

Rok Stojan¹, Žiga Stojan², Jure Stojan³

Holin-esteraze: struktura, delovanje ter inhibicija z naravnimi in sintetičnimi strupi

*Cholinesterases: Structure, Mechanism and Inhibition
by Natural and Synthetic Poisons*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: holinesteraze, holinesteraze inhibitorji

Holin-esteraze sodelujejo pri prekinitvi prenosa signala v holinergičnih sinapsah centralnega in perifernega živčnega sistema. Doseganje visokih koncentracij encima v holinergičnih sinapsah omogoča vezava katalitskih podenot na strukturne podenote encima in njihovo usmerjanje na ustrezna mesta. 3D-struktura katalitske podenote (monomera) nam prikaže aktivno mesto, ki s svojo strukturo daje encimu učinkovitost, specifičnost in tudi različne psevdokooperativne sposobnosti. Zaradi življenjsko pomembne vloge je acetilholin-esteraza tarča mnogih tako naravnih kot umetno razvitih inhibitorjev. Medtem ko reverzibilni inhibitorji preprečijo vezavo substrata z vezavo v aktivno mesto, se ireverzibilni kovalentno vežejo na serin v aktivnem centru. Inhibirani encim lahko reaktiviramo, vendar je to mogoče le, dokler ne pride do delne dealkilacije vezanega inhibitorja, kar se še posebej hitro dogaja ob inhibiciji z živčnimi bojnimi strupi. Kombinacija tega pojava, ki ga imenujemo staranje, in splošnega citotoksičnega vpliva je domnevni razlog za pozno nevtoksičnost pri zastrupitvi z živčnimi bojnimi strupi.

ABSTRACT

KEY WORDS: cholinesterases, cholinesterase inhibitors

Cholinesterases are involved in terminating nerve impulses in the central nervous system and at the periphery. The high enzyme concentration at the cholinergic synapses is achieved by oligomerization on an anchoring, collagen-like peptide. The 3D structure of a monomer shows a buried active site, which is responsible for the effectiveness and specificity of the enzyme, but also for various pseudocooperative phenomena. Due to its important role, acetylcholinesterase is a target for various inhibitors, natural as well as artificial ones. Reversible inhibitors prevent substrate accommodation by sterically blocking the active site and the irreversible ones act as acylating agents that modify the active site serine, the major participant in covalent catalysis. When irreversibly inhibited by potent nerve gases, cholinesterases can be reactivated, unless partial dealkylation of the bound inhibitor has occurred. This particular phenomenon, called aging of cholinesterases, along with generalized cytotoxic effect appear to be the cause of organophosphate-induced delayed neurotoxicity in nerve gas poisoned casualties.

¹ Rok Stojan, štud. med., Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

² Žiga Stojan, univ. dipl. inž. agr., Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

³ Prof. dr. Jure Stojan, dr. med., Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

UVOD

Holin-esteraze (ChE) so encimi, ki hidrolizirajo holinske estre in katerih delovanje je zavrto v prisotnosti 10 μ mol fisostigmina (1). Vretenčarji imajo dva encima: eden od teh je substratno dokaj nespecifična butirilholin-esteraza (BChE), drugi pa substratno zelo specifična acetilholin-esteraza (AChE). Fiziološka vloga prve je po mnogih desetletjih še vedno nejasna. Zdi se, da opravlja več nalog, med njimi detoksifikacijo strupenih holinskih estrov. Kljub temu pa tudi pri posameznikih s popolnoma neaktivno BChE zaradi sprememb v genu za ta encim v normalnih razmerah niso opazili nobenih kliničnih znakov. Težave pa nastopijo, če za mišično sprostitvev pri operacijah teh ljudi uporabijo sukcinilholin (Leptosuccin[®]), ki je holinski ester in deluje kot blokator nikotinskih receptorjev, a ga cepi tudi BChE. V takih razmerah je podaljšan čas apneje po operaciji.

