

Review

ORGANOFOSFORNI SPOJEVI: KLASIFIKACIJA I REAKCIJE S ENZIMIMA

Anita BOSAK

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljeno u svibnju 2006.

Prihvaćeno u rujnu 2006.

Organofosforne spojevi su derivati fosfatne, fosfonske ili fosfinske kiseline kod kojih atomi kisika, vezani neposredno na atom fosfora, mogu biti zamijenjeni atomima sumpora ili dušika. Ti spojevi čine veliku skupinu organskih spojeva koji se rabe ponajprije kao pesticidi, neki se rabe kao lijekovi, a najtoksičniji spojevi su živčani bojni otrovi. Glavni uzrok akutne toksičnosti organofosforne spojeva je inhibicija acetilkolinesteraze, ključnog enzima u prijenosu živčanog impulsa. Organofosforne spojevi koji imaju sumpor vezan koordinatno-kovalentnom vezom na atom fosfora nisu inhibitori acetilkolinesteraze. Da bi ti spojevi postali biološki aktivni, moraju spontanom reakcijama ili u reakcijama biotransformacije prijeći u svoje oksoanaloge. U reakcijama biotransformacije organofosforne spojeva može doći do transformiranja netoksičnih organofosforne spojeva u toksične ili pretvorbe jednog toksičnog spoja u drugi, ili do pretvorbe toksičnih organofosforne spojeva u spojeve koji više nisu inhibitori acetilkolinesteraze.

U radu je prikazana klasifikacija organofosforne spojeva koja se zasniva na prirodi supstituenata koji su vezani neposredno na središnji atom fosfora. Nadalje, u radu su opisani enzimi koji reagiraju s organofosforne spojevima uz primjere reakcija koje ti enzimi kataliziraju.

KLJUČNE RIJEČI: *esteraze fosforne triestera, glutation S-transferaze, monooksigenaze, serinske esteraze*

Organofosforne (OP) spojevi rabe se ponajprije kao pesticidi (herbicidi, insekticidi, fungicidi, akaricidi i nematocidi). Iako je razvoj sintetičkih piretroida i karbamata smanjio uporabu OP pesticida, oko 80 OP pesticida još je u uporabi (1). Američka agencija za zaštitu okoliša (US EPA) odobrava uporabu oko 40 OP pesticida (2). U Hrvatskoj je u uporabi dvadesetak OP pesticida (3), koji su također na listi spojeva koje odobrava US EPA. Osim navedene uporabe, neki OP spojevi rabe se i kao lijekovi (metrifonat, ekotiofat). OP spojevi su toksični, a najtoksičniji među njima su živčani bojni otrovi (sarin, soman, tabun, VX). Glavni uzrok akutne toksičnosti OP spojeva je inhibicija acetilkolinesteraze, ključnog enzima u prijenosu živčanog impulsa. Radi sigurnosti rukovanja i sprečavanja akcidenata potrebno je dobro poznavanje mehanizma toksičnosti te putova razgradnje OP

spojeva u organizmu sisavaca i u okolišu. U ovom su radu opisane kemijske reakcije OP spojeva koje se zbivaju spontano ili su enzimski katalizirane.

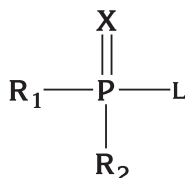
Razvoj kemije OP spojeva započeo je krajem 19. stoljeća kada je J. L. Lassaigne u reakciji alkohola i fosforne kiseline dobio trietil-fosfat. Prvi OP spoj koji je upotrijebljen kao insekticid bio je tetraetilpirofosfat (TEPP) sintetiziran 1854. (Ph. de Clermont). Mogućnosti TEPP-a kao insekticida prepoznao je G. Schrader osamdeset godina kasnije. Otkriće fosforne tioestera (M. Cleoz, 1847.), konverzija dialkilnih fosfita u dialkilne alkilfosfonate (C. A. A. Michaelis i Th. Becker, 1897.) i sinteza fosforoamidnih klorida (C. A. A. Michaelis, 1903.) dali su novi poticaj razvitku OP spojeva. Visoku toksičnost pojedinih OP spojeva uočili su W. Lange i G. von Kruger 1932. To otkriće ubrzo je dovelo do sinteze živčanih bojnih

otrova tabuna i sarina te parationa (G. Schrader, 1937.), diizopropil-fosforofluorida (DFP-a; B. C. Saunders, 1941) i somana (A. Riser, 1944). Godine 1941. E. Gross i suradnici uočili su antikolinesterazno djelovanje DFP-a. Iste godine sintetiziran je i OMPA, sistemski insekticid. Zajedničko svojstvo prvih OP insekticida bila je i visoka toksičnost prema sisavcima. Daljnji razvitak OP insekticida doveo je do spojeva koji su mnogo manje toksični čime su OP spojevi ubrzo postali vodeća klasa spojeva među insekticidima. Detaljniji opis povijesnog razvoja kemije OP spojeva prikazan je u mnogim publikacijama (npr. ref. 4 i 5).

U organizmu sisavaca i drugih vrsta OP spojevi prolaze kroz mnoge biotransformacije koje će u ovom radu biti opisane ovisno o strukturi OP spojeva i katalitičkim svojstvima enzima koji kataliziraju te reakcije.

KLASIFIKACIJA OP SPOJEVA

Opću strukturu OP spoja predložio je G. Schrader koji je sustavnom sintezom i ispitivanjem mnogih OP pesticida uočio povezanost njihove biološke aktivnosti s njihovom strukturom (slika 1). OP spojevi su esteri, anhidridi ili halogenidi potpuno supstituirane fosforne, fosfonske ili fosfinske kiseline. Kod tih spojeva središnji atom fosfora mora biti peterovalentan, kisik ili sumpor moraju biti koordinatno-kovalentnom vezom vezani na peterovalentni fosfor (obično se ta veza prikazuje kao dvostruka), R_1 i R_2 mogu biti alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, ariloksi-, mono- ili dialkil-aminogrupe. U reakciji hidrolize (spontane ili enzimske) odcjepljuje se ona skupina čija je veza s fosforom najslabija (izlazna skupina L; slika 1). OP spojevi koji imaju slobodnu hidroksilnu skupinu (-OH) nisu biološki aktivni i ne inhibiraju acetilkolinesterazu. Ni OP spojevi koji umjesto kisika, vezanog na središnji atom fosfora, imaju atom sumpora nisu inhibitori acetilkolinesteraze.



X: O ili S

R_1, R_2 : alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, ariloksi-, mono- ili dialkil- amino skupine

