

Uloga citokroma P450 u nastanku aerotoksičnog sindroma

LUCIJA HOK¹, FRANJO JOSIP MARELJA¹, SANDRA MORIĆ¹,
MARKO PARLOV¹, ANA AKRAP¹, MIRZA BOJIĆ²

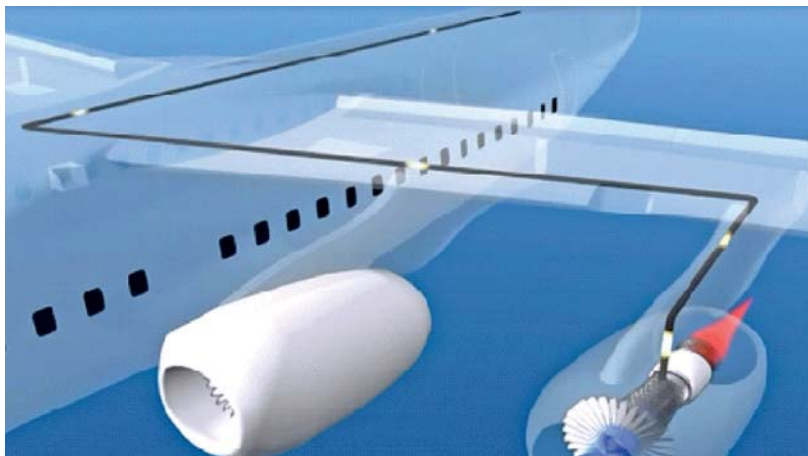
¹Studenti 5. godine studija farmacije, Sveučilište u Zagrebu,
Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb

²Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku kemiju, Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb

UVOD

Suvremeni čovjek sve češće koristi zrakoplov kao prijevozno sredstvo da bi u što kraćem vremenu stigao na udaljeno mjesto. Iako se radi o praktičnom načinu putovanja koji ne predstavlja nikakvu novost, mnogi sigurnosni aspekti nisu još posve razjašnjeni. Osim iznimno rijetke opasnosti od nesreće, čije posljedice mogu biti kobne, primijećeno je da se kod posade i putnika mogu javiti razni zdravstveni problemi te je stoga utemeljena nova grana medicine – zrakoplovna medicina (1). Između ostalog, navedeno područje se bavi i malo poznatim te od strane nadležnih tijela često zanemarivanim aerotoksičnim sindromom koji će biti pobliže opisan u ovom članku.

Većina putničkih zrakoplova leti na visini od 10 do 13 kilometara. Smatra se da se sa svakim kilometrom od razine mora temperatura smanjuje za 6,5 °C. Uzevši u obzir da je prosječna temperatura na površini Zemlje 15 °C, na visini letenja vanjska temperatura iznosi otprilike –50 °C. Jednako tako i vrijednost atmosferskog tlaka je izrazito niska (2). Tijekom leta, tlak u unutrašnjosti aviona je jednak atmosferskom tlaku na približno 2000 m nadmorske visine. Da bi se postigli takvi uvjeti, građa zrakoplova mora biti odgovarajuća. Mora se znatno povisiti tlak unutar zrakoplova; što se, laički rečeno, postiže tako da više zraka ulazi u avion, nego što izlazi. Također se i zrak koji se dovodi u unutrašnjost mora zagrijati pri čemu pomažu motori. Naime, motori prilikom rada stvaraju toplinu te moraju biti hlađeni, a najjednostavniji način za to je korištenje vanjskog zraka, koji se pri tome grije i nakon prolaska kroz prostor u kojem se nalaze motori, ulazi u unutrašnjost zrakoplova (slika 1.) (3).



Slika 1. Ulazak vanjskog zraka u zrakoplov (3).

Za rad motora potrebne su brojne kemijske supstancije koje mogu biti štetne po zdravlje ljudi, uključujući gorivo i motorno ulje nužno za podmazivanje, zaštitu, hlađenje i čišćenje motora. Aerotoksični sindrom povezuje se sa sastavnicama ulja trikrezilfosfatima (TCP), čiji je udio otprilike 3 %. Radi se o mješavini deset izomera i drugih strukturno sličnih molekula, fenolnih i ksilenolnih tvari. Najtoksičniji učinak imaju orto izomeri. Ostale komponente motornih ulja za zrakoplove su: smjesa estera C_5 – C_{10} masnih kiselina s pentaeritritolom i dipentaeritritolom, supstituirani difenilaminami te fenil- α -naftilamin. Potonja dva spoja su također toksična, ali je njihova zastupljenost manja od 1 % te se ne smatraju toliko škodljivima kao TCP (4).

Uslijed neispravnosti na motoru ili neodgovarajućeg održavanja moguće je ispuštanje TCP-a u prostor gdje se nalazi motor, a zatim zajedno s unesenim zrakom ulazak u kokpit i prostor za putnike. Učestalost takvih događaja, koji dovode do prisutnosti toksičnih tvari u unutrašnjosti zrakoplova se neslužbeno procjenjuje na približno 1 % (godišnje zrakoplovima putuje 3,5 milijarde putnika i otprilike 500 tisuća članova zrakoplovnih posada), ali nadležne institucije i zrakoplovni prijevoznici vrlo često negiraju ili pokušavaju umanjiti tu vrstu problema. No, ipak su poneki proizvođači zrakoplova ozbiljno shvatili taj problem te konstruirali Boeing 787 Dreamliner, tip zrakoplova kod kojega nema opasnosti od intoksikacije spomenutim tvarima zato što se unutrašnjost zrakoplova opskrbljuje zrakom na drugačiji način (5). No, ovaj je tip zrakoplova zastupljen u prometu s manje od 1 %.

Aerotoksični sindrom, zbog svoje učestalosti, predstavlja veliku opasnost utječući na zdravlje mnogobrojnih putnika i članova posade. Uz to, uzimajući u obzir potrebnu razinu koncentracije pilota tijekom leta kako bi bez poteškoća

upravljao zrakoplovom koji ponekad prevozi nekoliko stotina putnika, jasno je kako i najmanji zdravstveni problem može ugroziti živote mnogih. Neki od akutnih simptoma aerotoksičnog sindroma su gastrointestinalni (mučnina, povraćanje, dijareja), iritacija očiju, kože i gornjih dijelova respiratornog trakta te neurološki simptomi (glavobolja, vrtoglavica, konfuzija, umor). Kronični simptomi obuhvaćaju poremećaje imunološkog i središnjeg živčanog sustava (kratkotrajni problemi s pamćenjem, dezorijentiranost, poteškoće u koncentraciji). Reverzibilni učinci su posljedica kratkotrajnog izlaganja toksičnom plinu, međutim, najveću zabrinutost izazivaju oni kronični koji se javljaju nakon znatnije izloženosti (4, 6).

