
- **Inhibitory nieodwracalne** wiążą się kowalencyjnie z enzymem (nie zawsze w obrębie centrum aktywnego), powodując trwałą utratę aktywności katalitycznej
- **Inhibitory odwracalne**. Zróżnicowana grupa cząsteczek zarówno pod względem budowy jak i kinetyki oddziaływania z enzymem.

Ich wspólną cechą jest możliwość dysocjacji kompleksu enzym–inhibitor. Można je podzielić na kilka podgrup m.in. inhibitory kompetycyjne i niekompetycyjne.

Inhibitor kompetycyjny wiąże się w centrum aktywnym uniemożliwiając związanie substratu i zajście reakcji



- **Inhibitory kompetycyjne** strukturalnie przypominają substrat i współzawodniczą z nim o miejsce aktywne enzymu.
- Związanie inhibitora z wolnym enzymem uniemożliwia związanie cząsteczki substratu i hamuje przebieg reakcji enzymatycznej.
- Wcześniejsze przyłączenie substratu do enzymu wyklucza możliwość związania inhibitora, tak więc wiązanie substratu i inhibitora konkurencyjnego nawzajem się wykluczają.
- Obniżenie efektu inhibicji kompetycyjnej można uzyskać zwiększając stężenie substratu



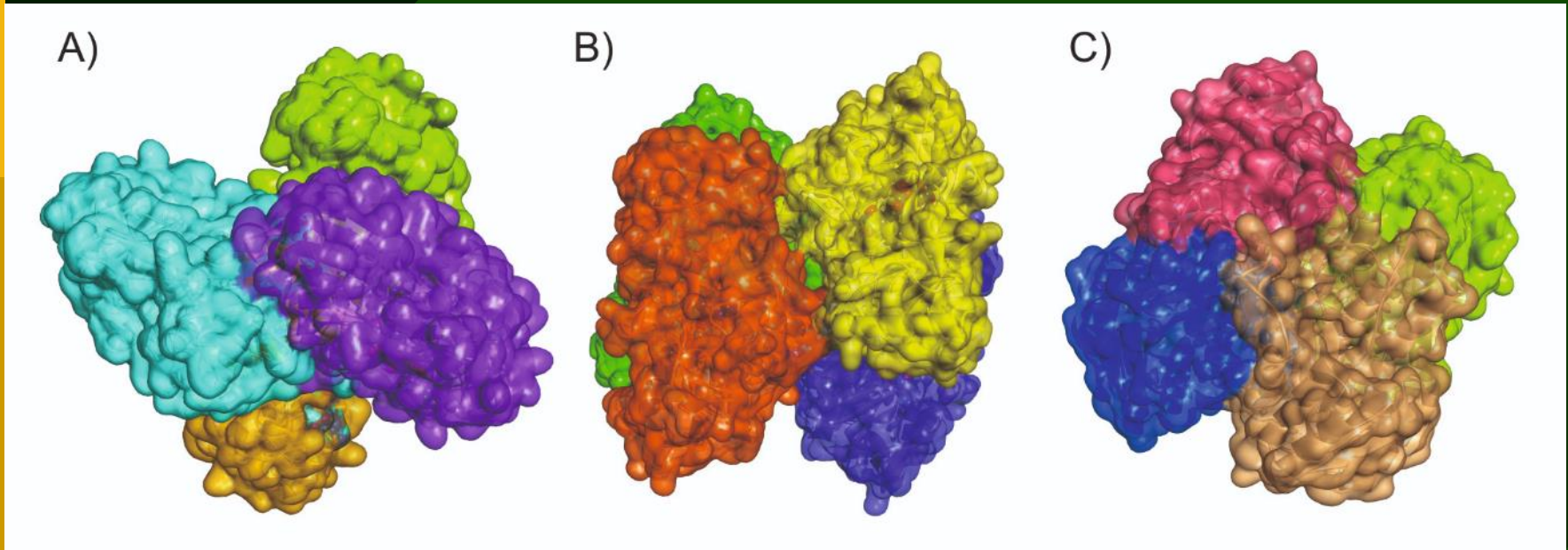
Związanie się z enzymem czynnika allosterycznego wpływa na zmianę struktury enzymu, co pośrednio oddziałuje na geometrię centrum aktywnego. W rezultacie enzym nie wiąże skutecznie substratu i reakcja nie zachodzi.

Inhibitory niekompetycyjne przyłączają się w cząsteczce enzymu do innego miejsca niż centrum aktywne, dlatego **mogą wiązać się z enzymem w sposób niezależny od substratu**. Inhibitor może przyłączyć się do wolnego enzymu lub do kompleksu ES. Powstający ostatecznie kompleks enzym–substrat–inhibitor (ESI) jest nieaktywny katalitycznie, ponieważ związanie inhibitora uniemożliwia uzyskanie przez centrum aktywne enzymu odpowiedniej konformacji.

Aktywatory enzymów

- to różnego rodzaju substancje zwiększające ich aktywność, lecz nie biorące bezpośrednio udziału w reakcji katalizy.
- **Są to jony niektórych metali wbudowane w część białkową enzymu lub też związki drobnocząsteczkowe usuwające wpływ związków hamujących.**
- **Enzymy są najczęściej aktywowane przez kationy:** Mg^{2+} (fosfatazy, fosforylasy, syntetazy), Zn^{2+} (dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza alkoholowa, proteazy), Mn^{2+} (peptydazy, arginaza), Ca^{2+} (lipaza, kalpainy), Cu^{2+} (oksydazy).
- Aniony najczęściej nie są czynnikami wpływającymi na aktywność enzymów. Wyjątek stanowią jony Cl^{-} , będące aktywatorami amylazy ze śliny.
- Często rolę swoistych aktywatorów enzymów pełnią tzw. pierwiastki śladowe, będące niezbędnymi składnikami pokarmowymi.

Enzym składa się z kilku jednakowych pod względem składu aminokwasowego podjednostek białkowych, z których każda zawiera centrum aktywne (enzymy o budowie multimerycznej (jeżeli składa się z czterech identycznych podjednostek, jest homotetramerem)



Kooperacja – tzn. związanie w jednej z podjednostek substratu powoduje zmianę geometrii białka.