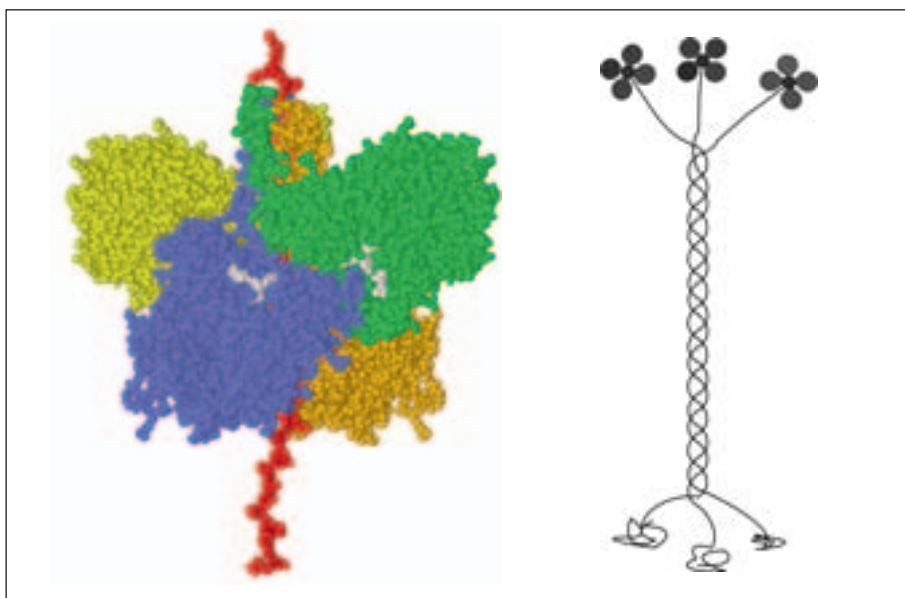
Po drugi strani pa je AChE življenjsko pomemben encim, saj s hidrolizo nevrotansmitorja acetilholina konča prenos signala v holinergični sinapsi. Po vzburljenju presinaptičnega nevrona se acetilholin sprosti iz veziklov v živčnem končiču v sinaptično špranjo. Mnoge molekule se reverzibilno vežejo na tarčni receptor in sprožijo depolarizacijo post-sinaptične membrane, ki lahko pripada drugemu nevronu ali pa skeletnemu mišičnemu vlaknu, če gre za motorično ploščico. Na svoji poti po sinaptični reži se večina acetilholinskih molekul sreča z AChE, ki jih hidrolizira v neaktivna produkta acetat in holin. Manjši del acetilholinskih molekul pobegne v intersticij in kri, kjer jih razgradita na eritrocite vezana AChE in serumska BChE. Zelo razumljivo je torej, da akutna zastupitev z inhibitorji AChE v centralnih in perifernih holinergičnih sinapsah zelo hitro pripelje do mišičnih krčev v nadaljevanju pa zaradi desenzibilizacije nikotinskih receptorjev do mišične ohromelosti. Vse skupaj z drugimi primarnimi (raven holinergičnih sinaps) in sekundarnimi učinki (predvsem hipoksemija) lahko povzroči smrt (2). Po drugi strani in proti vsem pričakovanjem pa miške brez AChE *knock-out* preživijo, saj pomanjkanje AChE nadomestijo z veliko večjo koncentracijo BChE ali drugih serumskih esteraz (3). Žuželke in

nevretenčarji imajo le eno vrsto holin-esteraz, ki tudi če so produkti več genov, kažejo katalitske lastnosti, ki so nekje med AChE in BChE. Insekticidi, pesticidi in živčni bojni strupi so zelo močni inhibitorji ChE, vendar specifični aminokislinski ostanki v aktivnih centrih pri encimih različnih izvorov močno vplivajo na njihovo občutljivost za te spojine.

STRUKTURA IN SUBSTRATI ACETILHOLIN-ESTERAZE

AChE se izraža v mnogih tkivih in različnih oblikah, ki se razlikujejo po kvartarni strukturi (4, 5). Lokalizacijo encima določi najprej proces alternativnega pripajanja (izrezovanje intronov s C-terminalnega konca primarne mRNK), v nadaljevanju pa vezava s sidriščnim proteinom in njegovo usmerjanje. Glavna oblika AChE, ki se izraža pri normalnih odraslih sesalcih v možganih in mišicah, se sprošča kot monomer, ki se lahko sestavi v dimere ali tetramere, ti pa so lahko prosti ali vezani na kolagenski oz. hidrofojni resti v heterooligomere (6). Pri heterooligomerih je vsak tetramer povezan z eno od treh verig kolagenskega ali s prolinom bogatega transmembranskega sidriščnega proteina (slika 1). Monomer ima na C-terminalnem koncu s triptofani bogato amfililno tetramerizacijsko vijačnico. Štiri triptofanske vijačnice tako tvorijo vzporedno povesmo, in sicer okoli ene verige sidriščnega proteina. Slednja je usmerjena antiparalelno in zavzame obliko levosučne vijačnice (7). Takšno heteropentamerno supramolekularno sestavo stabilizirajo štirje disulfidni mostiči; dva sta med dvema triptofanskima heliksoma, dva pa med cisteini preostalih dveh triptofanskih heliksov in sidriščnim proteinom. Heteropentamer ostane stabilen tudi, če zamenjamo cisteine, ki sodelujejo v disulfidnih mostičih (8).

Kinetično obnašanje ChE je nenavadno, a lastnosti niso odvisne od stopnje oligomerizacije. Dimeri in tetrameri kažejo v delovanju enaka odstopanja od Michaelis-Mentenevega reakcijskega mehanizma kot monomer brez triptofanske tetramerizacijske vijačnice. Posredne študije z elektronsko spinsko resonanco (ESR) (9) in kasnejša razrešitev 3D-strukture (10) so pokazale, da leži aktivno mesto ChE na dnu ozkega grla v središču proteina.