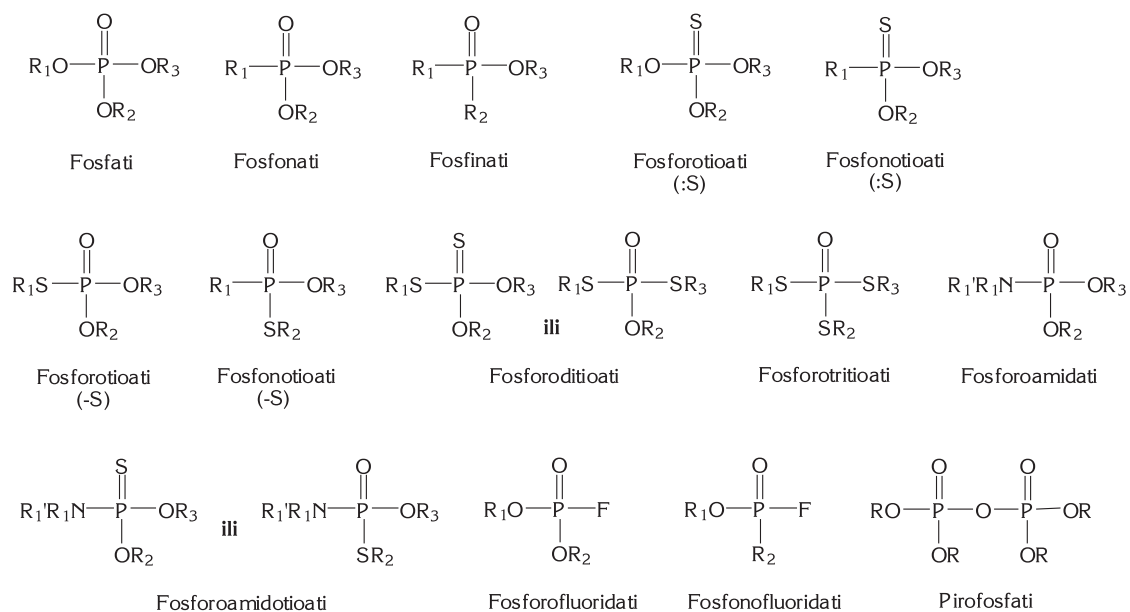
L: -F, -CN, -SR₃, -OR₃

Slika 1 Opća formula organofosforinih spojeva

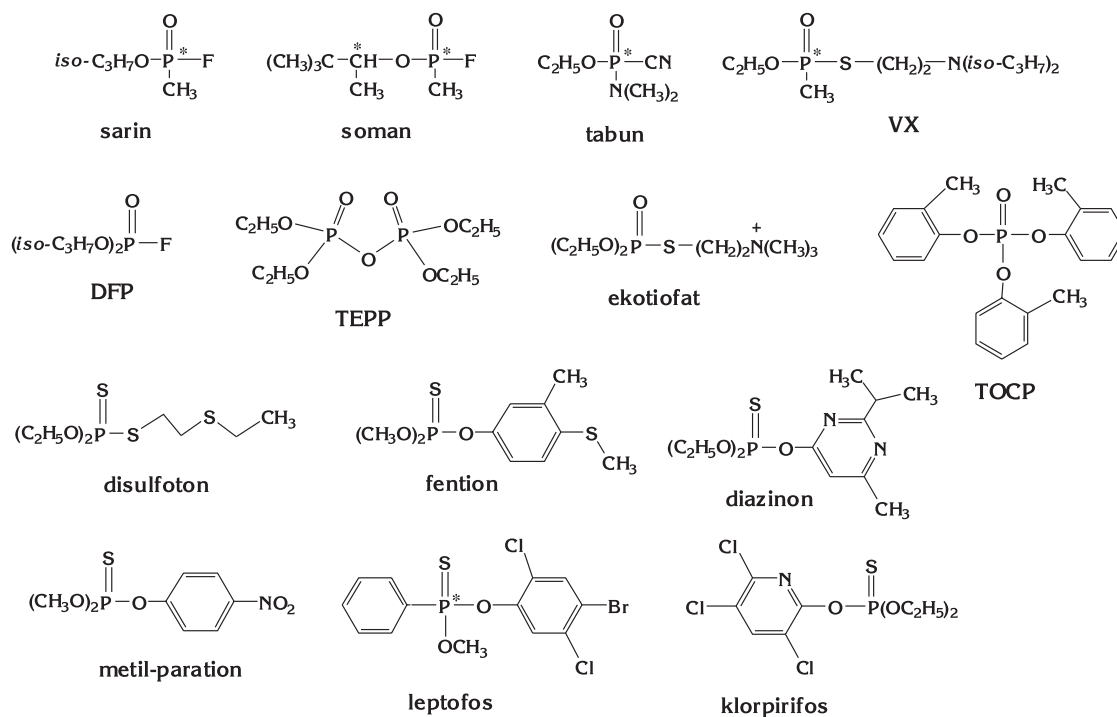
Da bi postali inhibitori acetilkolinesteraze, ti spojevi moraju prijeći u svoje oksoanaloge.

U ovom su prikazu OP spojevi podijeljeni s obzirom na prirodu supstituenata koji okružuju središnji atom fosfora (usp. 6, usp. 7). Prema takvoj podjeli OP spojeve je moguće podijeliti u 32 skupine (usp. 6). Međutim, prema toj podjeli sve OP spojeve koji se trenutačno rabe moguće je podijeliti u 14 skupina koje su prikazane na slici 2. Fosfati, fosfonati i fosfinati su derivati fosforne, fosfonske i fosfinske kiseline kod kojih je središnji atom fosfora okružen samo atomima kisika; fosfortioati, fosfonotioati, fosforoditioati i fosfortritioati derivati su kod kojih je jedan ili više atoma kisika zamijenjen atomima sumpora; fosforoamidati su derivati kod kojih je jedan atom kisika zamijenjen atomom dušika, a fosforoamidotioati su derivati kod kojih su atomi kisika zamijenjeni sumporom i dušikom. Na slici 2. prikazane su i grupe OP spojeva kod kojih je jedna od -OR skupina zamijenjena atomom fluora (fosforofluoridati i fosfonofluoridati). Takvu strukturu imaju živčani bojni otrovi sarin, soman i DFP te neki pesticidi. Živčani bojni otrov VX je fosfonat kod kojega je izlazna skupina -SR, dok tabun spada u skupinu fosfata jer je ugljikov atom, iako vezan direktno na atom fosfora, dio cijanoskupine, koja je kemijski sličnija halogenidima, hidroksi ili alkoksiskupinama (slika 3) (8). Na slici 2 prikazani su i anhidridi fosforne kiseline (pirofosfati).

Atom sumpora može biti vezan na središnji atom fosfora ili koordinatno-kovalentnom (:S) ili esterskom vezom (-S). U oba slučaja ti spojevi spadaju u skupinu fosfortioata ili fosfonotioata (slika 2). U literaturi starijeg datuma položaj atoma sumpora određivao se uporabom sufiksa -tionat za vezanje sumpora koordinatno-kovalentnom vezom i sufiksa -tiolat za vezanje sumpora esterskom vezom (5, 9). Literatura novijeg datuma takav način određivanja položaja atoma sumpora u molekuli uglavnom napušta. Položaj atoma sumpora se, prema preporukama IUPAC-ove nomenklature, određuje uporabom O- i S- prefiksa prije imena supstituenata (10, 11). Tako se npr. klasa (Me-O)₃P(:S) imenuje O,O,O-trimetil-fosfortioat, dok se klasa (Me-O)₂P(:O)-S-Me imenuje O,O,S-trimetil-fosfortioat. Kod imenovanja fosfonata i fosfonotioata ime supstituenta na P-C vezi uključeno je kao jedna riječ zajedno s korijenskim imenom. Stoga je (Me-O)₂P(:O)-Me dimetil-metilfosfonat, dok se (Me-O)₂P(:S)-Et naziva O,O-dimetil-etilfosfonotioat. Kod fosfata, fosfonata i fosforoamidata kod kojih ni jedan atom kisika nije supstituiran atomom sumpora, sufiks O- se ispušta (6, 10).



Slika 2 Strukture organofosforinih spojeva klasificiranih prema prirodi atoma koji okružuju središnji atom fosfora (6, 7, 11). Oznaka (:S) znači da je sumpor na središnji atom fosfora vezan koordinatno-kovalentnom vezom, a oznaka (-S) da je vezan esterskom vezom



Slika 3 Strukture i trivijalna imena nekih organofosforinih spojeva koji se spominju u tekstu. * označava kiralni centar molekule

Međutim, paralelno s predstavljenoj klasifikacijom (slika 2) i nomenklaturom OP spojeva vrlo je česta uporaba ili trivijalnih ili komercijalnih imena (slika 3). U hrvatskom jeziku u uporabi su imena pesticida i živčanih bojnih otrova nastala fonetskim pisanjem njihovih trivijalnih ili komercijalnih imena

pisanih na engleskom jeziku (hrv. paration od engl. "parathion").

Neki OP spojevi su kiralne molekule, tj. optički su aktivni. U tu skupinu OP spojeva spadaju svi živčani bojni otrovi (sarin, soman, tabun, VX; slika 3), za koje se zna da njihovi enantiomeri imaju različitu toksičnost

(usp.12) te nekoliko OP pesticida (npr. leptofos i fonofos; slike 3 i 9, shema b). Međutim, kiralni OP pesticidi rabe se kao racemati.