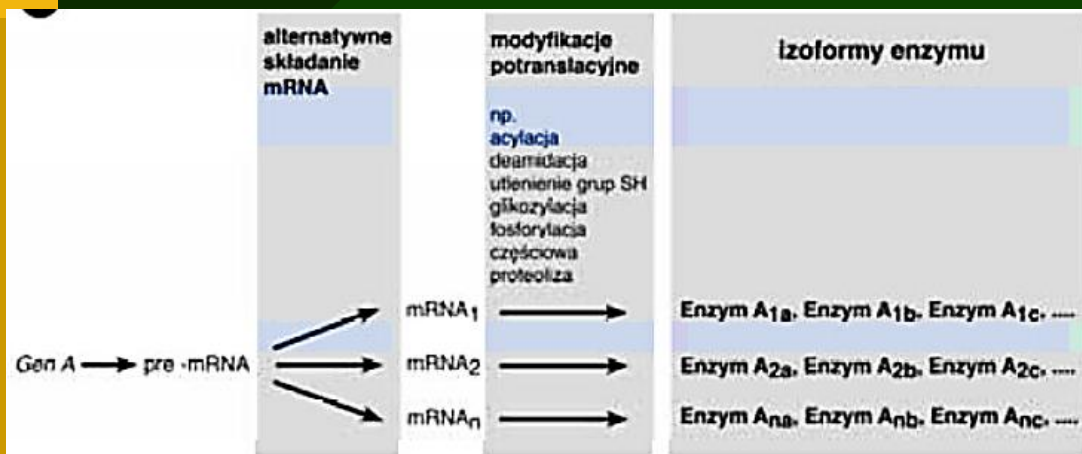
W rezultacie ich zdolność do wiązania cząsteczek substratu w centrach aktywnych może wzrosnąć (dodatni efekt kooperatywny) lub zmaleć (ujemny efekt kooperatywny) .

Enzymy są cząsteczkami labilnymi, dlatego mogą łatwo tracić swą katalityczną aktywność.

IZOFORMY I IZOENZYMY

IZOFORMY

Enzymy, podobnie jak inne białka podlegają wielu potranslacyjnym przemianom, które często są charakterystyczne dla danego rodzaju komórki. Prowadzi to do powstania **różnorodnych wariantów tego samego enzymu nazywanych izoformami**.



- produkty tego samego genu
- katalizują tę samą reakcję chemiczną
- inna budowa cząsteczki enzymu na skutek: zmian posttranslacyjnych struktury białka np. fosfataza alkaliczna (ALP) – izoformy kostna i wątrobowa

Szutowicz i Raszeja-Specht, Diagnostyka laboratoryjna, Tom I, GUM, 2009

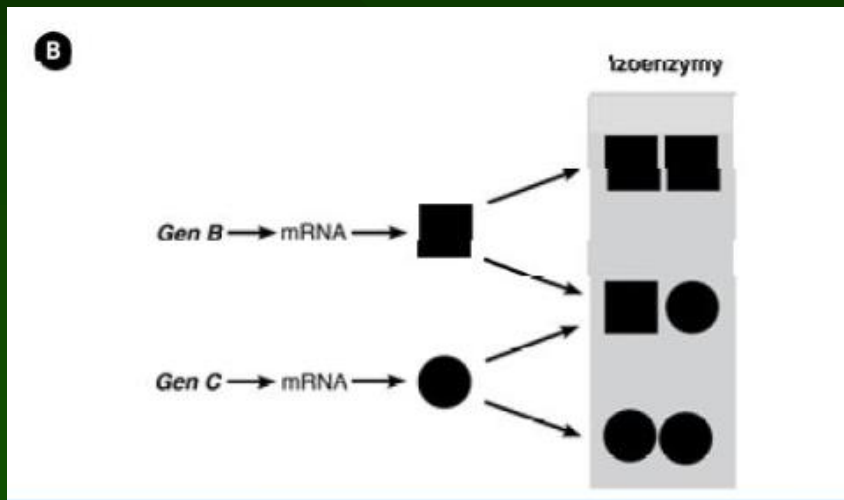
Izoformy czasami różnią się między sobą specyficznością substratową, właściwościami regulacyjnymi lub opornością na utratę aktywności.

Wspólną cechą wszystkich izoform jest to, że **są odmianami tego samego białka enzymatycznego kodowanego przez jeden gen regulatorowy**.

IZOENZYMY

Formy enzymu różniące się między sobą strukturą pierwszorzędową.

Białka te są produktami różnych genów i noszą nazwę **izoenzymów**.



- mogą różnić się strukturą cząsteczki
- produkty różnych, choć blisko spokrewnionych genów
- różne właściwości fizyczne i chemiczne: punkt izoelektryczny, powinowactwo do substratów, wrażliwość na czynniki regulatorowe itp.
- dotyczy dehydrogenaz, oksydaz, aminotransferaz, fosfataz i proteaz.

Cechą wspólną izoenzymów jest to, że katalizują tę samą reakcję chemiczną, pomimo nieraz znaczących różnic w budowie i właściwościach

Podział enzymów oparty na sposobie przedostawania się do przestrzeni pozakomórkowej

1. Enzymy komórkowe (wskaźnikowe) uwalniane w wyniku uszkodzenia błony komórkowej lub rozpadu komórki

- mikrosomalne – GGT
- lizosomalne – ACP
- mitochondrialne – AST, CK, GLDH
- cytoplazmatyczne – ALT, LDH, AST, CK
- błony plazmatyczne – ALP, 5'NT, GGT

2. Enzymy sekrecyjne wydzielane do krążenia, gdzie spełniają swoją funkcję

- czynniki krzepnięcia i fibrynolizy
- acylotransferaza lecytyna:cholesterol (LCAT)
- cholinesteraza ChE (pseudocholinesteraza)
- ceruloplazmina
- lipaza lipoproteinowa

3. Enzymy ekskrecyjne produkowane przez gruczoły i wydzielane do śliny, światła przewodu pokarmowego, płynu nasiennego itp.