Toksičnost triarilfosfata

Kao što je već spomenuto, najtoksičniji spojevi nastali pirolizom motornog ulja su trikrezilfosfati i ugljikov monoksid, kojima se pripisuju neurotoksični učinci te *N*-fenil-*L*-naftilamin, koji djeluje kao iritans. Međutim, smatra se da aerotoksičnom sindromu najviše pridonosi tri-*o*-krezilfosfat (TOCP) (7).

Priča o toksičnosti TOCP-a započinje 1930-ih u SAD-u za vrijeme prohibicije, a povezuje se s vrlo popularnim ekstraktom đumbira, poznatijim kao *Ginger Jake*. Zabranjeno piće sadržavalo je 75 % etanola, a umjesto melase i ricinusovog ulja, često se u ekstrakt dodavao jeftiniji Lyndol, koji je sadržavao smjesu krezilfosfatnih estera, između ostaloga i TOCP. Kuhanjem, a potom konzumiranjem takvih pripravaka 50 000 ljudi u SAD-u je oboljelo od paralize karakterizirane *Jake* hodom kao posljedicom oštećenja leđne moždine i perifernih živaca (8, 9, 10). Gastrointestinalni simptomi mogu se pojaviti i 10 do 20 dana nakon peroralne primjene, a odgođena neuropatija javlja se postupno. U većini slučajeva, slabost mišića, bol i parestezija donjih ekstremiteta prelazi u paralizu, koja može zahvatiti i gornje ekstremitete. Osnovna terapija je fizikalna rehabilitacija (11).

TOCP kao organofosforni spoj može uzrokovati dva toksična učinka, inhibiciju kolinesteraza i odgođenu neuropatiju (12). Akutno izlaganje visokim dozama TOCP-a ili dugotrajno izlaganje nižim dozama TOCP-a može dovesti do simetrične senzomotorne periferne neuropatije koja se naziva odgođena neurotoksičnost uzrokovana organofosfatima (OPIDN, *organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity*) (4). Jedan do dva tjedna nakon intoksikacije javljaju se prvi simptomi: slabost, žarenje i trnci u nogama. Unutar nekoliko dana dolazi do progresije u flakcidnu (mlohavu) paralizu, koja najprije zahvaća distalne dijelove donjih ekstremiteta, a kasnije ruke i bedra. U kasnijim stadijima značajnija postaju oštećenja leđne moždine sa simptomima ataksije i mišićnih spazama, što se očituje abnormalnim hodom. Stanična oštećenja su vidljiva na razini *n. ischiadicusa*, *n. tibialis* i *n. peroneusa* te leđne moždine. Lezije gornjih motoričkih neurona su karakterizirane degeneracijom aksona s naknadnim oštećenjima mijelina. Oporavak se može očekivati kod blagih i umjerenih slučajeva, ali je vremenski zahtjevan

(dvije godine nakon početka neuropatije). Osjetljivost na TOCP i potencijal razvoja OPIDN ovisi o vrsti i starosti. Ljudi spadaju u skupinu najosjetljivijih vrsta, a sličnu osjetljivost ima i perad, zbog čega se često koriste kao animalni modeli za *in vivo* studije (13, 14).

Molekularna pozadina odgođene neuropatije inducirane TOCP-om još uvijek nije razjašnjena. Pretpostavljeno je nekoliko različitih hipoteza, od kojih je najpoznatija pretpostavka da dolazi do inhibicije neuropatske ciljne esteraze (NTE, *neuropathy target esterase*). NTE je transmembranska serinska hidrolaza koja katalizira deacilaciju membranskog fosfatidilkolina do topljivog glicerolfosfokolina i slobodnih masnih kiselina. Zbog strukturne kompleksnosti membrana i zahtjeva za brzim metabolizmom fosfolipida, NTE predstavlja esencijalni enzim za preživljavanje postmitotskih, visoko diferenciranih stanica živčanog sustava (15). Sljedeća hipoteza pretpostavlja da organofosforni spojevi induciraju aktivnost kinaze II ovisne o sustavu Ca^{2+} /kalmomodulin i posljedično dovode do fosforilacije staničnih proteina α - i β -tubulina, proteina II povezanog s mikrotubulima i mijelinskog bazičnog proteina. Hiperfosforilacija neurofilamenata smanjuje brzinu njihova transporta u aksonu te dovodi do akumulacije i disfunkcije citoskeleta (16). Najnovija hipoteza pretpostavlja da je za ranu fazu odgođene neuropatije odgovorna autofagija, proces kojim se razgrađuju neispravno sintetizirani proteini i oštećeni organeli čime se postiže zaštitni učinak. Međutim, TOCP stimulira autofagiju i razgradnju mitohondrija te uzrokuje degeneraciju aksona i dendrita, što se smatra inicijacijom odgođene neuropatije (17). Unatoč različitim hipotezama, toksični učinci TOCP-a se najviše povezuju s inhibicijom kolinesteraza pa je upravo taj mehanizam najviše istražen.