TOKSIČNOST OP SPOJEVA I NJIHOVA DETOKSIKACIJA HIDROLIZOM

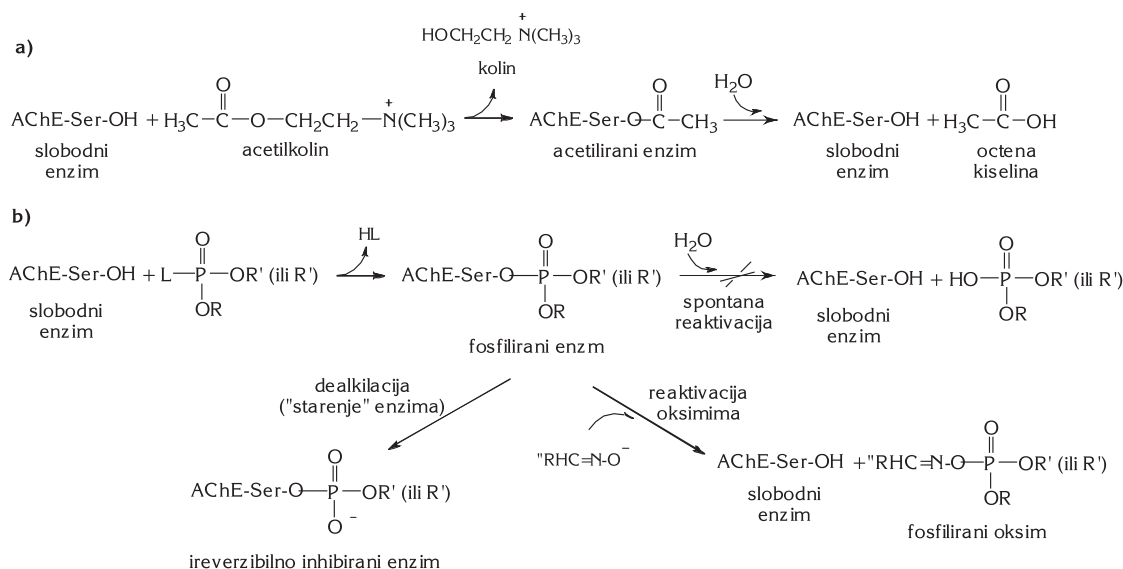
S OP spojevima reagiraju dvije skupine esteraza kojima je zajedničko da djeluju na istoj esterskoj ili halogenidnoj vezi, ali bitno različitim mehanizmima djelovanja. Jednu skupinu esteraza čine serinske esteraze, tj. esteraze koje u aktivnom centru imaju serin. U tu skupinu esteraza ubrajaju se acetilkolinesteraza (AChE; EC 3.1.1.7), butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.8), esteraza povezana s neuropatskim djelovanjem OP spojeva (engl. "neuropathy target esterase", NTE; EC 3.1.1.5) (13) i karboksilesteraza (CaE; EC 3.1.1.1) (14). OP spojevi su inhibitori serinskih esteraza. Drugu skupinu esteraza čine esteraze fosforinih triestera (EC 3.1.8) (14). Biološki supstrati tih esteraza nisu poznati. Hidrolaze fosforinih triestera (kratica PTH, od engl. "phosphoric triester hydrolases") jesu arildialkilfosfataze (EC 3.1.8.1; paraoksonaze (PON)) i diizopropil-fluorofosfataza (EC 3.1.8.2; DFP-aze) (14). U uporabi su najčešće imena koja su ti enzimi dobili s obzirom na njihove karakteristične *in vitro* supstrate: paraokson, odnosno diizopropil-fosforofluoridat (DFP). OP spojevi su supstrati hidrolaza fosforinih triestera.

Acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE)

Fiziološka funkcija AChE je hidroliza acetilkolina, prijenosnika živčanog impulsa u sinapsama, čime se omogućava normalan prijenos impulsa u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama. Ako je hidroliza acetilkolina inhibirana, dolazi do njegova nakupljanja na postsinaptičkoj membrani čime je onemogućen prolaz sljedećega živčanog impulsa. Osim u sinapsama, AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite, ali njezina uloga na eritrocitima za sada nije poznata (usp. 15).

BChE je prisutna u gotovo svim tkivima i u krvi. Njezina fiziološka uloga za sada nije poznata, ali neki pokusi na životinjama kojima nedostaje AChE pokazali su da taj enzim može djelomično zamijeniti aktivnost AChE (16).

Mehanizam hidrolize acetilkolina acetilkolinesterazom prikazan je na slici 4. Prvi korak u hidrolizi predstavlja acetiliranje serina u aktivnom centru enzima (slika 4, shema a). Acetilirani enzim se zatim hidrolizira pri čemu nastaju slobodni enzim i octena kiselina. Mehanizam interakcije acetilkolinesteraze i OP spojeva analogan je tom mehanizmu (17); kod OP spojeva prvi je korak fosfiliranje enzima (skupni naziv za fosforiliranje, fosfoniliranje i fosfiniliranje) (slika 4, shema b). Razlika između hidrolize acetilkolina (slika 4, shema a) i hidrolize OP spojeva (slika 4, shema b) jest u brzini reakcije s vodom, jer je deacetiliranje enzima puno brže od defosfiliranja. Defosfiliranje enzima, koje se često naziva i spontanom reaktivacijom,



Slika 4 Mehanizam interakcije acetilkolinesteraze (AChE) sa supstratom acetilkolinom (a) i s organofosforinim spojem (b). R i R' mogu biti alkil-, alkoksi-, alkiltio-, odnosno mono- ili dialkil aminogrupe. L je izlazna skupina

sporo je a kod nekih spojeva i ne postoji (slika 4, shema b). Reaktivacija je brža s oksimima, koji su puno jači nukleofili od vode (17) (slika 4, shema b). Produkti hidrolize OP spojeva više nisu inhibitori acetilkolinesteraze. Osim reaktivacije, kod fosfilirane kolinesteraze može doći i do dealkilacije jedne alkoksiskupine na fosforu, čime fosfilirani enzim dobiva negativan naboj koji vodi ili oksimima onemogućava nukleofilni napad te takav enzim ostaje ireverzibilno inhibiran (slika 4, shema b).

AChE i BChE su toksikološki bitni enzimi jer predstavljaju biomarkere izloženosti OP spojevima, a mjerenje njihove aktivnosti u krvi pokazuje stupanj apsorpcije tih spojeva u organizmu (18).

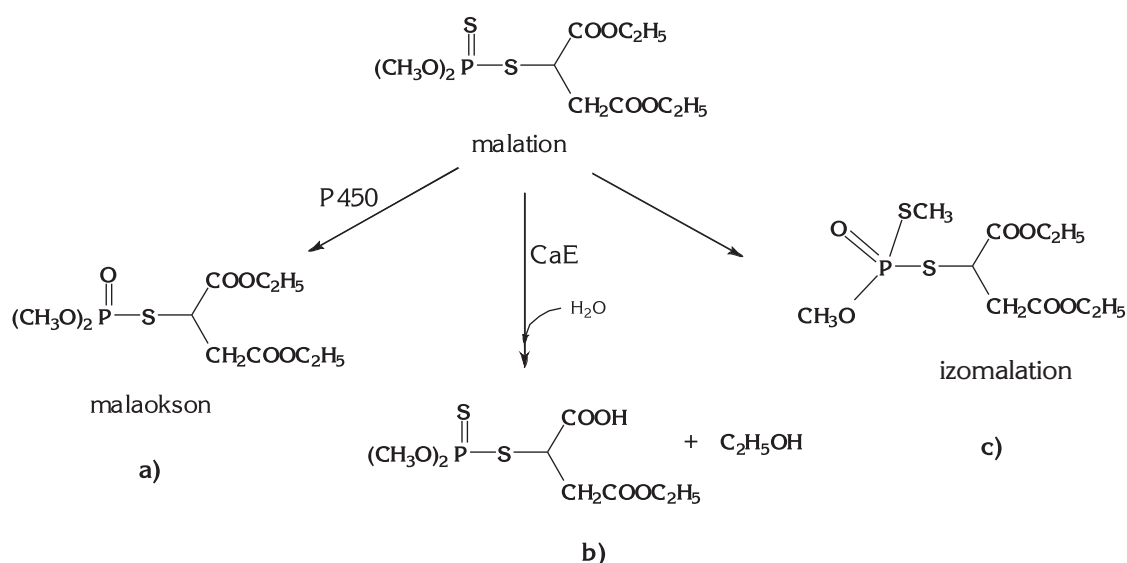
Esteraza povezana s neuropatskim djelovanjem OP spojeva (NTE)

