



Dekontaminacja enzymatyczna broni masowego rażenia

EDYTA PRUSIŃSKA-KURSTAK

Wojskowa Akademia Techniczna, Wydział Nowych Technologii i Chemii,
00-908 Warszawa, ul. gen. S. Kaliskiego 2, eprusinska-kurstak@wat.edu.pl

Streszczenie. Artykuł jest poświęcony metodom odkażania broni masowego rażenia (biologicznej oraz chemicznej) opartym na stosowaniu białkowych katalizatorów reakcji chemicznych — enzymów. Celem artykułu jest przedstawienie możliwości wykorzystywania enzymów do neutralizacji oraz destrukcji szkodliwych dla środowiska i człowieka związków chemicznych używanych w broni masowego rażenia. Pokazano mechanizm reakcji enzymatycznej. Przedstawione są możliwości wykorzystywania lizozymu oraz mieszanin lizozymu z chitynazą, mutanolizyną jako destruktora niebezpiecznych bakterii (*E. Coli*, laseczki wąglika *Bacillus anthracis*) oraz ich zarodników. Dokonano porównania wad i zalet stosowania chemicznych oraz enzymatycznych sposobów dekontaminacji. Ustalono, że w określonych warunkach enzymy mogą stanowić alternatywę dla chemicznych sposobów dekontaminacji broni masowego rażenia.

Słowa kluczowe: dekontaminacja, broń masowego rażenia, enzymy

DOI: 10.5604/12345865.1131332

1. Wprowadzenie

Od drugiej połowy XX w. opracowywane są sposoby odkażania broni masowego rażenia oparte na stosowaniu enzymów — w większości katalizatorów białkowych przyspieszających specyficzne reakcje chemiczne poprzez obniżanie ich energii aktywacji. W reakcjach dekontaminacyjnych uczestniczą takie enzymy jak lizozym, laktoferyna, mutanolizyna, chitynaza i in. Ta grupa białek zlokalizowana jest w komórkach oraz płynach ustrojowych organizmów żywych, pełniąc rolę biokatalizatorów reakcji biosyntezy i rozkładu. Bez ich udziału zachodzące w organizmie reakcje odbywałyby się zbyt wolno lub za mało intensywnie, by zaspokajać potrzeby organizmu.

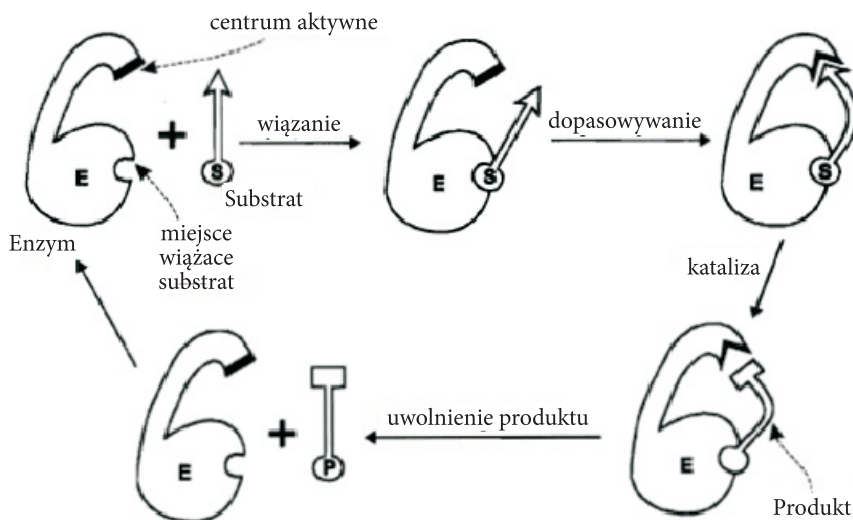
Enzymy mogą być zbudowane z samego białka (np. rybonukleaza, ureaza) lub z białka, które jest częścią przeważającą, oraz substancji niebiałkowej (małocząsteczkowe związki nieorganiczne, pochodne, jak również atomy metali). Niebiałkowa część koenzymów pełni rolę przenośników elektronów, atomów lub ugrupowań chemicznych z jednego metabolitu na inny [1].