Pojava, intenzitet i progresija simptoma uzrokovanih triarilfosfatima ovisi o njihovoj strukturi, tj. veličini i položaju supstituenta, dozi, učestalosti i trajanju izloženosti te putu primjene. Naime, dugotrajnija primjena subtoksičnih doza TOCP-a izaziva OPIDN, što upućuje na zaključak da dolazi do akumulacije toksina (4, 18). Nesupstituirani trifenil fosfati ne uzrokuju OPIDN, a potencijal neurotoksičnosti ovisi o vrsti supstituenta i smanjuje se u nizu $CH_3 > C_2H_5 > n-C_3H_7 > iso-C_3H_7 > sec-butyl \approx tert-butyl$ (13). Uočeno je da je mono-*o*-krezilfosfat 10 puta, a di-*o*-krezilfosfat 5 puta toksičniji od tri-*o*-krezilfosfata, dok trikrezil fosfati supstituirani u *meta* i *para* položaju nisu toksični (19, 20). Međutim, zbog svog metabolizma u vrlo toksičan CBDP (2-(*o*-krezil)-4H-1,2,3-benzodiodksafosforan-2-on) smatra se da TOCP uzrokuje najveću štetu za zdravlje. Osim oralne primjene, toksičnost se može javiti i nakon udisanja te kutane izloženosti. Maksimalna alveolarna koncentracija (MAC) iznosi $0,1 \text{ mg/m}^3$ (0,0065 ppm) za 8 h izloženosti (21), a brzina transdermalnog infliksa TOCP-a se procjenjuje na $0,01 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$ (10). Iako je potrebna izloženost vrlo visokim koncentracijama u duljem vremenskom periodu kako bi došlo do pojave neurotoksičnosti izlaganje ispušnim

plinovima nije rijetko. O tome svjedoči i upozorenje British Airwaysa upućeno kabinskom osoblju o povećanoj učestalosti srodnih incidenata (50 prijava tijekom srpnja 2017.) (10).

U svrhu određivanja doze sigurne izloženosti (ESER, *estimated safe exposure rate*) TOCP-u za čovjeka, napravljena je procjena NOAEL-a (*no observed adverse effect level*) pri različitim režimima doziranja za odrasle jedinke mačke i kokoši. Obje vrste pokazuju sličnu osjetljivost, vrstu simptoma i vremenski period razvijanja simptoma nakon izloženosti TOCP-u kao i čovjek. U istraživanju odgođene neurotoksičnosti primijenjena su tri osnovna kriterija za procjenu neurotoksičnosti: standardizirana klinička bihevioralna evaluacija, mikroskopsko ispitivanje tkiva centralnog i perifernog živčanog sustava te mjerenje razine NTE u mozgu ili leđnoj moždini. U tablici 1. prikazani su NOAEL za različite režime doziranja dvaju vrsta te put primjene zajedno s odgovarajućim blagim ili umjerenim učincima (10).

Tablica 1. NOAEL za tri-*o*-krezilfosfat pri različitim režimima doziranja (10).

VRSTA	UČESTALOST DOZIRANJA	DOZA (mg/kg/dan)	PRIMJENA	KRITERIJI	LIT.
mačka	jednokratno	100	dermalno	klinički, patološki, funkcija živaca/mišića	(22)
kokoš	jednokratno	35	oralno	53 % inhibicija NTE u mozgu	(23)
kokoš	jednokratno	50	oralno	klinički	(19)
mačka	jednokratno	50	oralno	klinički	(19)
kokoš	jednokratno	30	oralno	neuropsihološki, <i>n. tibialis</i> i <i>n. ischiadicus</i>	(24)
mačka	1x dne, 90 dana	0,5	dermalno	patološki, funkcija živaca/mišića	(22)
mačka	1x dne, 90 dana	1	dermalno	klinički, bez lezija	(25)
kokoš	1x dne, 90 dana	1,25	oralno	klinički, neuropatološki	(25)
kokoš	1x dne, 90 dana	2,5	oralno	klinički, neuropatološki	(26)
kokoš	3 dana primjena, 17 dana bez primjene, 3 dana primjena	10	oralno	klinički, neuropatološki	(27)
kokoš	5 dana/tjedan 6 tjedana	10	oralno	neuropatološki: 1/5 kokoši	(27)
kokoš	5 dana/tjedan 10 tjedana	10	oralno	neuropatološki: 3/10 kokoši	(27)

Za ekstrapolaciju podataka s kokoši na čovjeka korišten je faktor sigurnosti 10, a indeks osjetljivosti vrste 1. Procijenjena sigurna doza izloženosti TOCP-u za čovjeka je 2,5 mg/kg pri jednokratnom izlaganju i 0,13 mg/kg/dan pri višekratnom izlaganju (10).

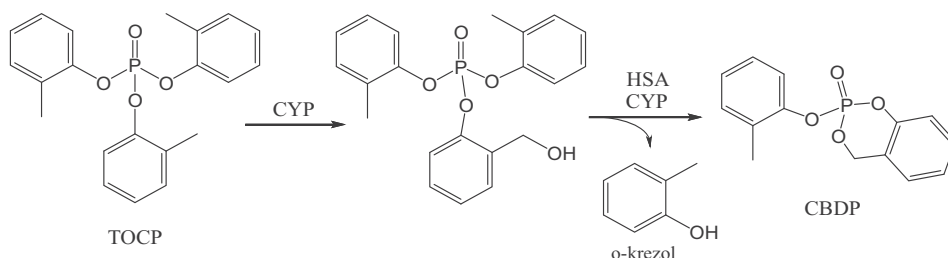
Osim štetnog učinka na ljudsko zdravlje, također zabrinjava učinak TOCP-a na okoliš. Smatra se da je opasan za okoliš i toksičan za vodene organizme. U tablici 2. prikazane su vrijednosti LC_{50} za određene vodene organizme (21).

Tablica 2. LC_{50} za vodene organizme (21).

LC_{50} (mg/L)	VRSTA
1,5 – 5,0 mg/L	slatkovodne alge
8700 mg/L	<i>Menidia peninsulae</i>
5,6 mg/L	<i>Daphnia magna</i>