Osim akutne toksičnosti, neki OP spojevi uzrokuju i "odgođenu" neuropatiju (kratica OPIDN, od engl. "organophosphate induced delayed neuropathy"). Simptomi "odgođene" neuropatije su neurodegenerativni poremećaj karakteriziran gubitkom osjetila i ataksijom te degeneracija osjetilnih i motoričkih aksona (19) koja se javlja oko dva tjedna nakon akutne toksičnosti koja može, ali i ne mora biti izražena. Pojava OPIDN-a praćena je inhibicijom NTE, čija fiziološka funkcija još nije utvrđena (9, 19-21). OP spojevi jesu inhibitori NTE, međutim nastajanje OPIDN-a ovisi o prirodi OP spoja kovalentno vezanog na serin u aktivnome mjestu enzima (6, 22). Za nastajanje OPIDN-a je nužno da fosfilirani enzim podliježe procesu "starenja" (usp. slika 4, shema

b). Klinički znakovi OPIDN-a su prvi put uočeni još 1930. god. kada je nekoliko tisuća ljudi pokazivalo znakove ataksije i slabosti u ekstremitetima nakon konzumacije alkoholnog pića "Ginger Rogers" koje je bilo kontaminirano tri(*o*-krezil)-fosfatom (TOCP) (slika 3). Trovanja tim spojem zabilježena su i kasnije u Europi, Africi i Aziji (19). Istraživanja rađena na kokošima i miševima pokazala su da se OPIDN ne javlja kod mladih životinja, nego samo kod odraslih (20, 23). NTE iz mozga kokoši i ljudi imaju slična katalitička svojstva, pa stoga NTE iz kokošjeg mozga predstavljaju model za ispitivanje OPIDN-a kod ljudi (6, 24). Za desetak OP spojeva je poznato da uzrokuju nastajanje OPIDN-a kod ljudi (npr. TOCP, DFP, leptofos, klorpirifos) (6).

Karboksilesteraza (CaE)

CaE katalizira hidrolizu estera i tioestera ili amidnih skupina karboksilnih kiselina (16), dok je njezin fiziološki supstrat vjerojatno *O*-acetilsijalična kiselina (usp. 25). Kako su CaE serinske esteraze, njih OP spojevi inhibiraju mehanizmom analognim inhibiciji acetilkolinesteraze (slika 4, shema b). Međutim, inhibicija CaE OP spojevima kod ljudi ne uzrokuje toksične efekte. Fosfilirana CaE je manje stabilna od fosfilirane acetilkolinesteraze i brzo se spontano reaktivira. OP spojevi koji u svojoj strukturi imaju karboksilnu estersku vezu, CaE može detoksicirati jer hidrolizom nastaje slobodna -OH skupina pa taj spoj također više nije acetilkolinesterazni inhibitor (7). Primjer takvog spoja je malation (slika 5, shema b). CaE može hidrolizirati i njegov oksoanalog (9).



Slika 5 Reakcije malationa: a) oksidativna desulfuracija katalizirana mikrosomskom P-450 monoooksigenazom (P450), b) hidroliza katalizirana karboksilesterazom (CaE) (6, 9) i c) intramolekularno transmetiliranje u izomalation (4, usp. 6)

Hidrolaze fosfornih triestera (PTH)

Ovi su enzimi pronađeni u mnogim organizmima uključujući sisavce, glavonošce, insekte, biljke i mikroorganizme. Enzimi iz različitih vrsta međusobno se razlikuju po specifičnosti prema OP spojevima te stabilnosti i molekularnoj masi enzima (usp. 26). PTH za svoju katalitičku aktivnost zahtijevaju dva dvovalentna kationa: jedan koji sudjeluje u katalizi, a drugi koji stabilizira konformaciju enzima (27, 28). Ovisno o organizmu iz kojeg je enzim izoliran, kationi mogu biti Ca, Zn, Mg ili drugi (usp. 27, usp. 28, 29).

Paraoksonaza (PON) sisavaca kodirana je trima genima: *PON1*, *PON2* i *PON3*. Najbolje proučen član te porodice je humana paraoksonaza (PON1) koja u svom aktivnome mjestu ima dva Ca^{2+} iona (28). Fiziološki supstrat PON1 nije poznat, ali se zna da hidrolizira arilestere kao što je fenil-acetat, karbamate, cikličke karbonate i laktone te mnoge OP spojeve (npr. paraokson, klorpirifos okson, diazokson) (slika 6) (30).

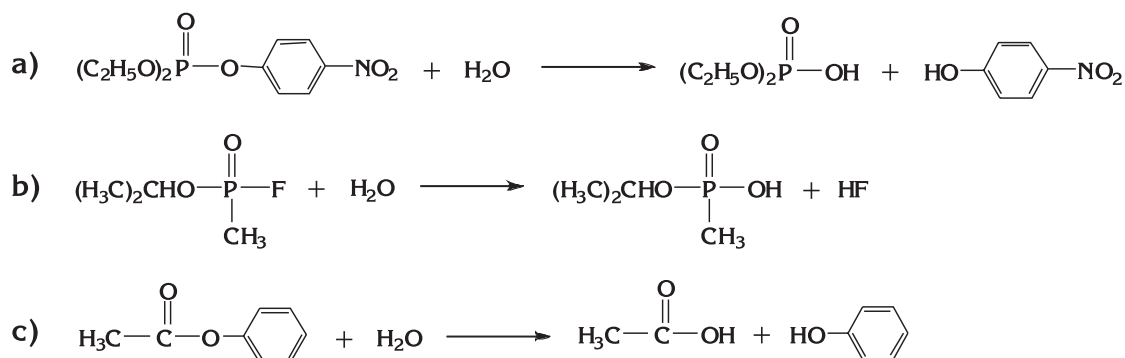
Kako PON1 hidrolizira i živčane bojne otrove soman, sarin i tabun (30, usp. 31), taj enzim predstavlja biomarker osjetljivosti na otrovanje OP spojevima. U ljudskoj populaciji serumska PON1 postoji u više varijanata o kojima ovisi specifičnost prema supstratima ili koncentracija enzima (32). PON1 s glutaminom (Gln) na položaju 192 predstavlja varijantu s niskom aktivnošću prema paraoksonu, dok arginin (Arg) na tom položaju predstavlja varijantu s visokom aktivnošću (33-35). Distribucija Gln192Arg varijanata je etnički ovisna; kod europskih populacija je dominantnija Gln192 varijanta (53 %) (34). Pokusi na životinjama pokazali su da PON1 utječe na toksičnost OP spojeva ovisno o spoju i o koncentraciji PON1 u organizmu (usp. 1, 36). S koncentracijom PON1 povezana su dva polimorfizma: zamjena leucina (Leu) na položaju 55 s metioninom (Met) (Met55 predstavlja

varijantu s nižom koncentracijom enzima) (usp. 1) te polimorfizam na 5'-regulatornoj regiji gdje je cistein (Cys) na položaju -108 zamijenjen treoninom (Thr) (Thr-108 predstavlja varijantu s nižom koncentracijom enzima) (35, 32). Kod određivanja PON1 statusa, radi određivanja osoba koje su potencijalno osjetljivije na otrovanje OP spojevima i neke kardiovaskularne bolesti, utvrđuje se postojanje polimorfizama na položaju 192, 55 i -108 da bi se odredile osobe s niskom paraoksonaznom aktivnošću enzima te osobe s niskom koncentracijom enzima (1, 32).