Podczas katalizy enzymatycznej cząsteczka substratu jest wiązana w określonym obszarze cząsteczki enzymu (tzw. centrum aktywne). Znajduje się w nim grupa prostetyczna. W wyniku reakcji powstaje przejściowy nietrwały kompleks enzym–substrat. Korzystając ze swobodnego układu grup chemicznych w centrum aktywnym, enzym oddziałuje na nie, rozluźniając określone wiązania chemiczne [2]. Centrum aktywne enzymu to niewielka część całej cząsteczki enzymu, która stanowi określoną trójwymiarową szczelinę lub zagłębienie w cząsteczce enzymu. Tworzą je reszty aminokwasów kontaktowych, których grupy biorą bezpośredni udział w tworzeniu i zrywaniu wiązań. W tej roli najczęściej występują histydyna, lizyna, cysteina i in.

Szybkość reakcji katalitycznej zależy od: stężenia substratu i enzymu; obecności aktywatorów enzymatycznych i inhibitorów enzymatycznych; stężenia jonów wodorowych (enzymy znacznie różnią się optymalnym poziomem pH reakcji), a także od temperatury (optymalna wynosi od 30 do 40°C) [3].

Przy stałym stężeniu enzymu szybkość reakcji zwiększa się proporcjonalnie do wzrostu stężenia substratu aż do osiągnięcia maksymalnej szybkości reakcji [4].

Na drugim etapie katalizy enzymatycznej dochodzi do rozpadu kompleksu enzym–substrat z uwolnieniem produktu do środowiska. Powstający wolny enzym może rozpocząć nowy cykl katalityczny, wiążąc kolejną cząsteczkę substratu.



Rys. 1. Mechanizm katalizy enzymatycznej [3]

Poszczególne grupy enzymów są odpowiedzialne za przyspieszenie różnego typu reakcji. Za przenoszenie różnych grup chemicznych odpowiedzialne są transferazy, za reakcje hydrolizy–hydrolazy itd.

2. Dekontaminacja enzymatyczna środków biologicznych

Wspomniane właściwości enzymów mogą być użyteczne przy odkażaniu skażeń bronią chemiczną i biologiczną. Pierwszym enzymem, którego działanie przeciwbakteryjne zostało potwierdzone, był lizozym, posiadający właściwości enzymu hydrolitycznego rozkładającego peptydoglikan ściany komórkowej bakterii. W warunkach laboratoryjnych lizozym (pozyskiwany głównie z jaj kurzych) wykazał zdolność zakłócania struktur *E. Coli*, a także innych bakterii. W przypadku *E. Coli* lizozym wykazał synergetyczne działanie z laktoferyną (LF). Razem mają zdolność bakteriobójczą, w ten czas osobno okazały się bakteriostatyczne zarówno w stosunku do *E. Coli*, jak i *S. typhimurium* oraz *Vibrio cholerae*. Pod wpływem LF i lizozymu następowało roztwarzanie struktury bakterii, co prowadziło do jej zabijania poprzez uszkodzenie osmotyczne [5]. Lizozym oddziałuje poprzez destrukcję ściany komórkowej bakterii. Rozrywa wiązania glikozydowe pomiędzy cząsteczkami kwasu N-acetylmuraminowego (NAM) i N-acetyloglukozaminą (NAG). Mechanizm działania lizozymu (muramidazy) polega na hydrolizie wiązań β -1,4-glikozydowych pomiędzy cząsteczkami NAM i NAG w taki sposób, że atom tlenu wiązania glikozydowego pozostaje przy cząsteczce NAG, podczas gdy cząsteczka NAM otrzymuje grupę OH– z cząsteczki wody. Proces ten odbywa się według mechanizmu substytucji nukleofilowej pierwszego rzędu S_N1 . Optymalny poziom pH reakcji, przy którym lizozym wykazuje najwyższą aktywność przeciwbakteryjną, wynosi 6,24. Szerszy zakres optymalnej wartości pH dla bakteriobójczych właściwości tego enzymu wynosi od 5 do 7. Niezależnie od tego lizozym wykazuje efektywność także w środowisku kwaśnym i zasadowym [6].

Na oddziaływanie lizozymu najbardziej podatne są Gram-dodatnie bakterie, które nie posiadają zewnętrznej błony komórkowej. Natomiast działanie lityczne lizozymu wobec Gram-ujemnych bakterii jest ograniczone, ponieważ ich ściany komórkowe posiadają dodatkowe polipeptydy, lipoproteidy i lipopolisacharydy, które tworzą dodatkową warstwę ochronną [7].