- soku trzustkowego (amylaza, lipaza, RNaza, DNaza)
- fosfataza kwaśna sterczowa (PAP)

Przy niewielkich uszkodzeniach komórki (które często są odwracalne) dochodzi przede wszystkim do wypływu enzymów zlokalizowanych w cytoplazmie. Znaczący wzrost wypływu enzymów mitochondrialnych obserwuje się dopiero w ciężkich i nieodwracalnych uszkodzeniach komórki.

Enzymy najczęściej stosowane w diagnostyce medycznej

Numer EC	Nazwa systemowa	Nazwa zwyczajowa	Symbol
1.1.1.27	L-mleczan:NAD ⁺ oksydoreduktaza	dehydrogenaza mleczanowa	LD, LDH
2.6.1.1	L-asparaginian:2-oksoglutaran aminotransferaza	aminotransferaza asparaginianowa, transaminaza asparagininowa	AST, AspAT, SGOT
2.6.1.2	L-alanina:2-oksoglutaran aminotransferaza	aminotransferaza alaninowa, transaminaza alaninowa	ALT, AlAT, SGPT
2.7.3.2	ATP:kreatyna N-fosfotransferaza	kinaza kreatynowa	CK
1.4.1.3	L-glutaminian:NAD(P ⁺) oksydoreduktaza	dehydrogenaza glutaminianowa	GLDH
2.3.2.2	(5-glutamyl)-peptyd:aminokwas 5-glutamylotransferaza	γ -glutamylotransferaza, γ -glutamylotranspeptydaza	GGT, GGTP
3.1.1.8	acylohydrolaza acylocholinowa	cholinesteraza, pseudocholinesteraza, esteraza cholinowa II, cholinesteraza osoczowa	ChE, SChe
3.1.3.1	fosfohydrolaza monoestru-ortofosforowego (z optimum alkalicznym)	alkaliczna fosfataza	ALP
3.1.3.2	fosfohydrolaza monoestru-ortofosforowego (z optimum kwaśnym)	kwaśna fosfataza	ACP
3.1.3.5	fosfohydrolaza 5'-rybonukleotydu	5'-nukleotydaza	5'-NT, NTP
3.2.1.1	glikanohydrolaza 1,4- α -D-glikanu	amylaza, α -amylaza	AMY

Enzym	Główne źródła enzymu we krwi	Zastosowanie kliniczne
Aminotransferaza alaninowa	Wątroba	<u>Choroby</u> mięśniowe wątroby
Aminotransferaza <u>asparagininowa</u>	Wątroba, mięśnie szkieletowe, serce, <u>erytrocyty</u>	Choroby mięśniowe wątroby, choroby mięśni
Fosfataza alkaliczna	Wątroba, kości, błona śluzowa jelit, łożysko	Choroby kości, choroby dróg żółciowych
Amylaza	Trzustka, ślinianki	Choroby trzustki
<u>Cholinesteraza</u>	Wątroba	Zatrucie związkami fosforoorganicznymi, nadwrażliwość na <u>sukrametionium</u> , choroby mięśniowe wątroby
Kinaza <u>kreatynowa</u>	Mięśnie szkieletowe, serce	Choroby mięśni (zawał serca)
<u>γ-glutamylotransferaza</u>	Wątroba	Choroby dróg żółciowych, marker nadużycia alkoholu
Dehydrogenaza mleczanowa	Serce, wątroba, mięśnie szkieletowe, erytrocyty, płytki, węzły chłonne	Hemoliza, choroby mięśni wątrobowego, marker nowotworowy
Lipaza	Trzustka	Choroby trzustki
5'-Nukleotydaza	Wątroba	Choroby dróg żółciowych

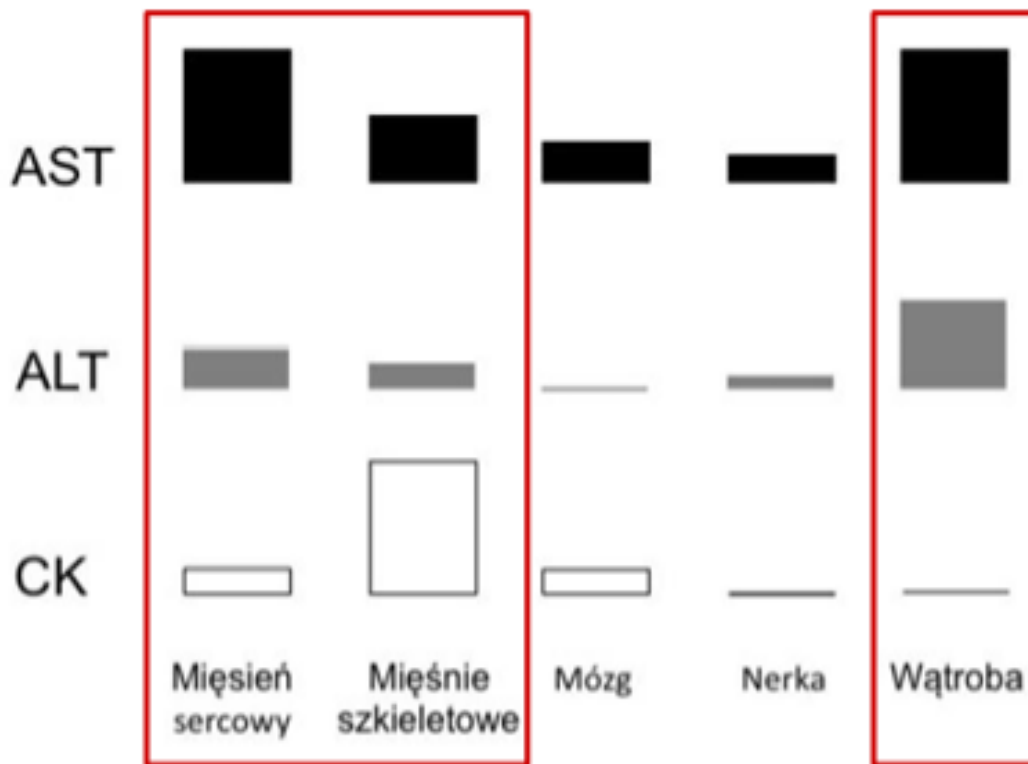
Enzymy syntetyzowane są w komórkach i tam pełnią swoje funkcje. Tylko nieliczne wydzielane są na zewnątrz do przestrzeni pozakomórkowych.