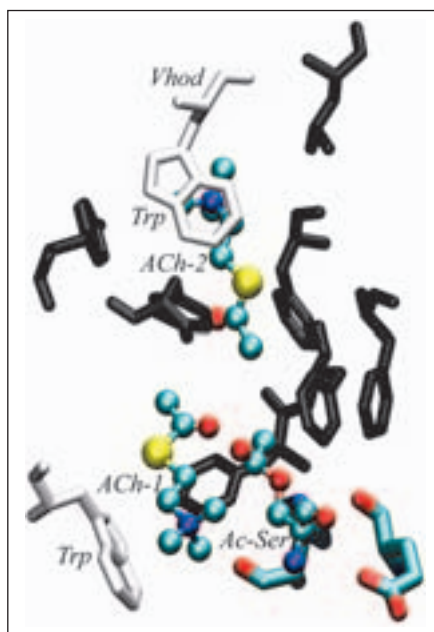


Slika 1. 3D-model heteropentamera in trije tetrameri na sidriščnem proteinu. Temna veriga – del sidriščnega proteina, svetlo – vhod v aktivno mesto.

Zdi se, da so psevdokooperativni pojavi pri vseh ChE posledica prav te nenavadne arhitekture, ki omogoča vezavo ligandov v aktivno mesto in tudi na t. i. periferno anionsko mesto ob vhodu v okoli 20 Å globok lijak (slika 2).

ChE spadajo v naddružino hidrolaz alfa-beta z več kot 530 aminokislinami. Tvorijo 12 mešanih listov beta, ki so obdani s 14 alfavijačnicami in imajo nenavadno Ser-His-Glu katalitsko triado (identifikacijska koda proteinske baze, PDB-koda: 1EA5). Aktivno mesto AChE je posebej prilagojeno za proces hidrolize naravnega substrata acetilholina, tako da v nasprotju z BChE (11) katalitična sposobnost za substrate karboksilnih estrov z acilnimi skupinami, večjimi od propionilne, zelo upade (12). Prepojitev kristalov nativne AChE s substratnim analogom 4-oxo-N,N,N-trimetilpentanaminijem (slika 3) nam prikaže, da pri akomodaciji kvartarni amonijev ion ni vezan na neko negativno nabito 'anionsko' mesto, temveč da se kationska glava poveže s π -elektroni indolnega obroča ohranjenega triptofana. (PDB-koda: 2CF5) (13).

Poleg vseh kinetičnih posebnosti zaradi specifične zgradbe aktivnega mesta so ChE



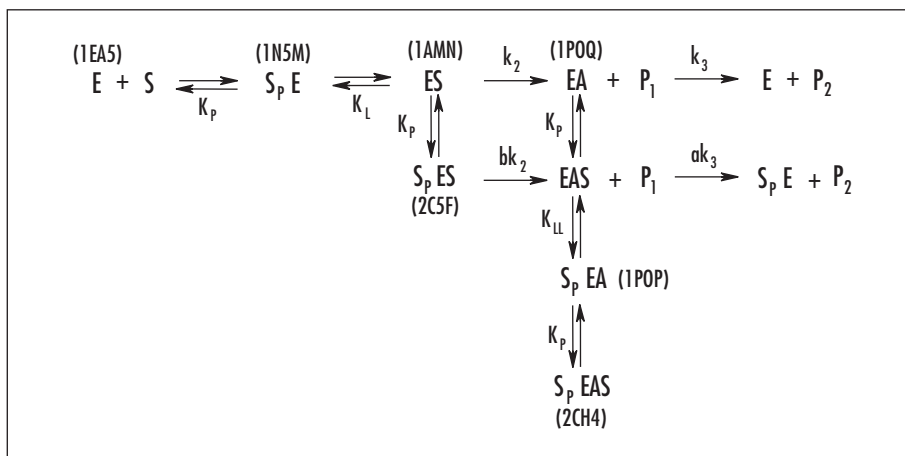
Slika 2. 3D-model lijaka aktivnega mesta z acetilholinska molekula (PDB-koda: 2C4H, SpEAS vmesni produkt na sliki 4); Ac-Ser je acetiliran katalitski serin; temno so hidrofobni aminokislinski ostanki, ki tvorijo steno aktivnega mesta; molekuli ACh sta v stiku s triptofanom.

Slika 3. 4-*oxo-N,N,N*-trimetilpentanaminij, substratni analog.

hidrolaze, ki delujejo s kombinacijo kislinško-baznega in kovalentnega mehanizma katalize (14). V prvem delu reakcije v procesu imenovanem acilacija delno deprotoniran serin s pomočjo His-Glu sistema napade prihajajoč substrat tako, da zamenja holinski del substrata s samim seboj. Acilirani encim, ki je kovalentni vmesni produkt reakcije, se hidrolizira med izstopanjem alkoholne skupine iz aktivnega mesta. Za hidrolizo se porabi najbližja molekula vode, ki jo domnevno aktivira isti His-Glu sistem. Po odcepitvi se acetat sprosti zelo hitro.