Diizopropil-fluorofosfataze (DFP-aze) također kataliziraju hidrolizu OP spojeva koji kao izlaznu skupinu imaju F^- , Cl^- ili CN^- . Prema razlici u brzini hidrolize DFP-a i somana ili tabuna razlikuju se DFP-aze iz lignje koje brže hidroliziraju DFP nego soman ili tabun i DFP-aze izolirane iz drugih organizama (posebno iz mikroorganizama i beskralježnjaka) koje se ponekad nazivaju zajedničkim imenom Mazurov tip DFP-aza, a koje brže hidroliziraju soman ili tabun nego DFP (33). Od bakterijskih DFP-aza (38, 39) najviše je proučavana DFP-aza iz *Pseudomonas diminutae*, koja može hidrolizirati i VX (40). U DFP-aze se donedavno ubrajao i enzim izoliran iz bakterija roda *Alteromonas* koji također hidrolizira OP spojeve, za koji je kasnije utvrđeno da pripada prolidazama (EC 3.4.13.9) (41).

NEHIDROLITIČKE REAKCIJE OP SPOJEVA

Antikolinesterazno djelovanje nekog OP spoja može se mijenjati i nehidrolitičkim reakcijama biotransformacije ili kemijskim putem pri čemu može doći do transformiranja netoksičnih OP spojeva u toksične ili pretvorbe jednoga toksičnog spoja u drugi (reakcije aktivacije), ili do pretvorbe toksičnih OP



Slika 6 Reakcije katalizirane paraoksonazom (PON1): a) hidroliza paraoksiona, oksonskog analoga organofosfornog insekticida parationa, b) hidroliza živčanoga bojnog otrova sarina i c) hidroliza aromatskog estera fenilacetata (usp. 31)

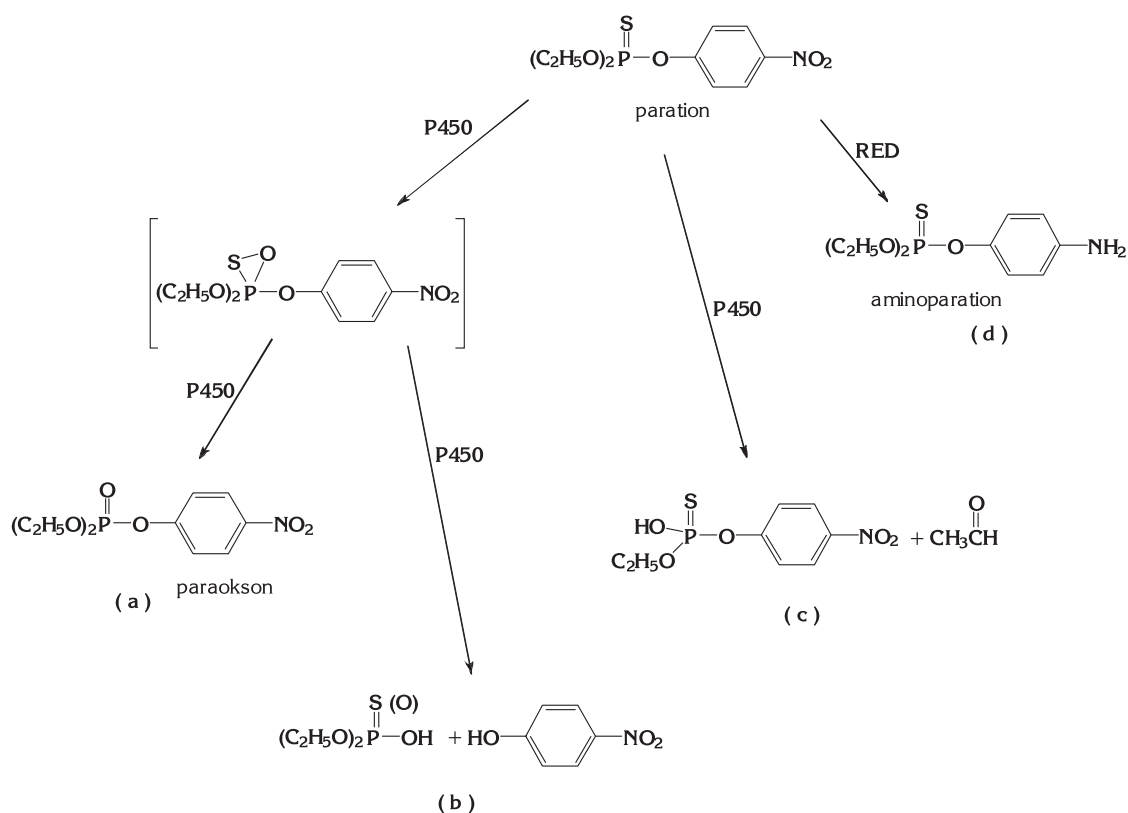
spojeva u spojeve koji više nisu acetilkolinesterazni inhibitori (reakcije detoksikacije). Od ukupno dvadeset i dva OP pesticida čija je uporaba dopuštena u Hrvatskoj (3), četrnaest ih spada u skupinu tioata ili ditioata. Reakcije aktivacije tih spojeva kataliziraju monooksigenaze: mikrosomska P-450 (P450; EC 1.14.14.1) (14, 42) i flavin monooksigenaza (FMO; EC 1.14.13.8) (14, 43), dok glutation S-transferaza (EC 2.5.1.18) (14) katalizira detoksikaciju. Postoje i primjeri detoksikacijskog djelovanja nekih monooksigenaza. Detoksikacijsko djelovanje estera opisano je u prethodnom poglavlju.

Monooksigenaze

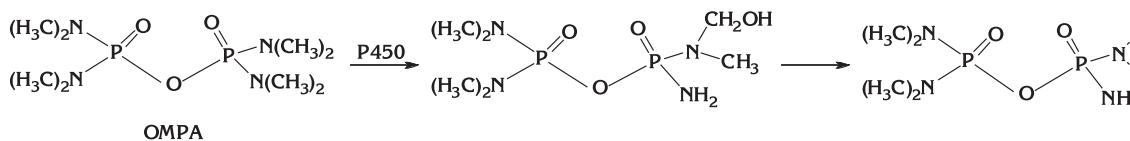
Između P450 i FMO postoje preklapanja u tipovima reakcija koje kataliziraju, kao i u specifičnosti prema supstratima. Reakcije koje P450 može katalizirati jesu oksidativna desulfuracija, *S*- i *N*- oksidacija, *N*-, *O*- i *S*-dealkiliranje, epoksidacija alkilnih skupina i redukcija (6, usp. 25, 44, usp. 45). Reakcije koje katalizira FMO su *S*- i *N*- oksidacija i oksidativna desulfuracija (usp. 6, 44).

Jedna od najvažnijih reakcija aktivacije potpomognutih enzimom P450 je reakcija oksidativne desulfuracije kojoj podliježu fosfortioati i drugi spojevi koji sadržavaju P=S skupinu. Primjer takve aktivacije su paration i malation (slika 7, shema a, slika 5, shema a). Reakcija teče preko P-S-O-epoksidnog međuprodukta (usp. 9), čijim pregrupiranjem nastaje P=O skupina (slika 7, shema a).

Usporedo s desulfuracijom, preko istog međuprodukta zbiva se i reakcija oksidativne dearilacije kod koje pregrupiranje ide u smjeru uklanjanja arilne izlazne skupine, pri čemu se spoj detoksicira. Produkti dearilacije su izlazna arilna skupina i dialkil-fosfortioat, odnosno dialkil-fosfat zbog čega reakcija sličí hidrolizi iako je katalizirana enzimom P450 i uz sudjelovanje kisika i NADPH (slika 7, shema b) (usp. 9, usp. 25). Fosfortioati i njihovi analozi podliježu i reakcijama oksidativne dealkilacije u kojima se jedan od C atoma alkoksiskupine oksidira do aldehida pri čemu se polazni spoj detoksicira (slika 7, shema c). Oksidativnom *N*-dealkilacijom amidnih skupina fosforoamidata, kataliziranom s P450, mogu



Slika 7 Biotransformacije parationa katalizirane monooksigenazama: (a) oksidativna desulfuracija, (b) oksidativna dearilacija, (c) oksidativna dealkilacija katalizirane mikrosomskom P-450 (P450) i (d) redukcija amidne skupine katalizirana NADPH-P450 reduktazom (RED) (6, 9, usp. 25)



Slika 8 Oksidativna N-dealkilacija amidne skupine OMPA-e katalizirana mikrosomskom P-450 (P450) (46)

nastati produkti koji su puno toksičniji od polaznog spoja (slika 8). Tako prisutnost kisika u amidnom dijelu molekule znatno povećava antikolinesterazno djelovanje OMPA-e (46).