- **Pojawienie się enzymów wewnątrzkomórkowych w płynie pozakomórkowym może świadczyć o stopniu uszkodzenia komórek danej tkanki.**

Enzymy w diagnostyce laboratoryjnej

- Każda tkanka posiada swój specyficzny profil enzymatyczny. Zmiany poziomu określonych enzymów w stanach chorobowych pozwalają wnioskować o lokalizacji i rodzaju zmian patologicznych zachodzących w organizmie.
 - ☐ w tkankach
 - ☐ w płynach ustrojowych - osocze lub surowica - płyn mózgowo-rdzeniowy - mocz
 - ☐ w płynach patologicznych - wysięki (płyn powstający w przebiegu zapaleń) — przesieki (płyn przedostający się poza układ naczyń przy prawidłowej budowie ich ściany)

**Przykład dystrybucji tkankowej
aminotransferazy asparaginianowej (AST),
aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz
kinazy kreatynowej (CK)**



Porównanie wzajemnego stosunku aktywności dwóch lub więcej enzymów, jeżeli stosunek ten w danym narządzie jest dla niego charakterystyczny.

Tkanka posiada swój specyficzny profil enzymatyczny

Zakresy referencyjne – aktywność w surowicy:

AST : - mężczyźni do 35 U/L

- kobiety do 31 U/L

ALT: - mężczyźni do 45 U/L

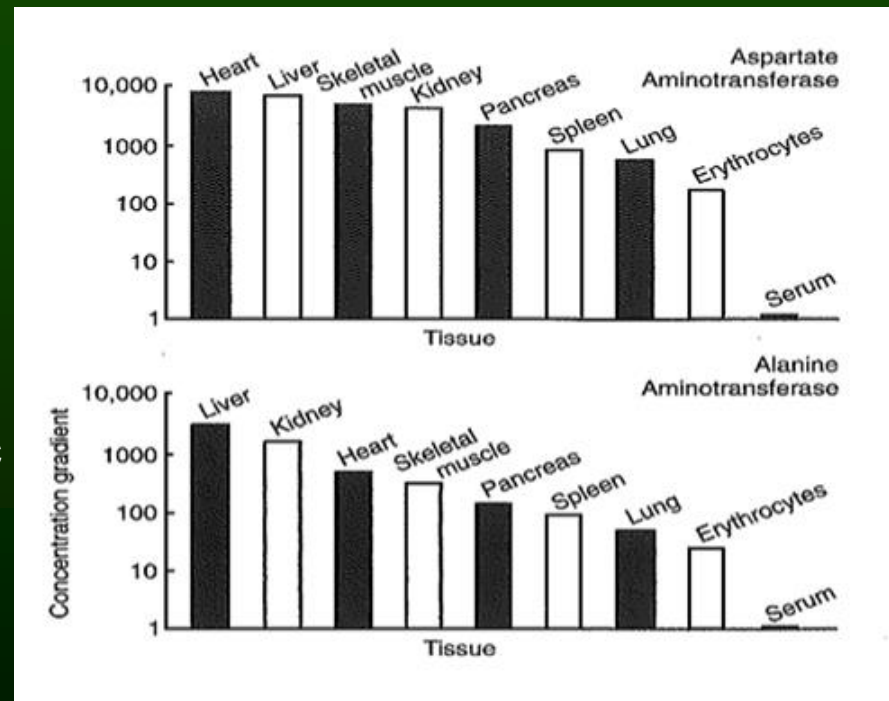
- kobiety do 34 U/L

Wzrost aktywności:

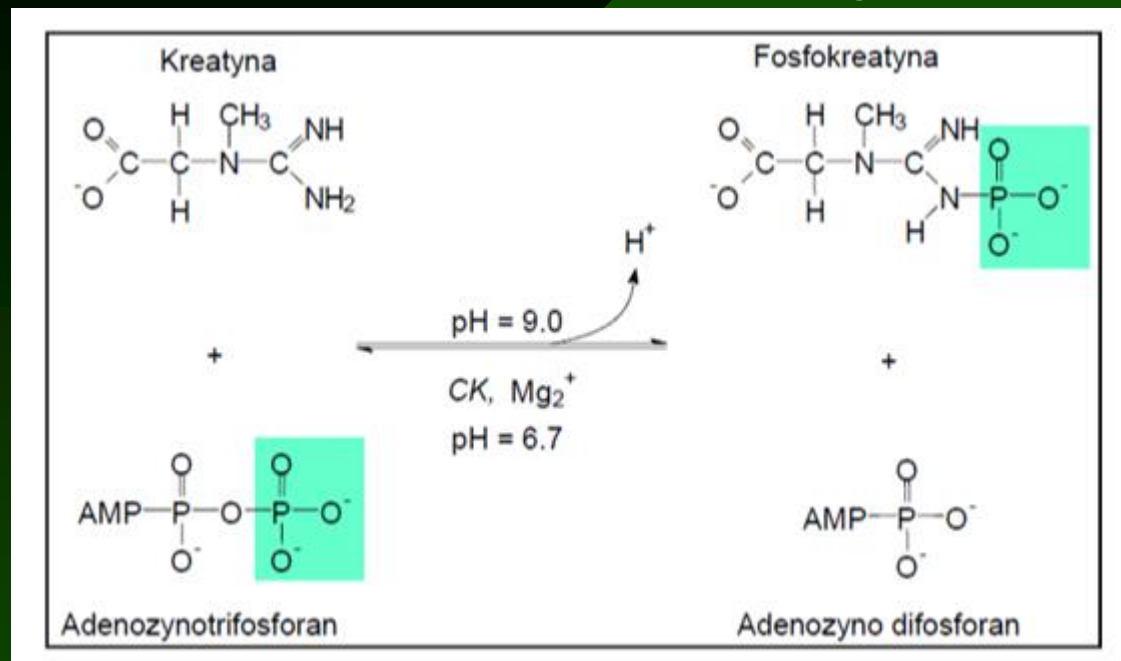
❖ choroby wątroby:

- wirusowe zapalenie wątroby
- alkoholowe zapalenie wątroby
- toksyczne zapalenie wątroby - marskość wątroby
- przerzuty do wątroby
- inne

- ❖ zawał mięśnia sercowego
- ❖ dystrofie mięśniowe
- ❖ inne choroby mięśniowe (także pochodzenia neurogennego)
- ❖ niedokrwistość hemolityczna



Kinaza kreatynowa (CK)



Aktywność CK w surowicy zależy od:

- płci
- wieku
- masy mięśniowej
- aktywności fizycznej
- rasy

Katalizuje odwracalną reakcję fosforylacji kreatyny przez ATP

aktywność w tkankach

- największa: mm. szkieletowe (2500 U/g białka) i serce (550 U/g białka)
- wątroba i erytrocyty – praktycznie brak aktywności
- dimer; 82 kDa (2 x 41 kDa) - podjednostka B (loci w 14 chromosomie)
- podjednostka M (loci w 19 chromosomie)

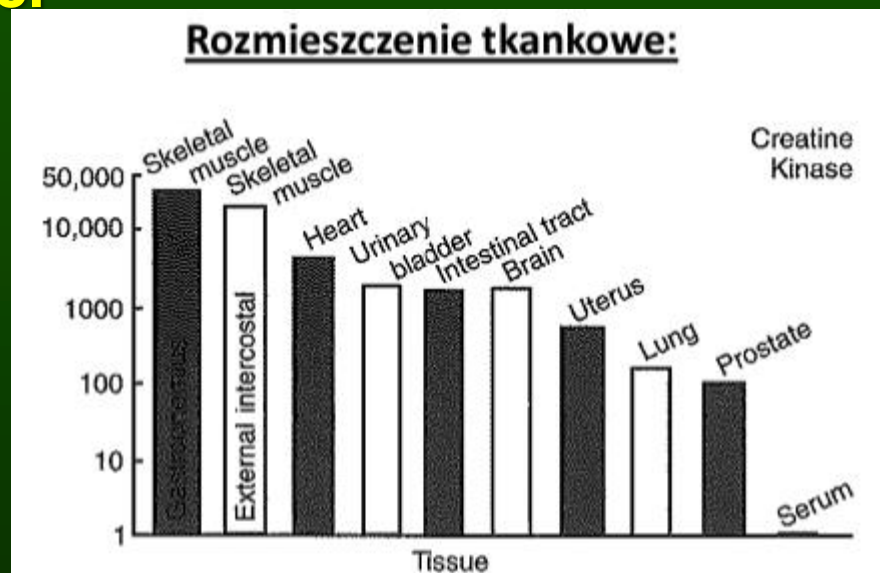
Zakres referencyjny aktywności

CK (rasa kaukaska):

- mężczyźni 46 – 171 U/L
- kobiety 34 – 145 U/L

Duży wzrost aktywności:

- wszystkie typy dystrofii mięśniowej
- zespoły zmiażdżenia
- zapalenie mięśni
- rabdomioliza (rozpad mięśni)
- choroby mięśni pochodzenia neurogennego:
 - myasthenia gravis (nużliwość mięśniowa)
 - stwardnienie rozsiane
 - poliomyelitis (choroba Heinego-Medina)
 - parkinsonizm
 - zawał mięśnia sercowego



Cytoplazmatyczne izoenzymy CK i ich zawartość w surowicy ludzi zdrowych:

CK-1 (CK-BB; w mózgu) – nie występuje (nie przenika przez BBB)

CK-2 (CK-MB; serce) – ok. 5%

CK-3 (CK-MM; mięśnie szkieletowe) – ok. 95%

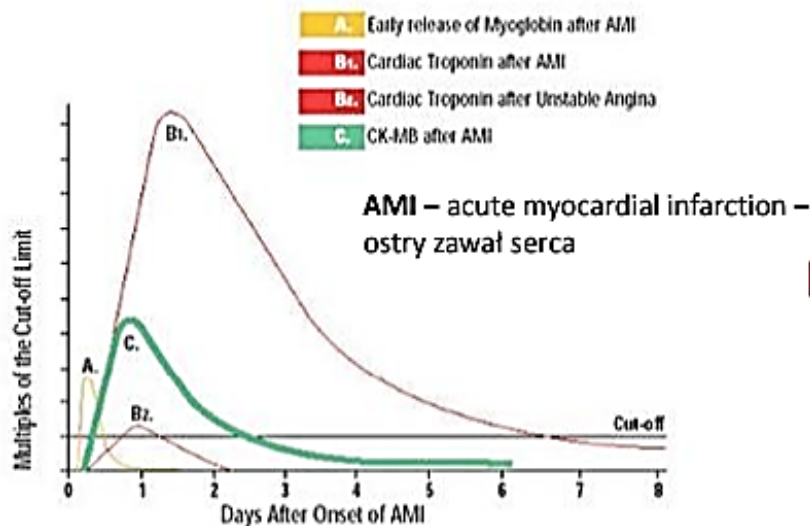
CK-MB w zawale serca (wzrost do 20-30% całkowitej aktywności CK) - wzrost po 3-6 godzinach od wystąpienia zawału - maksimum po 12-24 godzinach

CK-MBmass (stężenie) – wprowadzona jako próba udoskonalenia pomiarów aktywności CK-MB

Dynamika wzrostu stężenia CK-MB w zawałe jest wyższa od dynamiki wzrostu aktywności tego enzymu.