Poznavanje katalitskih mehanizmov ChE po večini izhaja iz študij kinetike le-teh. Kinetični podatki so zbrani v številnih kinetičnih shemah, ki predstavljajo mehanizem reakcije. Novi predlogi se porajajo z vsakim novim odkritjem. Trenutno velja, da ima glavna katali-

tična pot pri vseh ChE vsaj tri vmesne produkte (zgornja veja na sliki 4), se pravi enega več kot klasična shema, ki jo je pred desetletji predlagal Wilson (15). Ker je aktivno mesto zakopano v notranjosti, se substrat z encimom najprej sreča na perifernem anionskem mestu, kjer se orientira za optimalno vstopanje (SpE na sliki 4). Sledi zelo usmerjeno površinsko drsenje substrata na dno aktivnega mesta (ES na sliki 4), kjer poteče dvostopenjska kataliza: nukleofilni substituciji holina za serin sledi hidroliza. Pri zelo nizkih, mikromolarnih koncentracijah substrata je sedaj encim pripravljen na nov katalitični krog (zgornja veja na sliki 4). Pri nekoliko višjih, milimolarnih koncentracijah substrata pa se med razgradnjo prve substratne molekule na periferno mesto veže še ena molekula substrata (SpES) in s tem zapre vhod/izhod žepa oz. lijaka, na dnu

Slika 4. Hidroliza substrata s ChE. E – encim, S – substrat, P – produkta, Sp – substrat, vezan na periferno mesto encima. V reakcijski shemi je sedem intermediatov, popišemo pa jo s sedmimi kinetičnimi parametri: K_p – disociacijska konstanta za vezavo substrata na periferno mesto, K_i in K_{LL} – porazdelitvena koeficienta, k_2 in k_3 – hitrostni konstanti za acetilacijo in deacetilacijo, a in b – proporcija faktorja. V oklepajih ob posameznih intermediatih so zapisane PDB-kode kristalografsko razrešenih 3D-struktur posameznih vmesnih spojin.

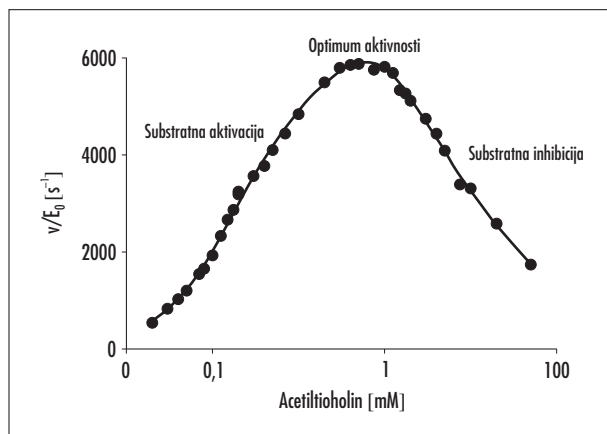
Za analizo kinetičnih podatkov uporabimo iz sheme izpeljano hitrostno enačbo:

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E]_0 [S]}{[S] + K_M} = \frac{\frac{k_2 k_3}{1 + \frac{[S]}{K_p} + \frac{[S]}{K_p K_{LL}} + \frac{[S]^2}{K_p^2 K_{LL}}} \frac{[E]_0 [S]}{1 + K_{LL} + \frac{[S]}{K_p}}}{\frac{k_3 K_p K_L}{1 + b \frac{[S]}{K_p}} + S + \frac{k_2}{k_3} \frac{1 + \frac{[S]}{K_p} + \frac{[S]}{K_p K_{LL}} + \frac{[S]^2}{K_p^2 K_{LL}}}{1 + a \frac{[S]}{K_p}} \frac{1 + K_{LL} + \frac{[S]}{K_p}}{1 + b \frac{[S]}{K_p}}}$$

katerega je aktivni center. Pride do dveh nasprotnih učinkov: izstopanje alkohola je sterično onemogočeno ($b < 1$), aktivacija/orientacija vode za hidrolitično cepitev acetilirane serina pa se v zmanjšanem in zaprtem prostoru izboljša ($a > 1$; druga veja na sliki 4). Pri še večjih, submolarah koncentracijah substrata pa je delovanje holin-esteraz popolnoma blokirano (EAS in SpEAS ne razpadata), saj se v acetiliranem aktivnem mestu znajde ta dve molekuli substrata: ena na dnu, druga pa na perifernem mestu (slika 2, PDB-koda: 2C4H) (13). Vse te dogodke lahko strnemo v kinetični shemi, ki jo prikazuje slika 4 (16).

Iz enačbe, ki je urejena po zgledu enačbe po Michaelisu in Maud Menten, vidimo, da sta kinetična parametra k_{cat} in K_M odvisna od koncentracije substrata. S prilagajanjem parametrov takšna enačba zelo natančno popiše spreminjanje začetne hitrosti hidrolize acetilholina z AChE v zelo širokem koncentracijskem razponu, kar je tudi prikazano na sliki 5 (16).

Proučevanje ChE je zanimivo z več zornih kotov, tako znanstveno-teoretičnih kot tudi praktičnih. Katalitske sposobnosti vretenčarskih AChE so zelo visoke, saj lahko cepijo tudi do 10.000 substratnih molekul na sekundo,



Slika 5. Odvisnost aktivnosti AChE, izolirane iz električnega organa električne jegulje, od koncentracije substrata.



Slika 6. Prikaz 3D-zgradbe naravnega substrata acetilholina in fenilacetata.

