

577.15:623.459.82:547.1'118.5

PERSPEKTIVY VYUŽITÍ MODELŮ ENZYMŮ PŘI ODMOŘOVÁNÍ ORGANOFOSFOROVÝCH OTRAVNÝCH LÁTEK

Mjr. ing. Jiří CABAL

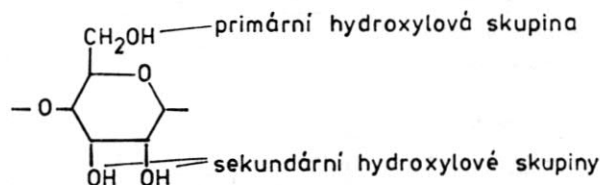
Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové
(rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

V uplynulých letech byl v ČSA směřován výzkum principů odmořování otravných látek (OL) na využití běžných chemických reakcí a fyzikálních dějů, jako je sorpce. Praktickým odrazem této výzkumné činnosti bylo zavedení individuálního protichemického balíčku fungujícího na sorpčním principu a aminoalkoholátového odmořovacího roztoku OR3 pro soupravy OS3 do výzbroje ČSA. Další zvýšení účinnosti odmořovacího procesu, snížení agresivity a korozivního působení vůči různým konstrukčním povrchům, včetně lidské kůže, je možné dosáhnout jen činidly s principiálně odlišným mechanismem reakce s otravnou látkou. Činidla tohoto druhu byla již delší dobu hledána též mezi látkami souhrnně nazývanými jako katalyzátory chemických reakcí. Snahy o využití principu katalýzy v odmořování jsou datovány již z 50. let, kdy byly prováděny experimenty s cílem záměrně vytvořit přechodový komplex otravné látky s katalytickým činidlem, jako jsou např. aminometalické cheláty (1) aj. Dále byly prováděny pokusy s některými druhy enzymů, které jsou schopny degradovat nervově paralytické otravné látky a organofosforové insekticidy. Zajímavých výsledků bylo dosaženo s alkalickými fosfatázami, které dobře odmořují látky, jako jsou DFP a tabun. Touto problematikou se dříve zabývali i pracovníci našeho pracoviště (2), přičemž byla potvrzena významná aktivita detoxikujících enzymů ve vztahu k tabunu a somanu, méně již k sarinu a zcela zanedbatelná byla u modelové látky VX. Pro odmořování organofosforových otravných látek byly využívány i tzv. živé odmořovací receptury, tj. roztoky s mikroorganismy schopnými rozkládat otravné látky (3, 4, 5). Postupy využívající k detoxikaci organofosforových OL enzymů a mikroorganismů však narážely i přes vcelku slibné výsledky experimentů na některé obtíže související s praktickým využitím těchto receptur, jako je omezená skladovatelnost, malá odolnost proti vlivům vnějšího prostředí, pomalost v náběhové fázi reakce aj. Z těchto důvodů byly dále hledány cesty, jak získat látky s katalytickou účinností enzymů, ale bez jejich negativních vlastností. Jedním z možných řešení je využití tzv. syntetických modelů enzymů.

Ve struktuře enzymů, pokud nás bude zajímat jejich katalytická funkce, mají rozhodující význam tzv. aktivní a vazebná místa. Jsou to části struktury enzymů schopné zachytit molekulu substrátu s pomocí některých funkčních skupin okolních aminokyselin polypeptidového řetězce, a vytvořit tak kovalentní vazby se substrátem. Tak vznikne přechodový komplex schopný další reakce. Nároky této struktury, co se týká její funkce, dobře splňuje skupina sloučenin souhrnně nazývaná cyklodextriny (CD).

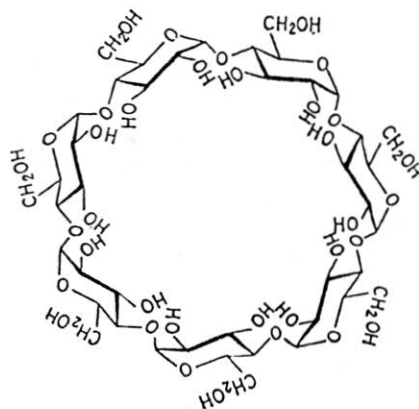
Cyklodextriny jsou produkty částečné depolymerace škrobů způsobené enzymy některých mikroorganismů. Jejich struktura je dána základní stavební jednotkou škro-

bu D-glukopyranózou (obr. 1), která se v molekule CD

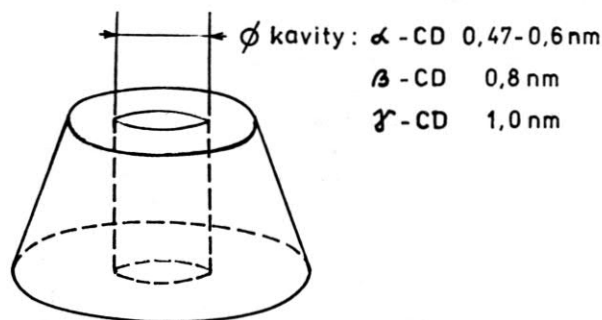


Obr. 1 Základní stavební jednotka škrobu - glukopyranóza

n-krát opakuje, přičemž oba konce polysacharidového řetězce jsou spojeny (obr.2).