≥ 10 mg/L potwierdza zawał serca (8-10-krotny wzrost ponad poziom referencyjny)

- ma znaczenie prognostyczne dla wystąpienia zawału u osób z dusznicą bolesną
- jest wskaźnikiem reperfuzji w przebiegu leczenia zawału:



Okienka diagnostyczne markerów kardiologicznych dla zawału:

Mioglobina: 2 do 12 godzin;

CK-MB stężenie: 3 do 48 godzin;

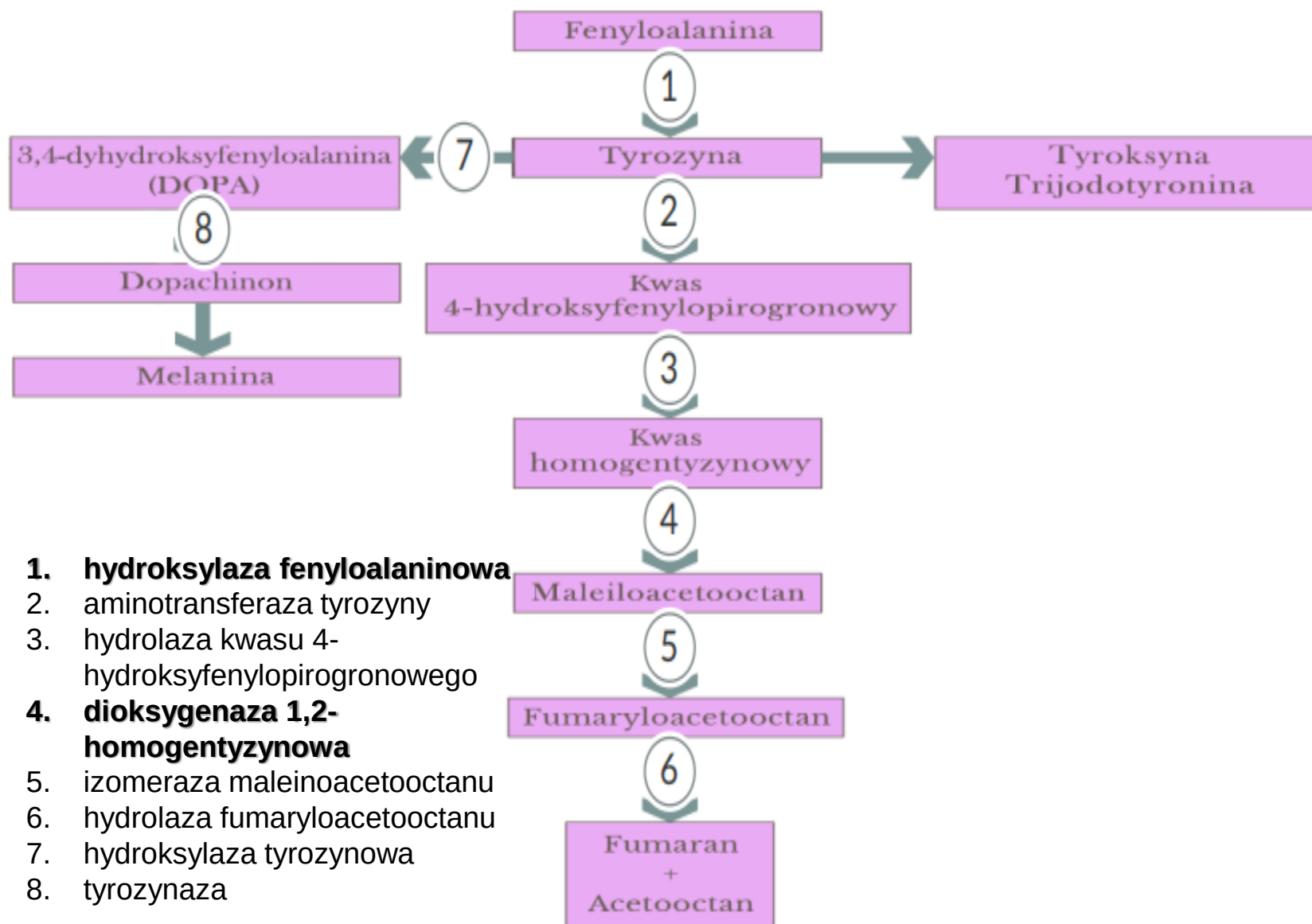
Troponina I: 4 godz. do 4 dni;

Troponina T: 4 godz. do 5 dni

Wrodzone zaburzenia przemian aminokwasów

Dotychczas opisano ok. 70 rodzajów defektów przemian aminokwasów określanych mianem aminoacidopatii.

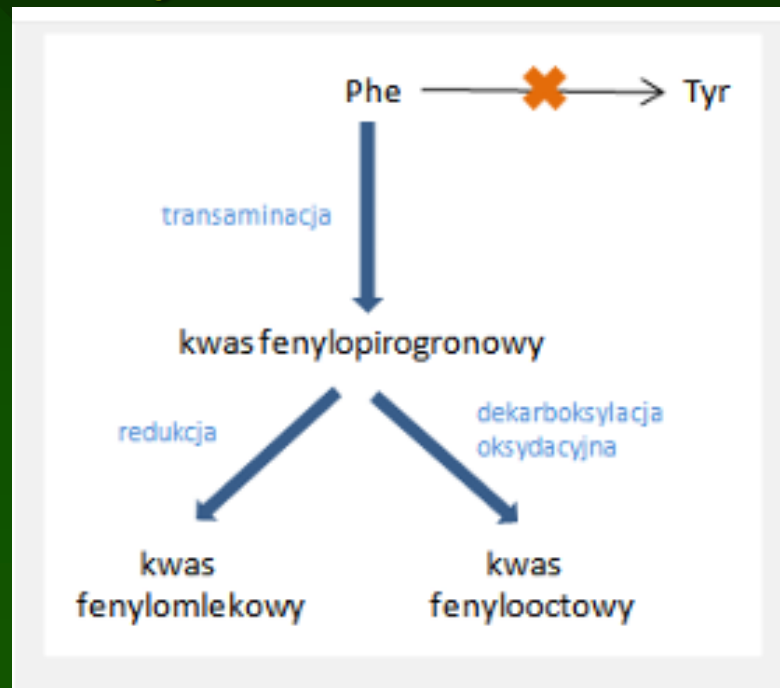
Przyczyna: zmiany genetyczne dziedziczone w sposób autosomalny recesywny.



BLOKI METABOLICZNE

Fenylketonuria - Częstotliwość ok. 1:10000. Brak lub niedostateczna aktywność **hydroksylazy fenyloalaniny**-enzymu produkowanego w wątrobie i odpowiedzialnego za hydroksylację fenyloalaniny do tyrozyny.