W przeprowadzonych w połowie lat 90. XX wieku badaniach zdolność niszczenia bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych wykazała mieszanina lizozymu z chitynazą (PR-3), osobno posiadającą zdolność niszczenia ścian komórkowych grzybów [8]. Mieszanina lizozymu z mutanolizyną okazuje oddziaływanie na grupę bakterii *Bacillus species* [9].

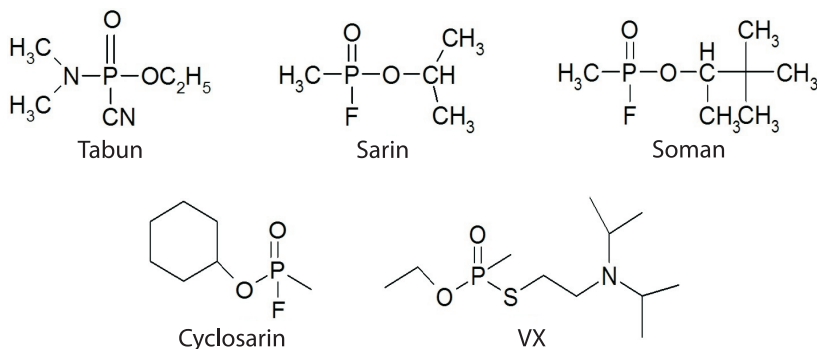
W dekontaminacji skażeń bronią biologiczną duży problem stanowi destrukcja zarodników bakterii. Zarodniki laseczki wąglika (*Bacillus anthracis*) poddawane

były oddziaływaniu mieszaniny składającej się z glukozy, L-alaniny, adenozyiny oraz inozyiny. Poprzez zmuszenie zarodników do kiełkowania obniżono ich zdolności ochronne [9].

Enzymy mogą być wykorzystywane również przy wytwarzaniu materiałów dezynfekujących. Najbardziej odpowiednie do tego są peroksydazy oraz haloperoksydazy, które wykorzystują nadtlenuk wodoru do aktywacji halogenków potrzebnych do produkcji związków przeciwdrobnoustrojowych [9].

3. Dekontaminacja enzymatyczna środków chemicznych

Środki chemiczne można podzielić na kilka grup w zależności od ich wpływu na organizm: paralityczno-drgawkowe, np. sarin (GB), soman (GD), VX, które oddziałują na układ nerwowy; parzące — substancje powodujące pęcherze, poparzenia, takie jak iperyt siarkowy (HD) i luizyt (L); duszące; ogólnotrujące; drażniące; psychotoksyczne. Budowa strukturalna niektórych z nich przedstawiona jest poniżej.



Rys. 2. Budowa strukturalna niektórych BŚT

Wiele z metod odkażania jest opartych na stosowaniu proszków do dekontaminacji, które pochłaniają ciekłe bojowe środki trujące, lub płynów do dekontaminacji, rozpuszczających bojowe środki trujące. Adsorpcja lub zmycie substancji chemicznej może zostawić pozostałości trujące. Większość środków chemicznych może być zneutralizowana za pomocą odpowiednich substancji chemicznych. Wykorzystywane są w tym celu, między innymi, środki do dekontaminacji, które mają właściwości utleniające. Jednakże niektóre z tych form dekontaminacji są niebezpieczne dla personelu, sprzętu lub środowiska. Mogą prowadzić do powstania toksycznych produktów ubocznych, które trafiają do środowiska, i tym samym stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Ich składnikami aktywnymi chemicznie są substancje, które stopniowo zużywają się podczas reakcji. Jeśli te

związki (fenolowe, związki chloru, aldehydy, preparaty zawierające metale ciężkie i in.) dostaną się do gleby lub wody, mogą stanowić zagrożenie dla środowiska. Wymagają też bezpiecznego obchodzenia się ze strony personelu przeprowadzającego odkażanie. Środki wykorzystywane do dekontaminacji dość często wykazują również działanie agresywne wobec materiałów, z którymi wstępują w kontakt. W wyniku takiego kontaktu może dochodzić do korozji elementów sprzętu stosowanego w tym celu. Z odkażalnikami chemicznymi wiąże się też problem ich stosowania w pomieszczeniach zamkniętych.