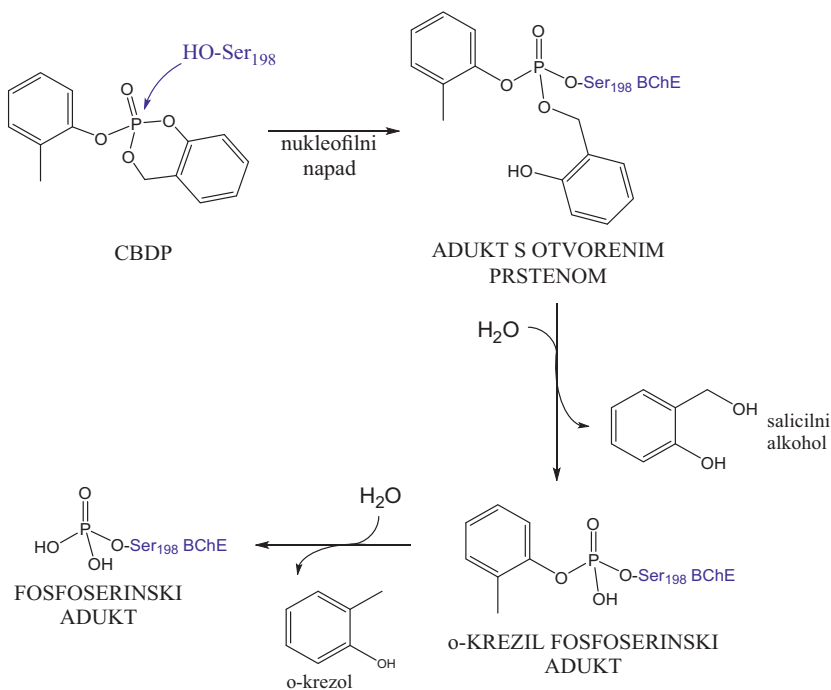
Metabolizam triarilfosfata

Toksičnost tri-*o*-krezilfosfata se povezuje s njegovim prevođenjem u CBDP (slika 2.). CBDP nastaje *in vivo* dvjema uzastopnim reakcijama: oksidacija katalizirana mikrosomalnim enzimima jetre, citokromima P450 te ciklizacija oksidiranog produkta katalizirana enzimima citokroma P450. Osim inhibicije karboksilesteraza i NTE, CBDP je ireverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). S konstantom brzine inhibicije humane BChE između 10^7 – 10^8 $M^{-1}min^{-1}$, CBDP se smatra jednim od najsnažnijih organofosfornih inhibitora BChE. Konstanta brzine inhibicije humane AChE je za red veličine manja u odnosu na BChE pa se zbog veće osjetljivosti ispituje upravo reakcija CBDP-a s BChE u traženju prikladne dijagnostičke metode za mjerenje izloženosti TOCP-u. Također se smatra da je povećana aktivnost BChE ključna u eliminaciji CBDP-a iz krvotoka i smanjenju neurotoksičnog potencijala CBDP-a (28).



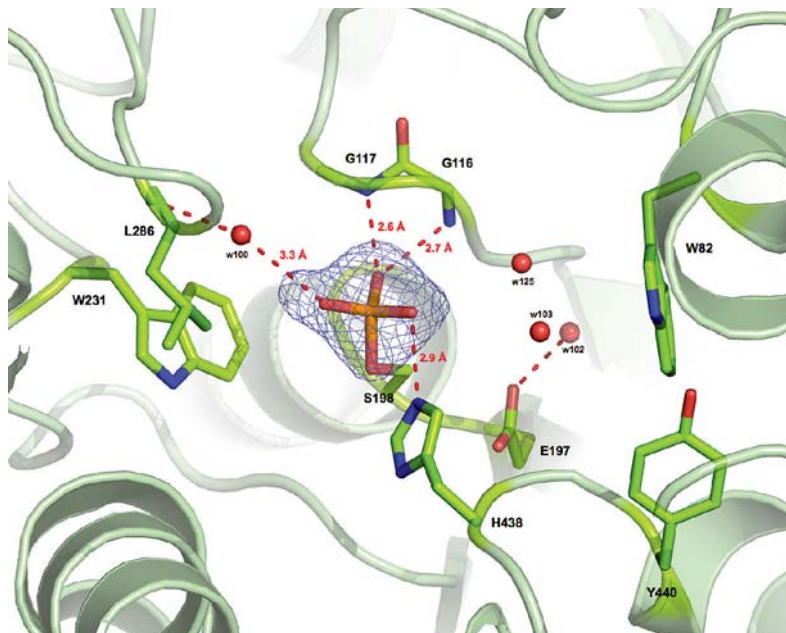
Slika 2. Biotransformacija TOCP-a u toksični CBDP.

Inhibicija humane BChE ne slijedi kinetiku prvog reda, nego se može razdvojiti na dva procesa, brži i sporiji. Nakon formiranja početnog kovalentnog adukta u aktivnom mjestu BChE vezanjem na Ser198, slijedi brza hidroliza adukta CBDP-a s otvorenim prstenom u *o*-krezilfosfoserinski adukt i oslobađanje salicilnog alkohola (saligenina). Daljnjom hidrolizom oslobađa se *o*-krezol i nastaje fosfoserinski adukt (slika 3.). Taj metabolički put potvrđen je i analizom pomoću spektrometrije masa, gdje je uočeno da inicijalni adukt s BChE mase 170 Da prelazi u adukt mase 80 Da. Kristalna struktura BChE inhibirane CBDP-om potvrđuje da je nastajanje fosfatnog adukta posljednji korak u reakcijskom mehanizmu (28).



Slika 3. Reakcijski mehanizam nastanka fosfoserinskog adukta.

U aktivnom mjestu enzima najvažnije aminokiseline koje sudjeluju u nastajanju fosfatnog adukta su Ser198, His438 i Glu197 (slika 4.). Reakcija započinje nukleofilnim napadom hidroksilne skupine Ser198 na atom fosfora CBDP-a uz istovremeno formiranje tetrahedralnog kompleksa vezanjem protona s hidroksilne skupine Ser198 na imidazolni dušik u His438. Vodikova veza Glu197 s vodom, olakšava hidrolizu i oslobađanje salicilnog alkohola. Novi nukleofilni napad vode na preostalu fosfoestersku vezu dovodi do oslobađanja *o*-krezola, a pozitivno nabijeni imidazol u His438 djeluje kao donor protona pri čemu nastaje fosfatni adukt sa Ser198.



Slika 4. Aktivno mjesto fosfoserinskog-BChE konjugata. Ugljikovi atomi su prikazani zelenom bojom, kisikovi atomi crvenom, dušikovi plavom, a fosfor narančastom. Vodikove veze su prikazane kao crvene isprekidane linije (28).