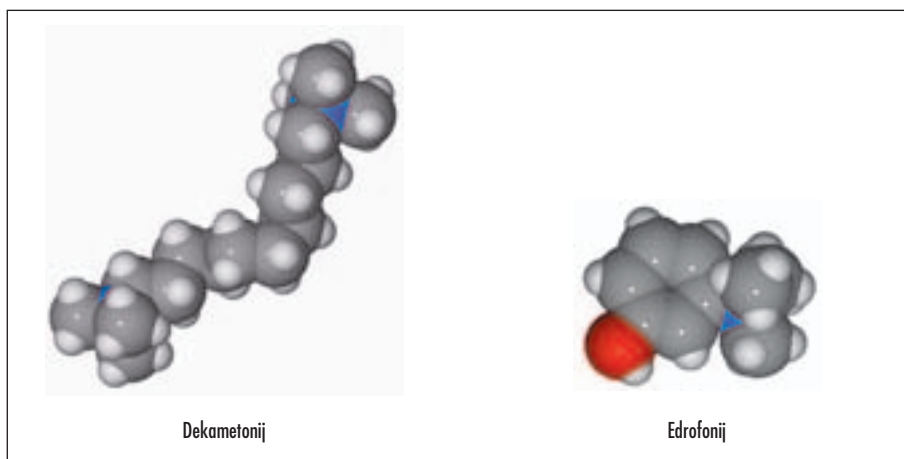
kar si je težko predstavljati pri encimu s tako globokim in ozkim vhomom v aktivno mesto. Ravno zato se je porodila misel, da ima encim še dodaten stranski izhod za produkte (18, 19). V podporo tej razlagi so v strukturi nativevne AChE iz vinske mušice opazili gibanja indolne skupine triptofana v aktivnem mestu, ki spominjajo na odpiranje in zapiranje stranskih vrat (20, 21). Dejstvo, da so vretenčarske ChE aktivne tudi po popolni blokadi vhoda v aktivno mesto s fascikulinom II, sestavino strupa zelene mambe (22, 23), dodatno podpira hipotezo stranskih vrat (angl. *back door*), ki pa še vedno ni povsem priznana.

Čeprav je AChE zelo specifičen encim, je sposoben hidrolizirati številne druge estre, tako z različnimi alkoholnimi (fenilacetat, slika 6) kot tudi različnimi kislinjskimi skupinami (butirilholin) (24). Medtem ko hidroliza naravnih substratov poteka s podobnimi hitrostmi skozi vse stopnje, je pri hidrolizi drugih sub-

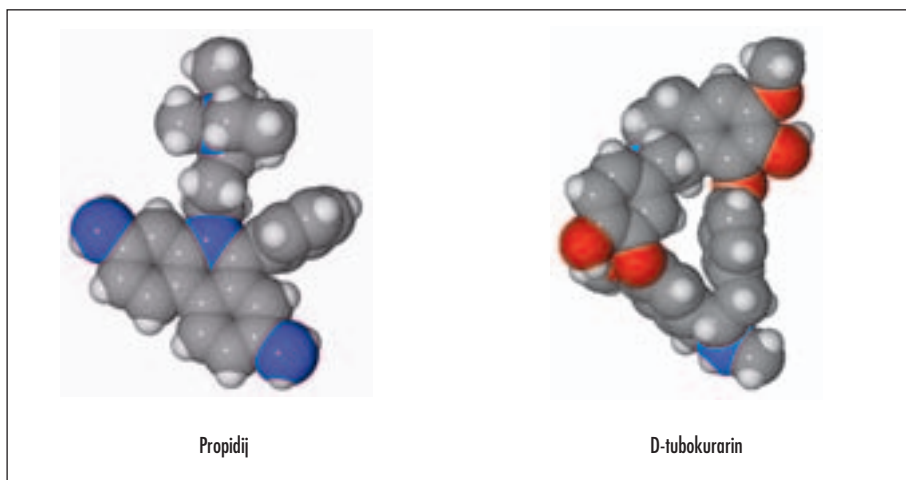
stratov ponavadi ena stopnja omejujoča. Tako lahko te substrate razdelimo v dve skupini: tiste, ki so preveliki in zato zelo redko dosežejo prehodno stanje, kot sta npr. protitumorsko zdravilo CPT-11 (PDB-koda: 1U65) (25) in butirilholin (26); v drugo skupino spadajo substrati, ki so majhni, se vežejo v aktivno mesto, acilirajo serin, a se potem več ne odcepijo. Predstavniki obeh skupin so inhibitorji AChE: spojine iz prve so reverzibilni, spojine iz druge skupine pa ireverzibilni inhibitorji. Nekateri od teh inhibitorjev, ki jih pogosteje srečujemo v praksi, so prikazani v tabeli 1.

REVERZIBILNI INHIBITORJI AChE

Lijaku podobno aktivno mesto ChE lahko sprejme številne različne molekule, če le niso prevelike. Seveda inhibicijska konstanta ni odvisna le od inhibitorja, temveč tudi od izvora



Slika 7. 3-D zgradba dekametonija in edrofonija.



Slika 8. 3-D zgradba propidija in D-tubokurarina.