Tych niedoskonałości odkażania chemicznego można w znacznym stopniu uniknąć dzięki związkom chemicznym zawierającym katalizator enzymatyczny. Enzymy są łagodne dla środowiska. Są to wysoce wydajne katalizatory biologiczne, zdolne do zwiększania szybkości reakcji ok. 10-12 razy w porównaniu do niekatalizowanych reakcji. Znaczną zaletą stosowania enzymów jest również to, że nie są one toksyczne, żrące i palne. Ponadto enzymy są łatwe w transporcie, stosowaniu, są bezpieczne dla personelu i sprzętu [10].

Enzymy są łatwo biodegradowalne. Inną atrakcyjną ich cechą jest to, że mogą skutecznie działać przy neutralnym pH odkażanej powierzchni, obniżając koszty energetyczne, zwiększając bezpieczeństwo i zmniejszając zniszczenia urządzeń, budynków i środowiska. Jednak niska temperatura może obniżyć działanie enzymu. Wyższe temperatury oraz skrajne pH prowadzą do dezaktywacji białka [11]. Enzymy o różnych właściwościach, w przeciwieństwie do większości katalizatorów chemicznych, mogą być mieszane ze sobą. Istnieją również pewne wady stosowania enzymów, takie jak niewystarczająca stabilność lub pracochłonna ich izolacja.

Podsumowując, wykorzystanie katalizatorów enzymatycznych do dekontaminacji i ochrona przed bojowymi środkami chemicznymi w pewnych warunkach jest skuteczne, bezpieczne i przyjazne dla środowiska [12]. Enzymy zapewniają wysoką wydajność przy minimalnym zużyciu katalizatora. Jako naturalne białka, enzymy przyczyniają się do ekologicznych rozwiązań problemów [13].

Jedną z największych zalet enzymatycznego usuwania zanieczyszczeń jest ich wzajemna kompatybilność. Stosowanie enzymów do odkażania jest też dość łatwe pod względem logistycznym. Przez dłuższy czas przy stosowanych metodach dekontaminacji BŚT trzeba było liczyć się z niską stabilnością stosowanych odkażalników oraz uwzględniać takie warunki pracy, które często stanowiły znaczne trudności. Najnowsze postępy w biologii molekularnej i inżynierii białek okazały się niezwykle pomocne w tworzeniu enzymów, które są znacznie mniej podatne na wspomniane ograniczenia. Nowoczesne techniki molekularne umożliwiają przeprowadzenie eksperymentów laboratoryjnych pozwalających na stworzenie wymaganych warunków do rozwoju biokatalizatorów. Dalszy rozwój badań nad dekontaminacją enzymatyczną powinien w przyszłości zaowocować stworzeniem metod dekontaminacji wieloskładnikowej, która ma zapewnić skuteczną ochronę przed bronią chemiczną. Katalizatory enzymatyczne mogą również być stosowane przy likwidacji zapasów

środków chemicznych, którą uwzględnia konwencja o broni chemicznej. W tabeli 1 przedstawiono porównanie chemicznych oraz enzymatycznych metod odkażania z uwzględnieniem ich zalet oraz wad.

TABELA 1

Porównanie chemicznego oraz enzymatycznego odkażania bojowych środków trujących

Odkażanie	Zalety	Wady
Chemiczne	Znaczna skuteczność Duża stabilność Łatwe przygotowanie odkażalnika	Działanie żrące Toksyczność Agresywność dla skóry Wysoki poziom zużycia Szkodliwość dla środowiska Nie łączą się z innymi odkażalnikami Produkty uboczne czasami są toksyczne
Enzymatyczne	Nietoksyczność Brak właściwości żrących Bezpieczne dla środowiska Duża skuteczność Małe zużycie odkażalnika Kompatybilność z innymi odkażalnikami Szerokie zastosowanie	Mała stabilność Ograniczone przez warunki laboratoryjne Wysoka aktywność w wodzie Dość wąski zakres zastosowania Ograniczone parametry pracy Występuje uzależnienie od posiadania innych substancji Skłonność do zahamowania reakcji Alergenność

W przeprowadzonych dotychczas badaniach udało się uzyskać pozytywne wyniki odkażania poszczególnych rodzajów BŚT za pomocą enzymów. Należy jednak zaznaczyć, że badania te znajdują się w stadium początkowym i wymagają dalszej pracy. Enzymy, które wykazały działanie dekontaminacyjne w stosunku do niektórych BŚT wraz z charakterystyką działania tych BŚT, ukazane zostały w tabeli 2.