Uloga enzima citokroma P450 u bioaktivaciji TOCP-a

Mjereći aktivnost mikrosomalnih enzima P450 jetre štakora i čovjeka te rekombinantnih humanih enzima, zaključeno je da su CYP2B6, CYP2C18, CYP2D6, CYP1A2 i CYP3A4/3A5 uključeni u metabolizam TOCP-a do toksičnog CBDP-a. Koristeći različite inhibitore, uočeno je da ketokonazol kao selektivni inhibitor CYP3A i α -naftoflavon, kao selektivni inhibitor CYP1A2, uzrokuju najznačajnije smanjenje inhibicije BChE što znači da su CYP3A4/3A5 i CYP1A2 enzimi od najveće važnosti za metabolizam TOCP-a. Interindividualne razlike u aktivnosti CYP1A2 i CYP3A4 kao posljedica genetskih ili okolišnih čimbenika, određuju osjetljivost na TOCP i potencijal razvoja neurotoksičnog sindroma (29).

Iako je pretpostavljeno da ciklizaciju oksidiranog produkta do CBDP-a pridonosi serumski albumin, uočeno je da se ciklizacija odvija i bez prisutnosti humanog serumskog albumina (HSA), dok odsutnost CYP1A2 i CYP3A4 uz prisutnost HSA ne dovodi do učinkovite ciklizacije (29).

S obzirom da je moguće i transdermalno unošenje TOCP-a u organizam, potrebno je dodatno istražiti koliko cjelokupnoj toksičnosti pridonose enzimi CYP2B6 i CYP3A5 koji se nalaze u koži, a za koje je poznato da su uključeni u bioaktivaciju TOCP-a (29).

In vitro studije toksičnosti triarilfosfata

Neuropatski učinci trikrezilfosfata (TCP; mješavina svih izomera), tri-*o*-krezilfosfata (TOCP) i tri-*p*-krezilfosfata (TPCP) ispitivani su na diferencirajućim mišjim N2a neuroblastomima *in vitro*. Promatrani su preživljavanje stanica, rast aksona i razine citoskeletnih proteina nakon izlaganja staničnih ekstrakata trikrezilfosfatima. Pokazalo se da TCP inhibira rast aksona nakon 24 sata izloženosti. TCP i TOCP pokazali su slične razine kontinuirane toksičnosti nakon 24 i 48 sati izlaganja. TPCP je pokazao prolazne toksične učinke; uočljive nakon 24, no ne i nakon 48 sati izloženosti. Od svih izomera trikrezilfosfata, TOCP pokazuje najjači neuropatski učinak (30).

Toksični učinci trikrezil fosfata (TCP) također su ispitivani i na štakorskim feokromocitomalnim PC12 stanicama. PC12 stanice sadrže karakteristike nezrelih monoaminergičkih neurona. Uz to, one sintetiziraju, skladište i otpuštaju acetilkolin, sadrže acetilkolinesterazu i naširoko su korištene kao dobar model razvoja neurona. Uz trikrezilfosfat, za usporedbu je ispitivan i učinak dvaju organofosfata – trifenilfosfita i paraoksona. Rezultati su pokazali da sva tri organofosfata ispoljavaju toksično djelovanje na razini inhibicije proliferacije PC12 stanica. Od tri ispitivana organofosfata, TCP ispoljava najjače toksično djelovanje; polovična maksimalna inhibitorna koncentracija (IC_{50}) je za red veličine niža od one ostalih ispitivanih organofosfata (31).

Na uzorku od 12 putnika 12 do 48 sati nakon leta ispitana je aktivnost butirilkolinesteraze. Iako nijedan od putnika nije ispoljavao simptome toksičnosti, fosfoserinski adukti bili su pronađeni kod 6 ispitanika. Ispitivanje je bilo temeljeno na spektrometriji masa pročišćene butirilkolinesteraza iz plazme. Adukti nisu nađeni kod onih pojedinaca koji su posljednji put putovali prije više od 3 mjeseca, što dovodi do zaključka da ne postoji opasnost od toksičnosti ako osoba rijetko putuje (7).

S obzirom da CBDP stvara adukt sa Ser198 BChE, postavlja se pitanje reagira li CBDP s nekim drugim aminokiselinama, što bi upućivalo na moguće reakcije s humanim proteinima. Postojala je hipoteza da CBDP reagira s histidinom, odvajajući *o*-hidroksibenzoilni dio od početnog serinskog adukta. Kako bi se testirala ta hipoteza, provedena je analiza spektrometrijom masa CBDP-om inhibirane butirilkolinesteraze. Rezultati su pokazali postojanje *o*-hidroksibenzoilnog adukta daleko od aktivnog mjesta i nepovezanog s histidinom. No, dokazano je da slobodni *L*-histidin stvara različite adukte s CBDP-om preko dušika u imidazolnom prstenu. To upućuje na činjenicu da bi se histidin-CBDP adukti mogli stvarati na humanim proteinima (32). CBDP stvara adukte i s humanim serumskim albuminom preko tirozina, što je dokazano eksperimentom u kojem je humani serumski albumin bio tretiran CBDP-om (33).

Kako bi se utvrdilo izaziva li TOCP autofagiju u humanim neuronima te uzrokuje li na taj način neurotoksičnost, provedena su ispitivanja na ljudskim neuroblastomima stanične linije SH-SY5Y. Stanice su tretirane TOCP-om tijekom 24 sata. Western-blot analiza markera autofagije pokazala je povećan broj autofagosoma nakon tretiranja stanica TOCP-om što sugerira da TOCP inducira staničnu smrt uglavnom putem povećanog stvaranja autofagosoma te njihovog nakupljanja (17).