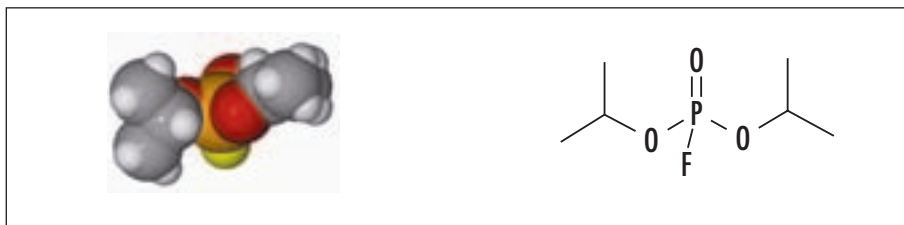
encima. Zaradi sorodne zgradbe imajo vse ChE afiniteto do pozitivno nabitih ligandov s hidrofobnimi predeli. Klasičen predstavnik te skupine je tetrametilamonij, kvartarna dušikova spojina, ki je tudi del holina v molekuli acetilholina. Zaseda se, podobno kot substrat, na dno aktivnega mesta med stranski verigi triptofana in fenilalanina z vezavno konstanto v milimolarnem območju. Tudi dekametonij (slika 7), ki je sestavljen iz dveh tetrametilamonijev, povezanih z desetimi metilenskimi ponovitvami, je inhibitor AChE, toda nekaj-tisočkrat močnejši od tetrametilamonija. Kristalna struktura kompleksa kaže, da se dekametonij z eno nabito glavo veže na periferno mesto in z drugo na dno, tako da zapolni prehod do aktivnega mesta (PDB-koda: 1ACL) (27). Dekametonij je prototip reverzibilnega inhibitorja ChE, ki premosti obe vezalni mesti in deluje v zelo nizkih koncentracijah. Njegove izpeljave, npr. E2020 (Donepezil, Aricept®; PDB-koda: 1EVE), se uporabljajo pri lažšanju zgodnje faze Alzheimerjeve bolezni.

Drugi način za povečanje afinitete tetrametilamonija je oponašanje celotnega holina z dodatnim povečanjem hidrofobnosti. Aromatski kvartarni alkohol edrofonij (slika 7), ki se klinično uporablja za diagnosticiranje miastenije gravis, zavzame celotno dno aktivnega mesta, metahidroksilna skupina pa tvori vodikove vezi s Ser-His iz katalitske

triade (PDB-koda: 2ACK) (27). Tudi v tem primeru se afiniteta tisočkrat poveča.

Redkeje, a vendarle naletimo tudi na inhibitorje, ki so po svoji strukturi podobni substratu in ki se v aktivno mesto nekovalentno vežejo z afiniteto, ki je tudi deset velikostnih razredov večja od afinitete dobrih reverzibilnih inhibitorjev. Njihova struktura je natančen odlitek aktivnega mesta in to popolnoma brez prilagajanja. To so analogi prehodnega stanja in trimetilamino-trifloro-dihidroksietilbenzen (PDB-koda: 1AMN) je takšna molekula, ki z atomarno (10^{-15}) afiniteto blokira katalitsko triado AChE (28). Kot zdravilo sicer ni uporaben, pri proučevanju ChE pa je zelo primeren za titracijsko določevanje koncentracije aktivnih mest.

Tretja skupina reverzibilnih inhibitorjev ChE so tako imenovani periferni ligandi, ki zaradi velikosti ne morejo v aktivno mesto. Ker so pozitivno nabiti, jih močan elektrostatski dipol okoli vhoda vleče v notranjost (29). Najbolj znani med njimi so propidij, galamin in D-tubokurarin (PDB-kode: 1N5M, 1N5R) (30, 31) (slika 8). Kurare, ki je predvsem znan po tesni vezavi na nikotinski holinergični receptor, učinkovito inhibira AChE, delovanje na konjsko BChE pa je dvojno: šibkejši trenutni inhibiciji sledi desetkrat močnejša, a počasna blokada (32). Ker je tudi reaktivacija po odstranitvi D-tubokurarina počasna, lahko sklepamo, da se aktivno mesto BChE



Slika 9. 3-D zgradba diisopropilfluorofosfata (DFP); F je fluor (angl. leaving group).

in D-tubokurarin po začetnem stiku konformacijsko prilagodita, tako da se slednji tam zagozdi.

Podobno deluje tudi fascikulin II (PDB-ko-da: 1MAH), 62 aminokislinskih ostankov dolga nevrotoksična triprsta beljakovina iz strupa zelene mambe, ki se v stehiometričnem razmerju veže na rob aktivnega mesta vretenčarskih AChE in tako prepreči dostop drugim ligandom (22, 33). V nasprotju s tem pa drugačne aminokisliline okoli vhoda v aktivno mesto pri BChE in AChE nevretenčarjev zmanjšajo afiniteto za fascikulin II za več kot milijonkrat tako, da jim strup zelene mambe ne škodi.