Obr. 2 Struktura molekuly CD



Obr. 3 prostorové uspořádání molekuly CD

V odborné literatuře se první zmínka o CD objevila v r. 1891, kdy byly Villiersem (6) popisovány jako produkt trávení škrobu *Bacillus amylobacter*. Tehdy byly nazývány jako celulosiny. V polovině 30. let byly Freu-

denbergem (7) připraveny čisté CD a objasněna jejich struktura. V polovině 50. let se začala intenzivně rozvíjet cyklodextrinová chemie inkluzních komplexů, jejímž základem je schopnost CD pohlcovat cizí molekuly v kapalně i plynné fázi. V praxi jsou využívány alfa, beta a gama CD s $n = 6, 7, \text{ a } 8$, z nichž největší uplatnění našel beta-CD.

Tabulka 1

Přehled fyzikálních a toxikologických vlastností

Parametr	alfa-CD	beta-CD	gama-CD
relativní mol. hmotnost	972	1135	1297
počet glukopyranosových jednotek v cyklu	6	7	8
průměr kavity [m]	$4,7-6 \cdot 10^{-10}$	$8 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
krystalografická soustava	šesterečná	jednoklonná	čtverečná
bod tání [°C]	cca 200	cca 200	cca 200
speciální hustota [g/ml]	1,42-1,45	1,42-1,45	1,42-1,45
rozpuštnost ve 100 ml vody při 25 °C [g]	14,5	1,8	23,2
toxická pro krys při dlouhodobém [g/kg] podávání - LD ₅₀			
p. o.	-	12	-
i. v.	1	0,788	-
i. p.	-	0,590	-

To, co tyto látky činí zajímavými, je jejich prostorové uspořádání, které lze zjednodušeně popsat jako prstenec, kde na jednom čele jsou umístěny primární hydroxylové skupiny a na druhém sekundární. Vnitřní válcová plocha je tvořena atomy vodíku a glykosidického kyslíku. Výsledným efektem této konfigurace je hydrofilní vnější povrch molekuly a hydrofóbní vnitřní povrch dutiny (obr. 3). Toto uspořádání CD molekuly je svými funkčními vlastnostmi podobné aktivnímu i vazebnému místu enzymu.

Příprava CD je založena na fermentaci škrobu těmito mikroorganismy: *Bacillus amylobacter*, *Bacillus mace-rans*, *Bacillus megatherium* a *Klebsiella pneumoniae* produkujících enzym transglykosylázu, která provádí konverzi předhydrolyzovaného škrobu na CD (8, 9, 10, 11, 12, 13). Výzkum CD byl v uplynulých letech veden ve dvou směrech. V prvním byla objasněna funkce a vlastnosti dutiny uvnitř CD molekuly. To se po čase odrazilo i v různých praktických aplikacích a dnes již jsou CD zcela běžně využívány, např. jako látky schopné řídit uvolňování aktivních komponent léčiv nebo přípravků na ochranu rostlin při jejich aplikaci (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

V druhém směru, když byla poznána podobnost CD s enzymy, byla snaha modifikovat hydroxylové skupiny glukopyranózy jinými funkčními skupinami, a tak zlepšit reaktivní katalytické vlastnosti CD. V počátku bylo úsilí výzkumu zaměřeno na přípravu relativně jednoduchých derivátů CD a v návaznosti na to byly zkoumány jejich vlastnosti. Až později se objevila myšlenka zcela cíleně napodobit chemickou strukturu aktivních center některých dobře prozkoumaných enzymů. V této etapě se však obje-

vily některé těžko řešitelné problémy, a to zejména v oblasti syntézy, na kterou byl kladen požadavek zcela přesně definovaného rozmístění funkčních skupin na místech hydroxylových skupin glukopyranóz tvořících CD. Po překonání této obtíže, což se mezi prvními podařilo Breslowovi a spol. (21) při syntéze modelu ribonukleázy, se otevřela cesta k syntéze vysoce účinných enzymových modelů. Mimo již zmíněné ribonukleázy se podařilo syntetizovat modely některých serinových proteáz, metaloproteáz a alfa-chymotripsinu, u kterého bylo dosaženo při hydrolýze m-t-butylfenylacetátu 154 000krát větší rychlosti hydrolýzy než v reakci bez katalyzátoru (22), což je jen 18krát méně než u nativního enzymu. Dále byla napodobena funkce karbonátanhydrázy, tryptofansyntázy, některé typy oxidoreduktáz a další.