Iako su podaci o neurotoksičnosti tri-*o*-krezilfosfata i drugih *orto*-supstituira-nih tri-arilfosfata, o mogućoj toksičnosti drugih tri-arilfosfata se malo zna. Prilikom pokušaja pronalaska endogenih inhibitornih liganada za mišji konstitutivno aktivni receptor (CAR), koji je važan regulator gena enzima zaduženih za oksidaciju ksenobiotika i steroida, otkrivena je inhibitorna aktivnost povezana s izopropiliranim di- i tri-arilfosfatima nađenima u jetri netretiranih miševa. Ta saznanja dovela su do pitanja djeluju li takvi spojevi i na ljudske nuklearne receptore (NR). Ukoliko djeluju, moguća je pojava hormonalnih poremećaja posredovanih pojačanom aktivacijom ekspresije CYP enzima. Nuklearni receptori koji odgovaraju na ksenobiotike mogu reagirati na tri-arilfosfate. Ljudski CAR i PXR (pregnanski X receptor) aktivirani su tri-aril fosfatima, dok mišji CAR i PXR reagiraju različito što upućuju da u ljudi može doći do pojačane aktivacije ciljnih CYP2B6 i CYP3A4 gena nakon izlaganja tri-arilfosfatima. Budući da ti geni kodiraju za efektivne steroid hidroksilaze, moguće je očekivati promjenu u metabolizmu steroida kao posljedicu prolongirane izloženosti tri-arilfosfatima, ili jednokratne izloženosti velikoj dozi. Važno je napomenuti da CAR i PXR reguliraju i mnoge druge gene, ne samo one za CYP-enzime i steroid-konjugirajuće enzime, stoga je broj mogućih bioloških meta tri-arilfosfata velik. Razlike u odgovoru ljudskih i mišjih nuklearnih receptora na tri-arilfosfate su primjetne, stoga su moguće teškoće pri ekstrapolaciji podataka iz animalnih studija na ljude. Također, doze tri-arilfosfata kojima osoba može biti izložena (npr. na radnom mjestu ili tijekom putovanja zrakoplovom) poprilično su niske i nije poznato jesu li dovoljne da bi se hormonske promjene uopće pojavile (34).

In vivo studije toksičnosti triarilfosfata

Jedna od najranijih *in vivo* studija neurotoksičnog učinka trisupstituiranih fenilfosfata provedena je na peradi. Doze ispitivanih spojeva su primijenjene peroralno te se apsorpcija dokazala padom aktivnosti plazmatske kolinesteraze koja je mjerena prije, 24 sata te 4 dana nakon primjene. Rezultati su dobiveni isključivo promatranjem pilića u kojih su uočeni znaci ataksije (nemir pri stajanju te nposljedku otežane kretnje). Pilići su promatrani najmanje 21 dan, a znaci ataksije su se pojavili najranije 14 dana nakon primjene jednokratne doze. Teži oblici ataksije su obuhvaćali nepokretnost pilića kroz nekoliko dana, dok je kod blažih oblika

ataksija polako napredovala (35). Valja napomenuti kako je u ovoj studiji između ostalih spojeva istraživani i TOCP koji je glavna meta istraživanja uzroka aerotoksičnog sindroma.

Nešto kasnije *in vivo* studije su provedene konkretno za ispitivanje utjecaja TOCP-a na OPIDN (36). Cilj istraživanja je bio provjeriti promjene inducirane TOCP-om na kalmodulin kinazi II koja je eksprimirana u mozgu i odgovorna za fosforilaciju raznih citoskeletnih proteina kao što su: tubulin, s mikrotubulom povezani protein-2 (MAP-2) te tripletni proteini neurofilamena (37, 38). Upravo promjene fosforilacije navedenih proteina za posljedicu imaju razvoj odgođene neurotoksičnosti koju karakterizira demijelinizacija aksona, a klinički se očituje pojavom distalne paralize u nogama koja kasnije napreduje do spazma i ataksije (39, 40). Za ove studije su također korišteni odrasli pilići kojima je jednokratno aplicirana oralna doza TOCP-a od 750 mg/kg (36). Promatranjem tretiranih pilića, ustanovljeno je da se ataksija pojavila 7 dana nakon oralne primjene TOCP-a, a potpuna paraliza nakon 14 dana (36). Rezultati *in vitro* istraživanja su pokazali značajno povećanje aktivnosti kalmodulin kinaze II te veću fosforilaciju citoskeletnih proteina kod pilića tretiranih TOCP-om naspram kontrolne skupine (36). Također, valja naglasiti kako su se i u tretiranih pilića koji su žrtvovani prvog dana, pojavila navedena povećanja enzimske aktivnosti i fosforilacije, a pritom još nije došlo do neurotoksičnih simptoma (36). Druge studije su osim procjene fosforilacije i aktivnosti kinaza prisutnih u mozgu ispitivale i histopatološki efekt oralno primijenjenog TOCP-a na djelovanje organa središnjeg živčanog sustava, što je u konačnici rezultiralo dokazivanjem degradacije aksona, mijelina te bijele tvari (41).

In vivo istraživanje utjecaja TOCP-a na reproduktivne organe provedeno je na miševima. TOCP se miješao u hranu u količini do 0,2 % tjelesne mase. Uočeno je da dolazi do smanjenja broja novorođenih jedinki legla te mase mladunaca. Histopatološkom analizom mužjaka F_0 generacije uočeno je smanjenje mase testisa i epididimisa. Uočene su i promjene nadbubrežnih žlijezda u oba spola. U F_1 generaciji je smanjena veličina legla, a broj mrtvorodenih mladunaca je povećan. Također je uočena smanjena koncentracije pokretljivost spolnih stanica kod mužjaka (42).

In vivo ispitivanje utjecaja TOCP-a na reproduktivne organe štakora pokazala su hipertrofiju organa i akumulaciju kolesterola u intersticijskim stanicama ovarija i nadbubrežnih žlijezda u oba spola. Slične morfološke i histokemijske promjene ovarija i kore nadbubrežnih žlijezda upućuju na zaključak da se radi o sličnom mehanizmu toksičnosti. Također je uočeno smanjenje mase testisa i degeneracija sjemenovoda kod mužjaka (43). Obje studije izazivaju zabrinutost zbog potencijalne reproduktivne toksičnosti TOCP-a te su potrebna daljnja istraživanja.