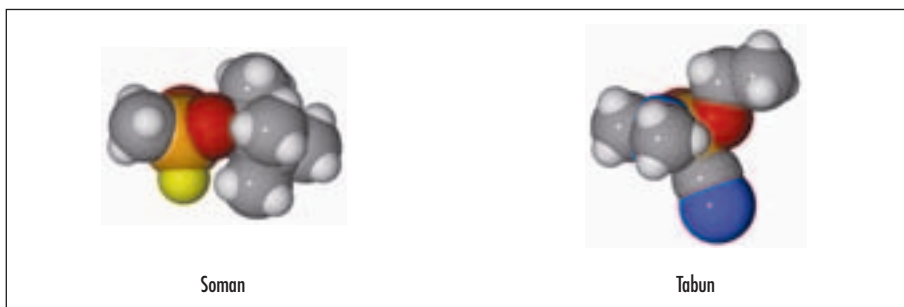
IREVERZIBILNI INHIBITORJI ACHE

Snovi, ki na aktivni serin ChE prenašajo kislinske ostanke, so najmočnejša antiholin-esterazna sredstva (34). To so estri, halidi ali podobne nestabilne spojine substituirane fosforne, karbamoilne ali žveplove kisline. Mehanizmi esterifikacije so dobro proučeni in so v osnovi enaki kot pri substratih, le hidroliza aciliranega serina je zelo počasna. Sem spadajo

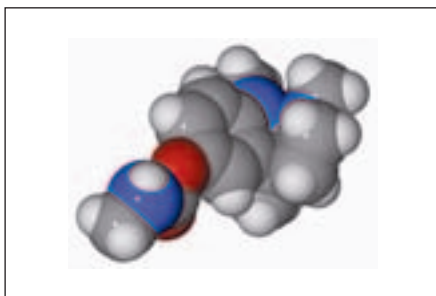
insekticidi, pesticidi in kemični bojni strupi, kot so živčni bojni plini. Med vsemi antiholin-esteraznimi spojinami so najbolj strupeni živčni bojni strupi.

Najbolj znani med njimi so diisopropilfluorofosfat (DFP) (slika 9), isopropil metilfosfonofluoridat (sarin), pinacolil metilfosfonofluoridat (soman, slika 10) in etil-N-dimetilfosforamidocianidat (tabun, slika 10). Vsi so derivati fosforne kisline, ki pri kovalentni povezavi z aktivnim serinom ChE izgubijo relativno najbolj kislno skupino, ki ji zato angleško pravimo *leaving group*. Pri DFP-ju je to fluorid, pri tabunu pa nitrilna skupina. Druge funkcionalne skupine so alkilne (sarin, soman), alkoksi (DFP) ali amino (tabun), lahko pa so tudi arilne kot pri etil-nitro-fenilfosfonotiolatu (EPN) ali ariloksi (EPN, paraokson).

Če karbonilni kisik, npr. v paraoksonu, zamenjamo z žveplom (paration) ali selenom, so te spojine v razmerah *in vitro* neaktivne, vendar po biološki aktivaciji v telesu postanejo strupene. Ker je ta pretvorba v organizmih insektov hitrejša kot pri sesalcih, so slednji ob zastrupitvah s temi spojinami manj prizadeti.



Slika 10. 3-D zgradba somana in tabuna.



Slika 11. 3-D zgradba fisostigmina – eserina, monometilkarbamoil eserolina.

Karbamati se široko uporabljajo tako kot insekticidi, pa tudi kot zdravila. Nekateri, npr. fisostigmin (eserin) (slika 11), so klinično pomembni pri diagnostiki in zdravljenju miastenije gravis in glavkoma. Holin-esteraze so bile opredeljene kot vse hidrolaze, ki cepijo holinske estre in jih eserin inhibira v koncentraciji $10 \mu\text{mol}$ (35).

Najučinkovitejši karbamati imajo na dušiku eno metilno skupino, druga pa je bodisi metilna skupina bodisi vodik. V nasprotju s tem je alkoholna *leaving group* lahko zelo različna. Vzrok za podaljšanje dekarbamoilacije, tj. hidrolize karbamoiliranega serina, je vodikova vez med karbamoilnim dušikom in N_{ϵ} histidina v His-Glu sistemu (PDB-koda: 1OCE) (19).

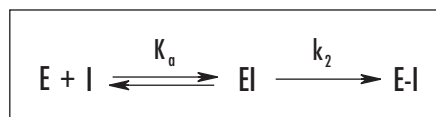
Zelo podobni organofosfatom, a dosti manj toksični, so organosulfonati. Zato se pogosto uporabljajo pri proučevanju mehanizma, ne le ChE, ampak tudi drugih serinskih hidrolaz. Veliko študij je pokazalo prednosti spojin, kot je metansulfonilflorid (MSF) (slika 12), zaradi njegove majhnosti in ireverzibilnosti kompleksa inhibitor-encim (36–38).

Vpliv ireverzibilnih inhibitorjev se navadno vrednoti na osnovi hitrostne konstante za vezavo na encim. V večini primerov je koncentracija ireverzibilnega inhibitorja veliko



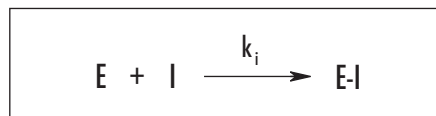
Slika 12. 3-D zgradba metansulfonil florida (MSF).

večja od koncentracije ChE. Pod takimi pogoji poteka inhibicija v dveh stopnjah: začetni reverzibilni sledi ireverzibilna. Reakcijo prikazuje slika 13.



Slika 13. Reakcija med ChE in ireverzibilnim inhibitorjem s prikazom reverzibilnega vmesnega kompleksa EI, E-I je ireverzibilno inhibiran encim.