W badaniach laboratoryjnych obserwowany jest wzrost stężenia fenyloalaniny w osoczu.

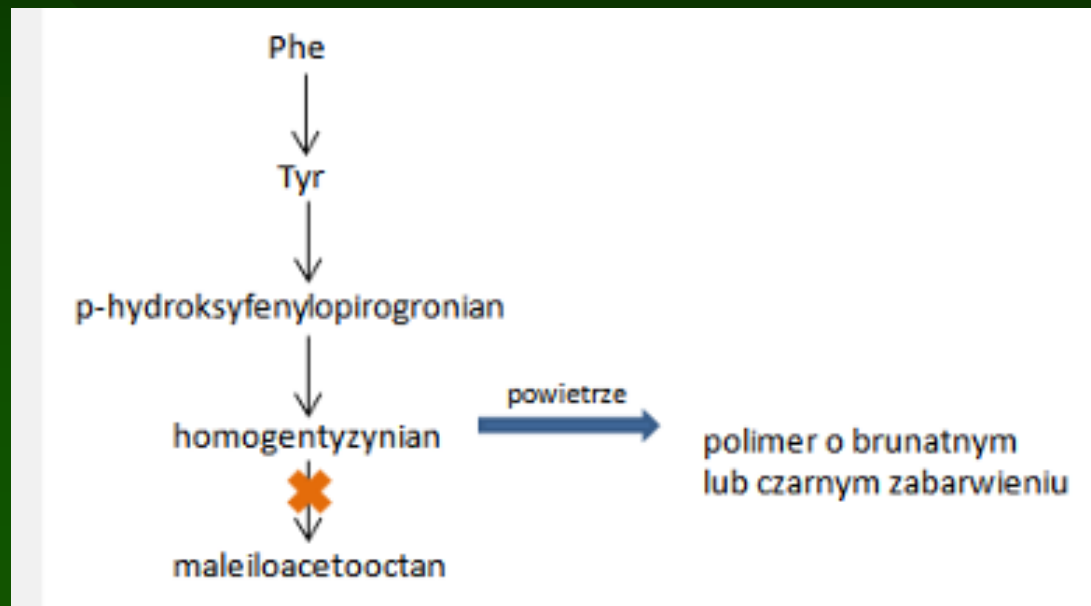


ALKAPTONURIA

Nieprawidłowa synteza dioksygenazy 1,2-homogentyzynowej.

Brak lub niedobór tego enzymu prowadzi do wydalania z moczem dużej ilości kwasu homogentyzynowego (HGA). Powoduje to ciemnienie moczu w kontakcie z powietrzem.

Produkty utleniania HGA odkładane są w tkance łącznej, co przyczynia się **do zwyrodnienia stawów i nieprawidłowej pigmentacji skóry.**



ALBINIZM

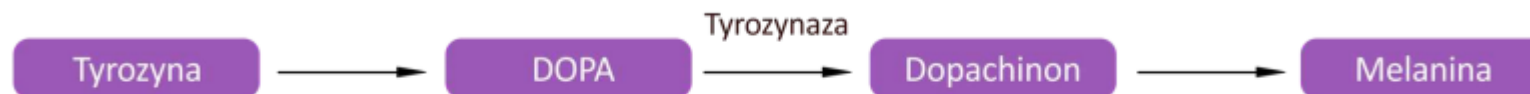
MUTACJA w genie TYR, który koduje **tyrozynazę**.

Przekształca 3,4-dihydroksyfenyloalaninę (DOPA) w dopachinon, czyli związek pośredni w biosyntezie melaniny (barwnika skóry).

Niedobór lub brak tyrozynazy brak syntezy barwników melaninowych: eumelaniny i feomelaniny.

Mało barwników w skórze, włosach i tęczówkach oczu

Prawidłowy szlak:



Błędny szlak:

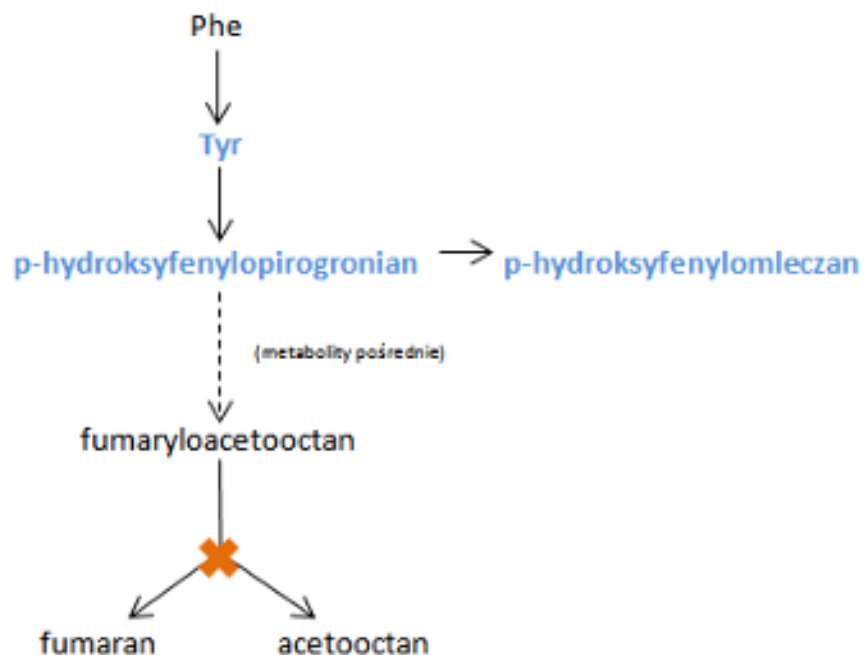


Choroba syropu klonowego - niska aktywność kompleksu dehydrogenazy alfa-ketokwasów o rozgałęzionym łańcuchu, który odpowiada za dekarboksylację leucyny, izoleucyny i waliny, czyli aminokwasów rozgałęzionych. Nazwa schorzenia wywodzi się od zapachu moczu osoby chorej, przypominającego zapach syropu klonowego.