Analitičke metode u dijagnostici aerotoksičnog sindroma

Dokazana izloženost putnika i posade zrakoplova TOCP-u dovela je do potrebe za razvojem prikladne analitičke metode koja će objasniti vezu između izloženosti putnika, odnosno posade zrakoplova TOCP-u i simptoma aerotoksičnog sindroma. Schopfer i sur. potvrdili su *in vitro* nastajanje stabilnog *o*-krezilfosfoserinskog adukta na Ser198 (*o*-CP-BChE) između toksičnog metabolita CDBP-a i BChE, koji se danas koristi kao specifični biomarker neposredne izloženosti TOCP-u (33, 44, 28). Rezultati *in vitro* ispitivanja ekstrapolirani su na *in vivo* uvjete te su detektirane niske koncentracije *o*-CP-BChE u krvi putnika neposredno nakon leta MALDI-TOF tehnikom kojoj je prethodila izolacija fosforiliranog adukta ionsko-izmjenjivačkom i afinitetnom kromatografijom. Budući da niti jedan ispitanik nije pokazao simptome aerotoksičnog sindroma, a u uzorcima krvi nekoliko mjeseci nakon leta nije detektiran *o*-CP-BChE, pretpostavljeno je da TCP nije toksičan za povremene putnike, međutim posada zrakoplova predstavlja visokorizičnu skupinu te je u daljnja istraživanja potrebno uključiti veći broj ispitanika, što dovodi do potrebe za razvojem automatizirane analitičke metode visokog probira (7).

Najnovije studije Schopferova i Johnsonova zamjenjuju izolaciju *o*-CP-BChE afinitetnom kromatografijom s izolacijom specifičnim monoklonskim protutijelima ili imunomagnetskom izolacijom, a detekcija se provodi spektrometrijom masa spregnutom sa spektrometrijom masa. Time je smanjeno trajanje analize i povećana osjetljivost metode, no zbog visoke cijene protutijela i složenosti samih instrumenata, opisane metode se ne mogu primijeniti u rutinskoj dijagnostici te je potraga za idealnom dijagnostičkom metodom još uvijek u tijeku (45, 46).

ZAKLJUČAK

Najvažniji uzročnik aerotoksičnog sindroma je CDBP koji nastaje bioaktivacijom TOCP-a kataliziranom enzimima citokrom P450 (CYP). Najvažniji CYP enzimi koji kataliziraju navedenu pretvorbu su CYP1A2 i CYP3A4. Neurotoksičnost CDBP-a potvrđena je *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima na humanim te animalnim modelima, dok je genotoksičnost potvrđena samo *in vitro*. Neurotoksični potencijal CDBP-a ovisi i o interindividualnim razlikama u aktivnosti CYP enzima koje su posljedica genetskih i okolišnih faktora, a pretpostavlja se da se može smanjiti povećanjem aktivnosti BChE.

Posebno zabrinjavaju podaci o potencijalu reproduktivne toksičnosti dobiveni *in vivo* ispitivanjima na glodavcima, zbog čega su potrebna dodatna istraživanja. S namjerom povećanja sigurnosti članova posade i putnika intenzivno se radi na razvijanju prikladne analitičke metode kojom bi se mogla rutinski pratiti izloženost TOCP-u i u konačnici spriječiti negativan učinak na ljudsko zdravlje.

The role of cytochrome P450 in aerotoxic syndrome

L. Hok, A. Akrap, F. J. Marelja, S. Morić, M. Parlov, M. Bojić

Abstract

Aerotoxic syndrome is a set of acute (gastrointestinal, respiratory, irritation) and chronic (mostly neurological) symptoms of rising importance due to the increase in the frequency of air transport use caused by globalization. It represents great danger affecting health of passengers and crew members. It is assumed to be caused by exposure to tricresylphosphate, a compound found in engine oils used in aircrafts. This article presents an overview of *in vivo* and *in vitro* research on toxicity of tricresylphosphates.

Literatura – References

1. Hrvatska agencija za civilno zrakoplovstvo. Zrakoplovna medicina. 2014. http://www.ccaa.hr/hrvatski/opcenito_276/, datum pristupa: 6.10.2017.
2. Guyton A C, Hall J E. Medicinska fiziologija. Zagreb. Medicinska naklada. 2006; 537–539.
3. http://friedmanrubin.com/wp-content/uploads/2016/04/plane_3.png, datum pristupa: 7.10.2017.
4. Winder C. Hazardous chemicals on jet aircraft: case study – jet engine oils and aerotoxic syndrome. *Curr Top Toxicol*. 2006; 3:65–88.
5. Furlong CE. Exposure to triaryl phosphates: metabolism and biomarkers of exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011. 256:337–347.
6. Cox L, Michaelis S. A survey of health symptoms in BAe 146 aircrew. *J Occup Health Safety*. 2002; 18:305–331.
7. Liyasova M, Li B, Schopfer LM, Nachon F, Masson P, Furlong CE, Lockridge O. Exposure to tri-o-cresyl phosphate detected in jet airplane passengers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 256:337–347.
8. Morgan JP, Tulloss TC. The Jake walk blues: a toxicologic tragedy mirrored in American popular music. *Ann Intern Med* 1976; 85:804–808.
9. Woolf AD. Ginger Jake and the blues: a tragic song of poisoning. *Vet Hum Toxicol*. 1995; 37:252–254.
10. Craig PH, Barth ML. Evaluation of the hazards of industrial exposure to tricresyl phosphate: a review and interpretation of the literature. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 1999; 2:281–300.
11. Inoue N, Fujishiro K, Mori K, Matsuoka M. Triorthocresyl phosphate poisoning – a review of human cases. *J UOEH*. 1988; 10:433–442.
12. Timbrell JA. *Principles of Biochemical Toxicology*, London: Informa Healthcare, 2009.
13. Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1981; 21:511–548.
14. Weiner ML, Jortner BS. Organophosphate-induced delayed neurotoxicity of triarylphosphates. *Neurotoxicology*. 1999; 20:653–673.
15. Glynn P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1736:87–93.