Reakciju desulfuracije i S-oksidacije OP spojeva uz P450 katalizira i FMO (slika 9, sheme a i b). Dobri supstrati za FMO su OP spojevi koji sadržavaju tioestersku vezu (P-S-R) (npr. fonofos, forat, disulfoton, fention) (slike 9 i 3).

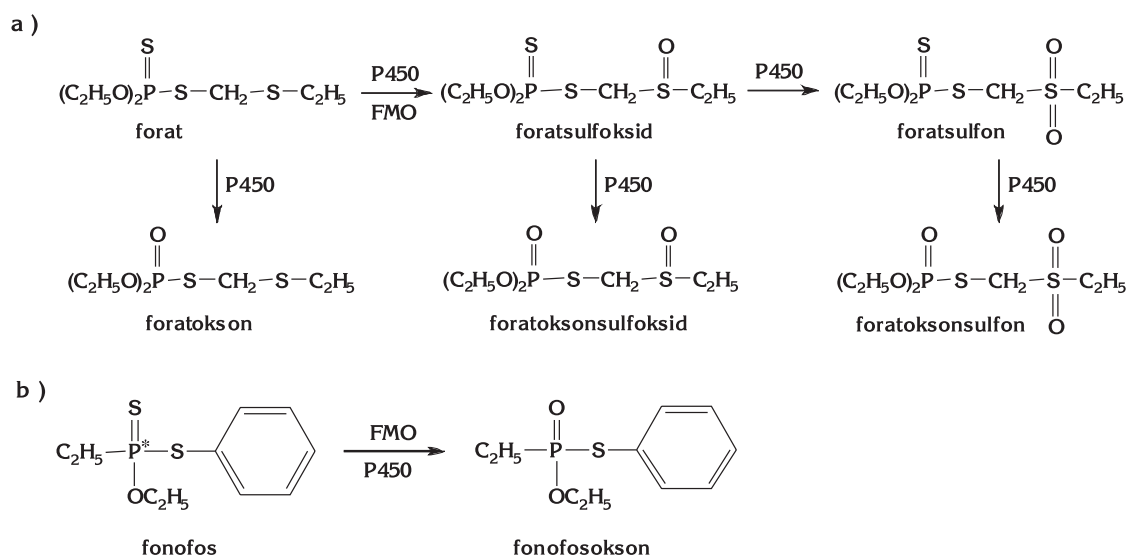
FMO katalizira desulfuraciju onih OP spojeva koji imaju jednu P-C vezu jer djeluje direktno na atom fosfora, dok P450 katalizira desulfuraciju OP spojeva djelujući na sumpor dvostrukom vezom vezan na fosfor (P=S). Paration i neki drugi fosforditionati nisu supstrati za FMO.

Oba enzima, P450 i FMO, za svoju katalitičku aktivnost trebaju NADPH i jedan atom molekularnog kisika, ali se mehanizmi katalitičkog djelovanja tih dvaju enzima razlikuju (6, 25). FMO prima elektrone direktno s NADPH, dok u metaboličkim reakcijama koje potpomaže P-450 sudjeluje još jedna monooksigenaza: NADPH-P450 reduktaza (RED; EC 1.6.2.4) (14, usp. 25). RED je flavoprotein

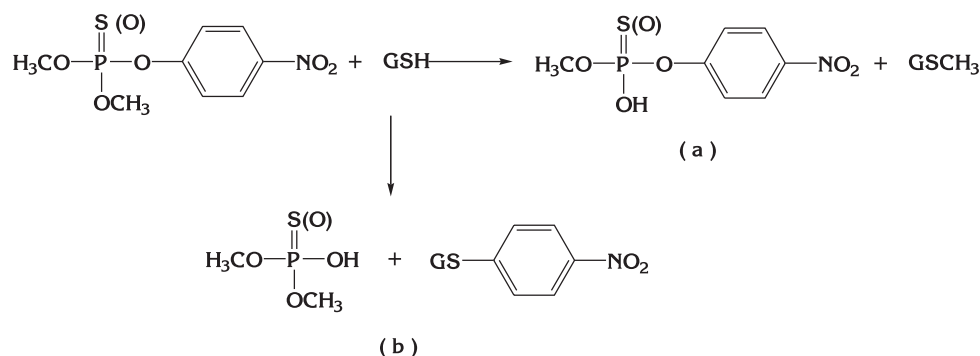
koji omogućava prijenos elektrona s NADPH na P450, ali može i reducirati nitroskupinu parationa u aminoskupinu pri čemu nastaje aminoparation koji nije kolinesterazni inhibitor (slika 7, shema d) (9). P450 čini veliku porodicu hemoproteina (od oko 700 enzima) koji su strukturno slični, ali pokazuju razlike u specifičnosti prema supstratima (usp. 25, usp. 47). Poznato je da P450 2B1 katalizira i aktivaciju parationa i njegovu detoksikaciju. Kod detoksikacije nastaju dietil-fosforna kiselina i *p*-nitrofenol (slika 7, shema b - bez nastajanja epoksidnog intermedijera) (usp. 9, usp. 45). Omjer navedenih reakcija aktivacije i detoksikacije parationa (slika 7, sheme a i b) ovisi o kojem se P450 enzimu radi. P450 se nalazi uglavnom u jetri, a neke se njegove forme nalaze i u drugim tkivima, pa se neki OP spojevi mogu metabolički aktivirati i u mozgu, plućima, koži i bubrezima (6, usp. 25).

Glutation S-transferaze

Glutation S-transferaza (16) katalizira O-dealkilaciju (najčešće metoksiskupine) fosfornih triestera u odgovarajuće diestere (usp. 6, usp. 9) pri čemu nastaje spoj koji više nije inhibitor acetilolinesteraze.



Slika 9 S-oksidacija forata (a) (usp. 9) i desulfuracija fonofosa (b) (11) katalizirane flavin monooksigenazom (FMO) i mikrosomskom P-450 monooksigenazom (P450) (usp. 6, usp. 25). * označava kiralni centar molekule



Slika 10 O-dealkilacija (a) i O-dearilacija (b) metil-parationa i njegova oksoanaloga katalizirane glutation-S-transferazom (usp. 6, usp. 9). GSH označava glutation

Dealkilacija se zbiva cijepanjem veze između kisika i alkilne skupine koji su direktno vezani na atom fosfora te prijenosom metilne skupine s OP spoja na glutation (slika 10, shema a). Cijepanje iste veze kataliziraju i esterase fosfornih triestera, a u nekim slučajevima i monooksigenaze [P450 katalizira O-deetilaciju klorfenvinfosfa i dearilaciju parationa, (usp. 25)]. Zabilježena je i *in vitro* O-dealkilacija parationa (deetilacija) i njegova oksoanaloga (usp. 6). Glutation S-transferaza posjeduje i O-dearilacijsku aktivnost koja je potvrđena kod diazinona, metil-parationa i njegova oksoanaloga, kao i kod parationa i njegova oksoanaloga paraoksona (slika 10, shema b) (usp. 6).