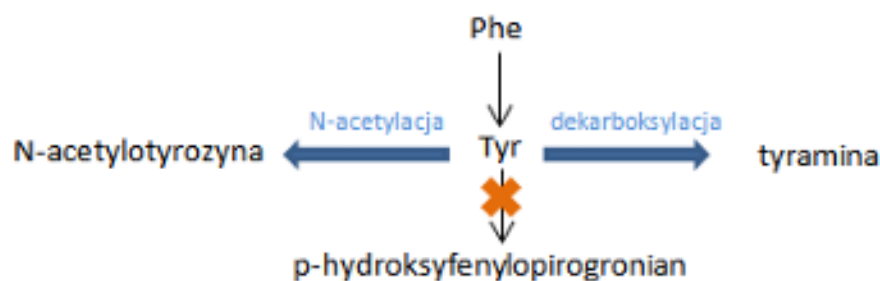


wymioty, nudności; drżenia; problemy z karmieniem; wiotkość; senność; uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego prowadzące do śpiączki

Tyrozynemia typu I:



Tyrozynemia typu II:



Nieprawidłowa aktywność **hydrolazy fumaryloacetoctanu - efekt mutacji genu FAH.**

Dziedziczenie autosomalne recesywne.

Dziecko może zachorować, gdy jego rodzice:

- oboje są nosicielami,
- oboje są chorzy,
- jedno z nich jest nosicielem, a drugie osobą chorą.

uszkodzenia nerek i wątroby

- ból oczu;
- nadwrażliwość na światło (fotofobia);
- bólące zmiany skórne (przede wszystkim na dłoniach i stopach);
- rogowacenie skóry dłoni i stóp;
- owrzodzenia rogówki;
- zmiany w zachowaniu;
- problemy z koordynacją ruchową;
- upośledzenie umysłowe (u ok. 50% przypadków).

PODSUMOWANIE

1. Cykl mocznikowy to:

- a. Proces anaboliczny zachodzący w nerkach
- b. Proces kataboliczny zachodzący w nerkach
- c. Proces anaboliczny zachodzący w wątrobie
- d. Proces kataboliczny zachodzący w wątrobie

2. Szybkość reakcji enzymatycznych zależy od

- a. Stężenia substratu
- b. Stężenia enzymu
- c. temperatury
- d. wszystkich wymienionych

3. Struktura pierwszorzędowa białek oznacza:

- a. Zwinięcie łańcucha białkowego utrwalone wiązaniami wodorowymi
- b. Sposób połączenia struktur trzeciorzędowych w przestrzeni
- c. Sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym
- d. Strukturę utrwaloną przez mostki dwusiarczkowe

4. Nieodwracalne inhibitory enzymów:

- a. Wiążą się kowalencyjnie z enzymem,
- b. Powodują trwałą blokadę enzymu
- c. Mogą wiązać się nie zawsze w obrębie centrum aktywnego,
- d. Wszystkie odpowiedzi prawidłowe

5. Przykładem białek o budowie włókienkowej (białka fibrylarne) jest/są:

- a. Keratyna
- b. Albumina
- c. Histony
- d. Globuliny

6. Oceń słuszność poniższych zdań opisujących albuminę i zaznacz odповідь prawidłową:

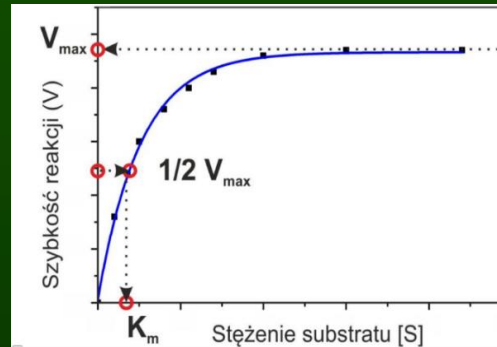
- a. Albumina to białko fibrylarne
- b. Albumina to białko globularne
- c. Albumina spełnia głównie funkcje immunologiczne
- d. Albumina w niewielkim stopniu odpowiada za tzw. ciśnienie onkotyczne

7. Enzymy to:

- a. Substancje chemiczne, które są wykorzystywane do produkcji papieru.
- b. Białka, które katalizują reakcje chemiczne w organizmach żywych.
- c. Składniki odżywcze, które pomagają w trawieniu
- d. Związki tłuszczowe, które regulują metabolizm komórek

8. Z poniższego wykresu wynika, że w miarę zwiększania stężenia substratu:

- a. Szybkość katalizowanej przez enzym reakcji zależy liniowo od stężenia substratu
- b. Szybkość katalizowanej przez enzym reakcji rośnie proporcjonalnie do stężenia substratu
- c. Przyrost szybkości reakcji stopniowo zwalnia, aż osiąga wysycenie
- d. Wszystkie odpowiedzi są prawidłowe

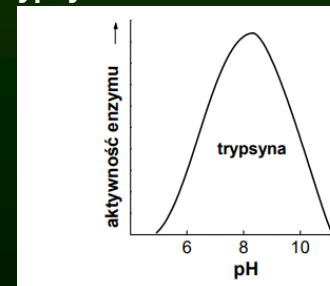


9. Szybkość reakcji enzymatycznej:

- a. Nie zależy od odczynu środowiska (pH)
- b. Zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury w takim jej zakresie, w którym enzym zachowuje pełną aktywność.
- c. Wzrasta przeciętnie dziesięciokrotnie przy każdym wzroście temperatury o 10 °C
- d. Zwiększa się w obecności inhibitorów w środowisku reakcji

10. Z poniższego wykresu wynika, że największą aktywność osiąga trypsyna w środowisku o odczynie:

- a. Zasadowym
- b. Kwaśnym
- c. Obojętnym
- d. Mieszanym



11. Aminokwasy tzw. NIEZBĘDNE to:

- a. aminokwasy endogenne
- b. aminokwasy egzogenne
- c. aminokwasy produkowane w organizmie
- d. aminokwasy powstające z kwasów tłuszczowych

12. W białkach organizmów żywych występuje zwykle:

- a. 10 aminokwasów
- b. 20 aminokwasów
- c. 64 aminokwasów
- d. 16 aminokwasów