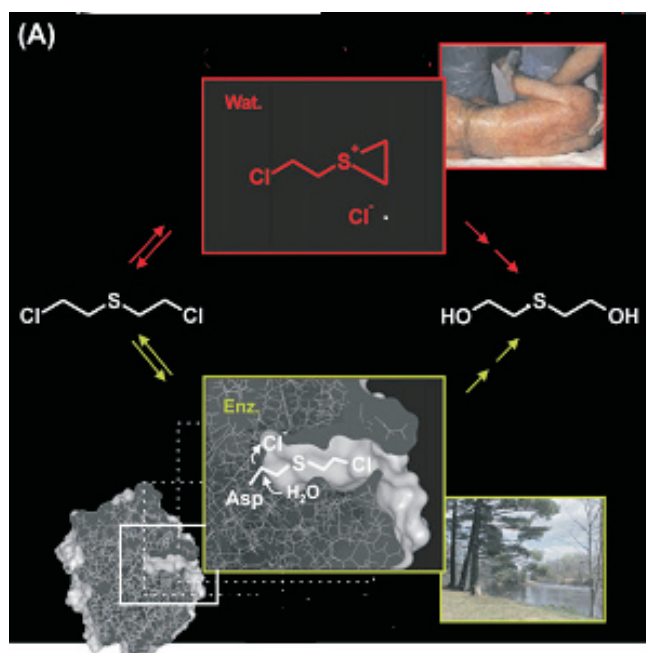
TABELA 2

Działanie poszczególnych typów BŚT a enzymy stosowane w celu ich unieszkodliwienia

Typ BŚT	Sposób działania	Objawy zatrucia	Nazwa	Enzymy odkażające
Paralityczno-drgawkowe	inaktywuje enzym acetylocholinesterazy, zapobiega podziałowi neuroprzekaźników acetylocholin w złączach nerwowych ofiary i powoduje zarówno muskarynowe, jak nikotynowe efekty	zweżenie źrenic, ból głowy, mdłości, wymioty, biegunka, utrata przytomności, śmierć poprzez uduszenie	Tabun, Sarin, Soman, Cyklosarin, VX	Organophosphate hydrolases (EC 3.1.8.1), diisopropylfluorophosphatases (EC 3.1.8.2), butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8)

cd. tabeli 2

Parzące	związki kwasotwórcze lub alkilujące, które prowadzą do poparzenia skóry oraz układu oddechowego	obszerne ciekłe pęcherze, poważne problemy z oddychaniem, wymioty, biegunka, śmierć na skutek obrzęku płuc	Iperyty siarkowy, Iperyty azotowy, Luizyt	Haloalkane dehalogenases, (EC 3.8.1.5) Enzymy nieznanne Enzymy nieznanne
Ogólnotrujące	może doprowadzić do niewydolności nerek lub bezpośrednio zakłócić utylizację tlenu w komórkach	sinica, nudności, ataki drgawek przed śmiercią	Arsyna, Cyjanowodor, Chlorocyjan	Enzymy nieznanne cyanide sulfurtransferases (EC 2.8.1.1), cyano-L-alanine synthases (EC 4.4.1.9), cyanide oxygenases
Lakrymatory	powodują mocne pieczenie w oczach i prowadzą do czasowej utraty wzroku	podrażnienia oczu, gardła, tchawicy, płuc, kaszel, wymioty	CN CS gas	glutathione S-alkene transferases (EC 2.5.1.18)



Rys. 3. Mechanizm samorzutnej i enzymatycznej hydrolizy iperytu [14]

Na rysunku 3 przedstawiony został samorzutny (u góry) i enzymatyczny (u dołu) mechanizm hydrolizy iperytu. Na samorzutną hydrolizę wpływa jon sulfonowy pośredni, który jest alkilującym związkiem powodującym ogromne komórkowe uszkodzenie. Enzymatyczna hydroliza iperytu odbywa się przez wpływ nietoksycznego pośrednika [14].

4. Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nad dekontaminacyjnymi właściwościami enzymów ukazują obiecujące perspektywy wykorzystywania ich do usuwania skażeń spowodowanych bronią masowego rażenia (biologiczną oraz chemiczną).

W odróżnieniu od stosowanych chemicznych sposobów dekontaminacji, odkażanie enzymatyczne jest bezpieczne dla środowiska, wysoce wydajne. Enzymy mogą też być łatwo dostarczone do miejsca skażenia [15].

Mimo tego że należy rozwiązać jeszcze wiele problemów teoretycznych i praktycznych (mała stabilność enzymów, ograniczoność parametrów pracy, skłonność do zahamowania reakcji przy obniżeniu temperatury i in.), enzymatyczne metody dekontaminacji stanowią obiecującą alternatywę do stosowanych obecnie chemicznych metod. Wdrożenie dekontaminacji enzymatycznej na szeroką skalę wymaga jednak dalszych badań laboratoryjnych.

Artykuł wpłynął do redakcji 30.09.2013 r. Zweryfikowaną wersję po recenzji otrzymano 26.09.2014 r.

Źródło finansowania pracy: środki statutowe Wojskowej Akademii Technicznej.

LITERATURA

- [1] POLANOWSKI A. (red.), *Enzymy*, [w:] *Laboratorium z biochemii*, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 2005.
- [2] BRITT B.M., *Understanding Enzyme Structure and Function in Terms of the Shifting Specificity Model*, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 37, 04, 2004, 399.
- [3] KORZENIEWSKI B., *Metabolizm*, Erem-Fosze, Rzeszów, 1995.
- [4] COPELAND R.A., *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, NY, 2004.
- [5] ELLISON R.T., GIEHL T.J., *Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme*, NY, 1991.
- [6] STRYER L., *Biochemia*, PWN, Warszawa, 2003.
- [7] BOROWIAK R., LEŚNIEWSKI G., *Próba zwiększenia funkcjonalności preparatów otrzymanych metodą wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu*, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 05, 2012.
- [8] SHIN-BIN L., *Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity*, *Food Chemistry*, vol. 116, 2009.

-
- [9] FRANK J.D., *Catalytic Enzyme-Based Methods for Water Treatment and Water Distribution System Decontamination*, <http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a457330.pdf>, 12.03.2013.
- [10] *Defenz Decon Enzymes. The advantage of enzyme technology over chemical decontaminants*, http://www.genencor.cn/uploads/tx_tcdaniscofiles/GENC-7877_DEFENZ_Bkgdr_Update_fnl3_07.pdf, 12.03.2013.
- [11] FRANK J.D., HARVEY F., RASTOGI V., *Enzymatic decontamination of C/B threat materials: from concept to commercialization*, <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA449477>, 25.02.2013.
- [12] MCDANIEL S., MCDANIEL J., WALES M., WIDE J., *Enzyme-based additives for paints and coatings, Progress in Organic Coatings*, 55, 2006.
- [13] ALCALDE M., *Enviromental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes*, Trends in Biotechnology, vol. 24, 2006.
- [14] PROKOP Z., OPLUSTIL F., FRANK J.D., DAMBORSKY I., *Enzymes fight chemical weapons*, Biotechnology Journal, vol. 1, 2006.
- [15] Richardt A., Blum M., *Decontamination of Warfare Agents: Enzymatic Methods for the Removal of B/C Weapons*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2008.

E. PRUSIŃSKA-KURSTAK

Enzymatic decontamination

Abstract. This paper is devoted to the methods of decontamination of weapons of mass destruction (biological and chemical), based on the use of protein catalysts of chemical reactions — enzymes. This paper presents the possibility of using enzymes to neutralize the harmful and destructive to the environment and human chemicals used in weapons of mass destruction. The mechanism of the enzymatic reaction is showed. These are the possibilities of using lysozyme as destructor dangerous bacteria (*E. coli*, anthrax *Bacillus anthracis*) and their spores. The advantages and disadvantages of chemical and enzymatic methods of decontamination have been compared. It was found that under certain conditions the enzymes can be an alternative to chemical methods of decontamination of weapons of mass destruction.

Keywords: decontamination, weapons of mass destruction, enzymes