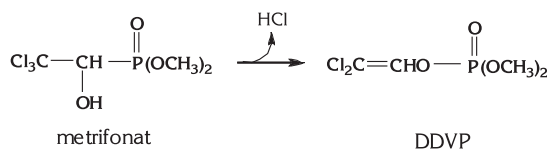
Neenzimske reakcije

Do nastanka toksičnih analoga OP spojeva ili njihove detoksikacije može doći i neenzimskim reakcijama (6). Hidroliza OP spojeva zbiva se u lužnatome mediju, a često se ubrzava djelovanjem UV zračenja. Reakcija desulfuracije prikazana na slici 9, shema a može teći i uz UV zračenje, ali puno sporije nego metaboličkim putem. Do aktivacije fosforotionata dolazi i reakcijom izomerizacije kada je spoj dulje vrijeme izložen visokoj temperaturi. Primjer takve reakcije je intramolekularno transmetiliranje malationa pri temperaturi višoj od 30 °C pri čemu nastaje toksični izomalation (slika 5, shema c). Takva pretvorba malationa bila je 1976. god. uzrok trovanja velikog broja ljudi u Pakistanu, kada je malation bio rabljen radi suzbijanja malarije (48).

Alkilni supstituenti nekih fosforotioata mogu na visokoj temperaturi djelovati kao samoalkilirajući agensi. Do takve termalne izomerizacije dolazi kada jedna molekula fosforotioata alkilira sumpor druge molekule fosforotioata te nastaje S-alkil-fosforotioat

(npr. samoalkiliranje parationa i metil-parationa u tioloizomere) (usp. 6).

Neke od kemijskih reakcija kojima podliježu OP spojevi imaju svoju primjenu u medicini. Tako se naprimjer metrifonat prije pedeset godina masovno rabio kao lijek protiv shistosomijaze (usp. 49, usp. 50, 51, 52). Vrlo dobrim se pokazao i u tretmanu Alzheimerove bolesti te je došao do III. faze kliničkih ispitivanja, ali nije registriran kao lijek (53). Metrifonat je spoj koji nije inhibitor kolinesteraza, ali u vodenim otopinama spontanom pregrupiranjem prelazi u DDVP (diklorfos) koji je inhibitor kolinesteraza (slika 11) (19).



Slika 11 Spontano pregrupiranje metrifonata u DDVP (19, usp. 25)

ZAKLJUČAK

Velik broj terorističkih prijetnja uključuje uporabu visokotoksičnih živčanih bojnih otrova (npr. uporaba sarina 1991. u Zaljevskom ratu, 1994. u naselju Matsumoto u Japanu te 1995. u tokijskoj podzemnoj željeznici) (usp. 45) i drugih OP spojeva koji su također inhibitori acetilkolinesterze. Iz tog se razloga intenzivno istražuju enzimi koji mogu OP spojeve što brže razgraditi u netoksične produkte. U ovom je prikazu dan pregled enzima koji reagiraju s OP spojevima, i to onih koji OP spojeve čine toksičnima, kao i onih koji ih detoksiciraju.

AChE i BChE mogu poslužiti kao zaštita od OP spojeva djelujući kao stehiometrijska ili katalitička

čistila (engl. "scavenger"). AChE i BChE kao stehiometrijska čistila vežu OP spojeve i time pridonose sniženju koncentracije OP spojeva u organizmu (54, 55). Kada se AChE i BChE rabe kao katalitička čistila, tada se zajedno s enzimima primjenjuju i oksimi čime se osigurava reaktivacija enzima i njihovo ponovno vezanje s OP spojem. Kao stehiometrijsko čistilo može se rabiti i CaE, jer njezina inhibicija OP spojevima ne uzrokuje toksične efekte, ali se inhibicijom snizuje koncentracija OP spoja (usp. 7, usp. 25). PTH hidroliziraju OP spojeve i mogu se iskoristiti kao sredstva za dekontaminaciju ljudi, vode ili tla. Mnogi od tih enzima svoju aktivnost zadržavaju u širokom pH-rasponu i pri relativno visokim temperaturama pa su stoga pogodni za uporabu i na terenu imobilizirani na razne podloge (poliuretanske spužve i druge podloge) (27, 38, 39, 41). Intenzivno se radi i na pripravi mutanata enzima koji bi bili efikasniji od nativnih enzima u detoksikaciji OP spojeva i koji bi mogli detoksicirati veći broj različitih OP spojeva. Tako je načinjeno nekoliko varijanata PON1 koje efikasnije hidroliziraju soman i DFP nego divlji tip enzima (56). Načinjeno je i nekoliko mutanata mišje AChE (potencijalnih katalitičkih čistila) kojima se mutacijom nastoji produžiti vrijeme početka "starenja" fosfiliranog enzima da bi se dobilo na vremenu za reaktivaciju oksimima (57). U detoksifikaciji OP spojeva koji sadržavaju P-S vezu (npr. VX) efikasnostima su se pokazale i oksidaze nekih gljiva, peroksidaza iz hrena, lignin-peroksidaza i druge koje oksidiraju P-S vezu tih OP spojeva (58, 59).

Zahvala

Zahvaljujem dr. sc. V. Simeon i dr. sc. E. Reiner na potpori i savjetima tijekom izrade ovog rada. Ovaj je rad izrađen u okviru projekta 0022014 [voditeljice: dr. sc. V. Simeon i Z. Kovarik (od 1. 01. 2005.)] Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH.

LITERATURA

- Costa LG, Toby BC, Vitalone A, Furlong CE. Measurements of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta* 2005;352:37-47.
- U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). Pesticides: Organophosphates [pristup 10. srpnja 2006.]. Dostupno na <http://www.epa.gov/pesticides/op/gov>.
- Maceljski M, Hrlec G, Ostojčić Z, Cvjetković B. Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj. *Glasnik zaštite bilja* 2000;3-4:127-209.
- Fest C, Schmidt KJ, urednici. *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides*. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1982.
- Eto M. *Organophosphorus pesticides: Organic and Biological Chemistry*. Cleveland: CRC Press, Inc.; 1974.
- Krieger R, urednik. *Handbook of Pesticide Toxicology*. 2nd ed. San Diego (CA): Academic Press Inc.; 2001.
- Gupta R, urednik. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. San Diego (CA): Elsevier Academic Press; 2006.
- Price B. Brief nomenclature review: phosphate, phosphonate, phosphorous, phosphorus. *The ASA Newsletter* 2001;82(01-1):7.
- Chambers JE, Levi PE, urednici. *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. San Diego (CA): Academic Press Inc., 1992.
- Rapić V, urednik. Vodič kroz IUPAC-ovu nomenklaturu organskih spojeva, Preporuke IUPAC 1993., Preporuke HKD i HDKI 2001. Zagreb: Školska knjiga; 2002.
- Leigh GJ, urednik. Simeon VI, urednik hrvatskog prijevoda. *Hrvatska nomenklatura anorganske kemije, Preporuke IUPAC 1990. i HKD 1995*. Zagreb: Školska knjiga; 1996.
- Benschop HP, De Jong LPA. Toxicokinetics of nerve agents. U: Somani SM, Romano Jr JA, urednici. *Chemical warfare agents: toxicity at low levels*. Boca Raton: CRC Press; 2000. str. 25-74.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). *Enzyme Nomenclature EC 3.1.1.5* [pristup 26. srpnja 2006]. Dostupno na <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/5.html>>.
- Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Comitee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. San Diego (CA): Academic Press Inc.; 1992.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase: new roles for an old actor. *Neuroscience* 2001;2:294-301.
- Adler M, Manley HA, Purcell AL, Deshpande SS, Hamilton TA, Kan RK, Oyler G, Lockridge O, Duysen EG, Sheridan RE. Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice. *Muscle Nerve* 2004;33:317-27.
- Aldridge WN, Reiner E, urednici. *Enzyme Inhibitors as Substrates: Interaction of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamate Acids*. Amstrdam: North-Holland; 1972.
- Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology* 2000;143:5-118.
- Giacobini E, urednik. *Cholinesterases and Cholinesterase*