16. Abou-Donia MB. Involvement of cytoskeletal proteins in the mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995; 22:358–359.
17. Xu HY, Wang P, Sun YJ, Jiang L, Xu MY, Wu YJ. Autophagy in Tri-o-cresyl Phosphate-Induced Delayed Neurotoxicity. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016; 0:1–9.
18. Cavanagh JB. The significance of the »dying back« process in experimental and human neurological disease. *Int Rev Exp Pathol*. 1964; 3:219–267.
19. Henschler D. Tricresylphosphate poisoning; experimental clarification of problems of etiology and pathogenesis. *Klin Wochenschr*. 1958; 36:663–674.
20. De Nola G, Kibby J, Mazurek W. Determination of ortho-cresyl phosphate isomers of tricresyl phosphate used in aircraft turbine engine oils by gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008; 1200:211–216.
21. Van der Veen I, de Boer J. Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere*. 2012; 88:1119–1153.
22. Abou-Donia MB, Trofatter LP, Graham DG, Lapadula DM. Electromyographic, neuropathologic and functional correlates in the cat as the result of tri-o-cresyl phosphate delayed neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986; 83:126–141.
23. Dudek BR. Brain and leukocyte neurotoxic esterases as biomonitors of organophosphorus delayed neurotoxicity. 1979. Doktorski rad, Sveučilište u Michiganu, Ann Arbor.
24. Robertson DG, Schwab BW, Sills RD, Richardson RJ, Anderson RJ. Electrophysiologic changes following treatment with organophosphorus-induced delayed neuropathy-producing agents in the adult hen. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1987; 87:420–429.
25. Prentice DE, Majeed SK. A subchronic study (90 day) using multiple dose levels of trio-cresyl phosphate (TOCP): Some neuropathological observations in domestic hens. *Neurotoxicology*. 1983; 4:277–282.
26. Johannsen FR. Evaluation of delayed neurotoxicity and dose-response relationships of phosphate esters in the adult hen. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1977; 41:291–304.
27. Freudenthal RI, Rausch L, Gerhart JM, Barth ML, Mackerer CR, Singer EC. Subchronic neurotoxicity of oil formulations containing either tricresyl phosphate or tri-o-cresyl phosphate. *J Am Coll Toxicol*. 1993; 12:409–416.28. Carletti E, Schopfer LM, Colletier JP, Froment MT, Nachon F, Weik M, Lockridge O, Masson P. Reaction of cresyl saligenin phosphate, the organophosphorus agent implicated in aerotoxic syndrome, with human cholinesterases: mechanistic studies employing kinetics, mass spectrometry, and X-ray structure analysis. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24:797–808.
29. Reinen J, Nematollahi L, Fidder A, Vermeulen NP, Noort D, Commandeur JN. Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of tri-ortho-cresyl phosphate (ToCP). *Chem Res Toxicol*. 2015; 28:711–721.
30. Fowler MJ, Flaskos J, McLean WG, Hargreaves AJ. Effects of neuropathic and non-neuropathic isomers of tricresyl phosphate and their microsomal activation on the production of axon-like processes by differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 2001; 76:671–678.
31. Flaskos J, McLean WG, Hargreaves AJ. The toxicity of organophosphate compounds towards cultured PC12 cells. *Toxicol Lett*. 1994; 70:71–76.
32. Liyasova MS, Schopfer LM, Lockridge O. Cresyl saligenin phosphate makes multiple adducts on free histidine, but does not form an adduct on histidine 438 of human butyrylcholinesterase. *Chem Biol Interact*. 2013; 203:103–107.

33. Schopfer LM, Furlong CE, Lockridge O. Development of diagnostics in the search for an explanation of aerotoxic syndrome. *Anal Biochem.* 2010; 404:64–74.
34. Honkakoski P, Palvimo JJ, Penttilä L, Vepsäläinen J, Auriola S. Effects of triaryl phosphates on mouse and human nuclear receptors. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67:97–106.
35. Aldridge WN, Barnes JM. Neurotoxic and biochemical properties of some triaryl phosphates. *Biochem Pharmacol.* 1961; 6:177–178.
36. Lapadula ES, Lapadula DM, Abou-Donia MB. Persistent alterations of calmodulin kinase II activity in chickens after an oral dose of tri-*o*-cresyl phosphate, *Biochem Pharmacol.* 1991; 42:171–180.
37. Schuiman H. The multifunctional Ca²⁺/calmodulin – dependent protein kinase. In: *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* (Ur. Greengard P, Robison GA) 1988; 22:39–112.
38. Vallano ML, Goldenring JR, Lasher RS, DeLorenzo RJ. Association of calcium/calmodulin-dependent kinase with cytoskeletal preparations: Phosphorylation of tubulin, neurofilament, and microtubule-associated proteins. *Ann NY Acad Sci.* 1986; 466:357–374.
39. Patton SE, Lapadula DM, O'Callaghan JP, Miller DB, Abou-Donia MB. Changes in *in vitro* brain and spinal cord protein phosphorylation after a single oral administration of tri-*o*-cresyl phosphate to hens. *J Neurochem.* 1985; 45:1567–1577.
40. Patton SE, Lapadula DM, Abou-Donia MB. Relationship of tri-*o*-cresyl phosphate-induced delayed neurotoxicity to enhancement of *in vitro* phosphorylation of hen brain and spinal cord proteins. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 239:597–605.
41. Mackerer CR, Barth ML, Krueger AJ, Chawla B, Roy TA. Comparison of neurotoxic effects and potential risks from oral administration or ingestion of tricresyl phosphate and jet engine oil containing tricresyl phosphate. *J Toxicol Environ Health A.* 1999; 57:293–328.
42. Chapin RE, George JD, Lamb JC 4th. Reproductive toxicity of tricresyl phosphate in a continuous breeding protocol in Swiss (CD-1) mice. *Fundam Appl Toxicol.* 1988; 10:344–354.
43. Latendresse JR, Brooks CL, Capen CC. Pathologic effects of butylated triphenyl phosphate-based hydraulic fluid and tricresyl phosphate on the adrenal gland, ovary, and testis in the Fischer-344 rat. *Toxicol Pathol.* 1994; 22:341–352.
44. Kim JH, Stevens RC, MacCoss MJ, et al. Identification and Characterization of Biomarkers of Organophosphorus Exposures in Humans. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 660:61–71.
45. Schopfer LM, Masson P, Lamourette P, Simon S, Lockridge O. Detection of cresyl phosphate-modified butyrylcholinesterase in human plasma for chemical exposure associated with aerotoxic syndrome. *Anal Biochem.* 2014; 0:17–26.
46. Johnson D, Carter MD, Crow BS, Isenberg SL, Graham LA, Erol HA, Watson CM, Pantazides BG, van der Schans MJ, Langenberg JP, Noort D, Blake TA, Thomas JD, Johnson RC. Quantitation of ortho-cresyl phosphate adducts to butyrylcholinesterase in human serum by immunomagnetic-UHPLC-MS/MS. *J Mass Spectrom.* 2015; 50:683–692.

Primljeno 11. listopada 2017.