Shrneme-li dosud uvedená fakta, dospíváme k závěru, že je možno syntetizovat fungující jednoduché modely enzymů, které jsou svojí aktivitou blízké svým nativním vzorům. Podstatné je též to, že získané modely enzymů jsou schopny urychlit hydrolýzu různých esterů a mezi nimi i esterů kyseliny fosforečné a esterů fosfonových kyselin. Szeitli a Bánky-Elöd (23) prováděli experimenty s organofosforovým insekticidem trichlorfonem, přičemž zjistili významný vliv CD na urychlení jeho hydrolýzy. Kausar a spol. se v práci (24) zabývali vlivem CD na rychlost alkalické hydrolýzy triesterů fosforečné kyseliny a prokázali též jejich katalytický účinek. Matsumoto a Komiyama (25) využili jako katalyzátor beta CD substituovaný diethylenetriaminem, který se při reakcích s diestery kyselin fosforu projevil jako velmi účinný katalyzátor. Z vojenského hlediska je zajímavá práce Van Hooionka a Breebaart-Hansena (26), kteří uvádějí, že 0,1 M roztok alfa CD urychluje hydrolýzu sarinu až 30krát.

Z výsledků těchto prací je patrné, že CD dokáží účinně štěpit i látky typu organofosforových esterů, přičemž použité CD nebyly substituovány nebo byly substituovány jen jednoduchými funkčními skupinami. Vezmeme-li v úvahu výsledky práce Bendera (22), objevuje se zde možnost vytvořit modely enzymů s katalytickou účinností v detoxikačních reakcích zmíněných organofosforových otravných látek. Vlastnosti těchto katalyzátorů navíc nabízejí ještě jednu velmi lákavou možnost: vytvořit jednu směs katalyzátorů, která by s vysokou účinností mohla odmořovat všechny typy otravných látek. Nezanedbatelné je i to, že při zachování reakční rychlosti dnešních odmořovacích receptur by bylo možno radikálně omezit jejich alkalické a oxidační vlastnosti, což by umožnilo jejich aplikaci i na povrchy, u kterých to dosud nebylo možné, včetně pokožky zamořených osob.

V ČR doposud neexistuje velkovýroba CD. Jedná se o typickou biotechnologii, ekologicky čistou, s možností využití domácí suroviny - škrobu. Je jen otázkou času, kdy se tyto látky i u nás začnou vyrábět. Ve východní Evropě je zatím jediným producentem maďarská firma Chiňoin. Nešlo by totiž jen o ryze vojenskou výrobu, ale i mnohem širší aplikace ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu, kde je beta-cyklodextrin často používán jako inkluzní systém pro molekulární "enkapsulaci" farmak, syntetických či přírodních chuťových a aromatických látek apod. Inkluzní komplex CD-substrát zabezpečuje stabilitu substrátu, ochranu proti degradaci v různých prostředích a jeho postupné uvolňování.

Souhrn

V článku je proveden rozbor dosavadního vývoje odmořovacích činidel otravných látek a nastíněny jeho perspektivy. Jedním z hlavních směrů současného výzkumu je hledání odmořovacích činidel na bázi katalyzátorů blízkých svojí funkcí enzymům. Mezi tyto látky patří cyclodextriny, které jsou schopny napodobit základní funkce enzymů. Zlepšení jejich funkce napomáhá navázání dalších funkčních skupin na cyclodextrinový skelet. Jsou popsány aplikace těchto látek při hydrolýze esterů fosforečných a fosfonových kyselin.