- Inhibitors. London: Martin Dunitz Ltd.; 2000.
20. Glynn P. NTE: one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms? *BioEssays* 2003;25:742-5.
 21. Van Tienhoven M, Atkins J, Li Y, Glynn P. Human neurophathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids. *J Biol Chem* 2002;277:20942-8.
 22. Johnson MK. Sensitivity and selectivity of compounds interacting with neurophathy tyrget esterase, Further structure-activity studies. *Biochem Pharmacol* 1988;37:4095-104.
 23. Glynn P. Neural development and neurodegeneration: two faces of neurophathy target esterase. *Prog Neurobiol* 2000;61:61-74.
 24. Reiner E, Davis CS, Schwab BW, Schopfer LM, Richardson RJ. Kinetics of heat inactivation of phenyl valerate hydrolases from hen and rat brain. *Biochem Pharmacol* 1987;36:3181-5.
 25. Jokanović M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 2001;166:139-60.
 26. Hartleib J, Rüterjans H. High-yield expression, purification, and characterisation of the recombinant diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*. *Protein Expres Purif* 2001;21:210-9.
 27. Hartleib J, Rüterjans H. Insights into the reaction mechanism of the diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris* by means of kinetic studies, chemical modification and site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 2001;1546:312-24.
 28. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Kherushinsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:412-9.
 29. Hoskin FCG. An organophosphorus detoxifying enzyme unique to squid. U: Gilbert DL, Andelman JWJ, Arnold JM, urednici. Squid as experimental animals. New York: Plenum Press; 1990. str. 469-80.
 30. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonase: a brief review. *Arch Pharmacol* 2004;369:78-88.
 31. Bargota RS, Akhtar M, Biggadike K, Gani D, Allemann RK. Structure-activity relationship on human serum paraoxonase (PON1) using substrate analogues and inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:1623-6.
 32. Costa LG, Toby BC, Vitalone A, Furlong FC. Paraoxonase polymorphisms and toxicity of organophosphates. U: Gupta R, urednik. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. San Diego (CA): Elsevier Academic Press; 2006. str. 247-57.
 33. Brophy VH, Jampsa RL, Clendinning JB, McKinstry LA, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001;8:1428-36.
 34. Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diepgen TL. Human serum paraoxonase-polymorphism, specificity, classification. U: Reiner E, Aldridge Wn, Hoskin FCG, urednici. Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds. Chichester: Ellis Horwood Limited; 1989. str.15-30.
 35. Reiner E, Simeon-Rudolf V, Škinjarić-Špoljar M. Catalytic properties and distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in human sera. *Toxicol Lett* 1995;82/83:447-52.
 36. Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lusisi AJ, Furlong CE. Catalytic efficiency determines the *in-vivo* efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenetics* 2000;10:767-79.
 37. Hoskin FCG, Kirkish MA, Steinmann KE. Two enzymes for the detoxication of organophosphorus compounds-sources, similarities, and significance. *Fund Appl Toxicol* 1984;4:165-72.
 38. Raushel FM. Bacterial detoxication of organophosphate nerve agents. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:288-95.
 39. Russell AJ, Berberich JA, Drevon GF, Koepsel RR. Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annu Rev of Biomed Eng* 2003;5:1-27.
 40. Gopal S, Rastogi V, Ashman W, Mulbry W. Mutagenesis of organophosphorus hydrolase to enhance hydrolysis of the nerve agent VX. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:516-9.
 41. Cheng T-C, Harvey SP, Stroup AN. Purification and properties of a highly active organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas undina*. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3138-40.
 42. International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Enzyme Nomenclature EC 1.14.14.1 [pristup 29. rujna 2006]. Dostupno na <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/14/14/1.html>.
 43. International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Enzyme Nomenclature EC 1.14.13.8 [pristup 29. rujna 2006]. Dostupno na <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/14/13/8.html>.
 44. Levi PE, Hodgson E. Stereospecificity in the oxidation of phorate sulphoxide by purified FAD-containing mono-oxygenase and cytochrome P-450 isozymes. *Xenobiotica* 1988;18:29-39.
 45. Monov A, Diskovsky C, urednici. Medical aspects of chemical and biological terrorism. Chemical terrorism and traumatism. Sofia: House of the Union of scientists in Bulgaria; 2005.
 46. Fukuto TR, Metcalf RL. Metabolism of insecticides in plants and animals. *Ann NY Acad Sci* 1969;160:97-113.
 47. Omiecinski CJ, Rimmel RP, Hosagrahara VP. Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol Sci* 1999;48:151-6.
 48. Baker EL, Warren M, Zack M, Dobbins RD, Miles JW, Miller S, Alderman L, Teeters WR. Epidemic malathion

- poisoning in Pakistan malaria workers. *Lancet* 1978;1(8054):31-4.
49. Reiner E, Pleština R. Regeneration of cholinesterase in humans and rats after inhibition by *O,O*-dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;49:451-4.
 50. Reiner E, Krauthacker B, Simeon V, Škrinjarić-Špoljar M. Mechanism of inhibition *in vitro* of mammalian acetylcholinesterase and cholinesterase in solutions of *O,O*-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (trichlorphon). *Biochem Pharmacol* 1975;24:717-22.
 51. Reiner E. Esterases in schistosomes: reaction with substrates and inhibitors. *Acta Pharmacol Toxicol* 1981;49:72-8.
 52. World Health Organisation (WHO). Schistosomiasis [pristup 10. srpnja 2006.]. Dostupno na <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>.
 53. Giacobini E. Cholinesterases in human brain: the effect of cholinesterase inhibitors on Alzheimer's disease and related disorders. U: Giacobini E, Pepeu G, urednici. *The brain cholinergic system in health and disease*. Abingdon: Informa Healthcare; 2006. str. 235-64.
 54. Doctor BP, Raveh L, Wolf AD, Maxwell DM, Ashani Y. Enzymes as pretreatment drugs for organophosphate toxicity. *Neurosci Behav Rev* 1991;15:123-8.
 55. Ashani Y. Prospective of human butyrylcholinesterase as a detoxifying antidote and potential regulator of controlled-release drugs. *Drug Dev Res* 2000;50:298-308.
 56. Amitai G, Gaidukov L, Adani R, Yishay S, Yacov G, Kushnir M, Teitelboim S, Lindenbaum M, Bel P, Khershonsky O, Tawfik DS, Meshulam H. Enhanced stereoselective hydrolysis of toxic organophosphates by directly evolved variants of mammalian serum paraoxonase. *FEBS J* 2006;273:1906-19.
 57. Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphorylated conjugates. *Biochemistry* 2004;43:3222-9.
 58. Amitai G, Adani R, Hershkovitz M, Bel P, Rabinovitz I, Meshulam H. Degradation of VX and mustard by enzymatic haloperoxidatin. *J Appl Toxicol* 2003;23:225-33.
 59. Amitai G, Adani R, Sod-Moriah G, Rabinowitz I, Vincze A, Leader H, Chefetz B, Leibovitz-Persky L, Friesem D, Hadar Y. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS Lett* 1998;438:195-200.

Summary

ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS: CLASSIFICATION AND ENZYME REACTIONS

Organophosphorus compounds are derivatives of phosphoric, phosphonic or phosphinic acids whose oxygen atoms bound directly to the phosphorus atom can be substituted by sulphur or nitrogen atoms. These compounds represent a large group of organic compounds used primarily as pesticides. Some are used as drugs and the most toxic compounds as nerve agents. Acute toxicity of organophosphorus compounds is due to the inhibition of acetylcholinesterase, the critical enzyme in neurotransmission. Organophosphorus compounds whose sulphur atom creates a coordinative covalent bond with the phosphorus atom are not acetylcholinesterase inhibitors. To become biologically active these compounds must transform into their oxo analogues, passing through spontaneous or biotransformation reactions. Biotransformation reactions of organophosphorus compounds involve a large number of enzymatic reactions that can make them more or less toxic, or even non-toxic for acetylcholinesterase.

The classification of organophosphorus compounds in this paper considers the nature of groups bound directly to the central phosphorus atom. The paper describes the enzymes taking part in biotransformation of organophosphorus compounds and gives examples of their reactions.

KEY WORDS: *glutathion S-transferase, monooxygenase, phosphoric triester hydrolases, serine esterases*

REQUESTS FOR REPRINTS:

Mr. sc. Anita Bosak
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
p.p. 291, HR-10001 Zagreb
E-mail: abosak@imi.hr