Literatura

1. WAGNER-JAUREG, T. et al.: Model reaction of phosphorus containing enzyme inactivators. IV. The catalytic activity of certain metal salts and chelates in the hydrolysis of diisopropyl fluorophosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1955, s. 922-929.
2. ORNST, F.: Enzymatická detoxikace bojových organofosfátů. [Kandidátská disertace]. Hradec Králové 1967. 61 s. VLVDÚ JEP.
3. HOUSKIN, F. C. G. - ROUSH, A. H.: Hydrolysis of nerve gas by liquid type diisopropyl phosphonofluoridate hydrolysing enzyme on agarose resin. *Science*, 215, 1982, s. 1255-1257.
4. FISCHER, H. F. - MUNNECKE, D. M.: Microbial and enzymatic degradation of Parathion. [Výzkumná zpráva]. Brunswick, Institut für Bodenbiologie Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft 1980.
5. BAUMGARTEN, J. - BLASS, W. - FROMMER, W. - MAELLHOFF, E.: Umwandlung von Parathion durch spezielle Mikroorganismen oder Enzymen. [Závěrečná výzkumná zpráva]. Brunswick, Institut für Bodenbiologie Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft 1982.
6. VILLIERS, A.: *Compt. rend.*, 112, 1891, s. 536. Citováno podle SZEITLI, J.: Cyclodextrins and their inclusion complexes. Budapest, Akademiai Kiado 1982. 296 s.
7. FREUDENBERG, K. - JACOBI, R.: Schardingers dextrins from starch. *Ann.*, 518, 1935, s. 102.
8. BENDER, H.: Production, characterisation and application of cyclodextrins. *Adv. Biotechn. Proces.*, 6, 1986, s. 31-71.
9. Pat. Euro 0 045 464. Nihon Shokuhin Kako Co. HORIKOSHI, K.: Process for producing cyclodextrins. 1982.
10. Pat. Japan 89 168 295. Sanei Toka k. k. ITO, Y. - HASEGAWA, N. - SUZUKI, K.: Enzymic manufacture of cyclodextrins from extruded starch. 1989.
11. HORIKOSHI, K. - NAKAMURA, N. - MATSUZAWA, N. - YAMAMOTO, M.: Industrial production of cyclodextrins. In: *Proceedings of the first International Symposium on Cyclodextrins*. Dordrecht 1982, s. 25.
12. Pat. Japan 87 104 590. Ensuiko Sugar Refining Co. HASHIMOTO, H. et al.: Manufacture of cyclodextrins from starch. 1987.
13. Pat. Japan 86 185 196. Shokuhin Sangyo Bioreactor System Gijutsu Kenkyu Kumiai. SAKAI, S. et al.: Cyclodextrin production with immobilized enzyme. 1986.
14. SZEITLI, J. - OLAH, B.: Molecular encapsulation of pesticides using cyclodextrins. *Novenyvedelem*, 19, 1983, s. 364-371.
15. MINAMITE, Y. - KATSUDA, Y.: Present status and future aspect for pesticides included in cyclodextrins. *Denpun Kagaku*, 31, 1984, s. 112-116.
16. BOOCCOCK, G. - CAMILLERI, P.: Beta cyclodextrin inclusion complexes of Mevinphos. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1985, s. 1032-1034.
17. UEKAMA, K. et al.: Enhanced dissolution and oral bioavailability of alpha-tocopheryl esters by dimethylbeta-cyclodextrin complexation. *J. Inclusion Phenom.*, 6, 1988, s. 167-174.
18. Pat. NSR 3 346 123. Janssen Pharmaceutica N. V. BRAUNS, U. - MUELLER, B. W. W.: Beta-cyclodextrin inclusion compounds for pharmaceuticals. 1985.
19. DUCHENE, D.: New trends in pharmaceutical applications of cyclodextrin inclusion compounds. In: *Proceedings of the fourth International symposium on cyclodextrins*. 1988, s. 265.
20. SZENTE, L. - HARANGI, J. - SZEITLI, J.: Long term storage stability studies on flavour beta-cyclodextrin complex. *ibid.* s. 545.
21. BRESLOW, R. et al.: Beta cyclodextrinylbisimidazole a model for ribonuclease. *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 1978, s. 3227.
22. BENDER, M. L.: An organic chemical model of the alfa chymotrypsin intermediate. *J. Inclusion Phenom.*, 2, 1984, s. 433.
23. SZEITLI, J. - BANKY-ELÖD, E.: Catalysis of the decomposition of trichlorophen by inclusion complex formation. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 91, 1976, s. 67.
24. KAUSAR, A. R. et al.: Hydrolysis of phosphate esters with CD in alkaline solution. *Indian J. Chem.*, 5, 1984, s. 476-477.
25. MATSUMOTO, Y. - KOMIYAMA, M.: Beta CD bearing diethylenetriamine as highly active phosphodiester hydrolysing agent. *Chem. Lett.*, 3, 1990, s. 469-472.
26. VAN HOOIDONK, C. - BREEBAART-HANSEN, J. C. A. E.: Model studies for enzyme inhibition. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 90, 1971, s. 680.

Klíčová slova: Enzym; Cyclodextrin; Organofosfát.

Do redakce došlo 25. 5. 1992