Ideja o dvostopenjskem mehanizmu temelji na zmanjševanju bimolekularne hitrostne konstante s časom (nelinearni semilogaritmični diagrami). Nastanek reverzibilnega kompleksa je opisan z afinitetno konstanto ($K_a = k_{-1}/k_{+1}$), medtem ko je nastanek ireverzibilnega kompleksa opredeljen z acilacijsko konstanto, k_2 . Odnos med tema konstantama in hitrostno konstanto drugega reda je $k_i = k_2/K_a$ (slika 14).

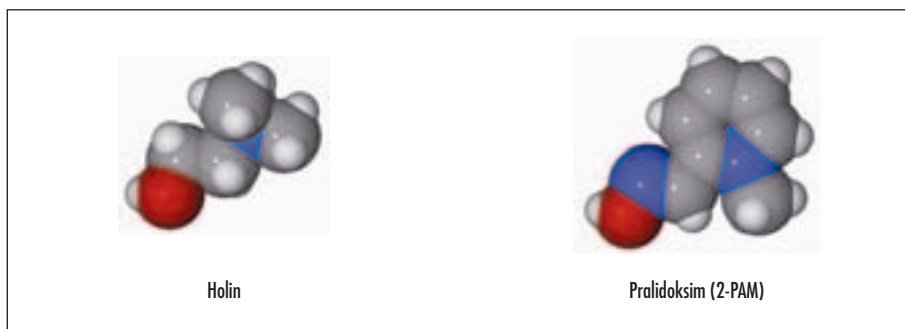


Slika 14. Enostopenjska bimolekularna reakcija med ChE in ireverzibilnim inhibitorjem.

Bimolekularna hitrostna konstanta k_i je osnovni pokazatelj toksičnosti ireverzibilnega inhibitorja. Na preprost način jo ocenimo s pomočjo enačbe 2, ki upošteva razmerje med neinhibirano aktivnostjo in preostankom aktivnosti po predinkubaciji encima z ireverzibilnim inhibitorjem (39).

$$k_i = \frac{2.303}{t[I]} * \log \frac{v_0}{v_t}$$

[I] v enačbi 2 je koncentracija inhibitorja, v_0 začetna hitrost encimske reakcije in v_t hitrost po času t . Enačba velja le, če je koncentracija inhibitorja vseskozi prebitna ($I \gg E$).



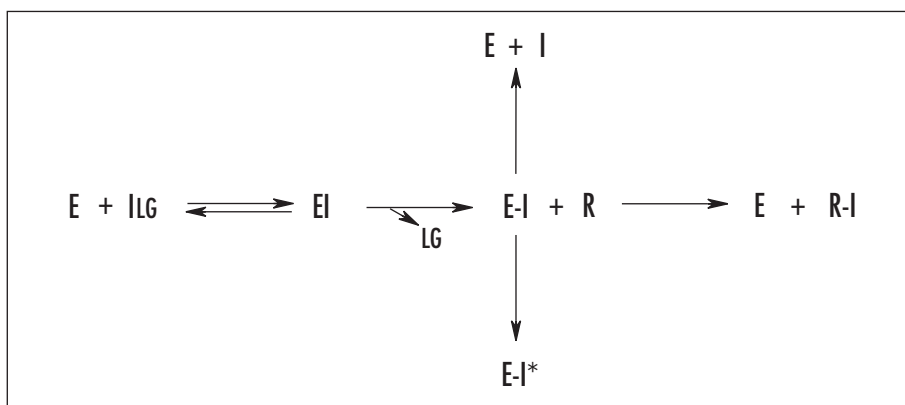
Slika 15. 3-D zgradba holina in pralidoksima.

Pomen velikosti bimolekularne hitrostne konstante si v grobem predstavljamo tako, da je za dosego podobnega biološkega učinka ireverzibilnega inhibitorja z desetkrat manjšo vrednostjo konstante, treba uporabiti desetkrat višjo koncentracijo. Za uničenje mrčesa, ki se je prilagodil z mutacijo v ChE, tako potrebujemo ustrezno več insekticida.

Ireverzibilni inhibitorji reagirajo s ChE v ekvimolarnem razmerju, kar nam omogoča uporabo le-teh za določanje neznanih koncentracij encima v neočiščenem beljakovinskem preparatu. Žal pa je, zaradi nizke številčne vrednosti k_p , v takih razmerah hitrost veza-ve ireverzibilnega inhibitorja največkrat tako počasna, da popolno inhibicijo redko dosežemo. Kljub temu se 7-(metiletoksifosfoniloksi)1-metil-kinolinijev jodid (MEPQ) večkrat uporablja v te namene.

REAKTIVACIJA IN STARANJE HOLIN-ESTERAZ

Kadar so aktivna mesta encima in molekule inhibitorjev v stehiometrično istih količinah, se bo inhibicija nadaljevala, dokler ne bo prišlo do popolne izgube encimske aktivnosti. Vendar pa običajno opazimo, da kljub temu pride do manjše vrnitve encimske aktivnosti. To se lahko v razmerah *in vitro* zgodi spontano kot posledica interakcije s topilom ali pa tudi z namenoma dodano snovjo v raztopino inhibiranega encima, kar izkoriščamo pri zdravljenju zastrupitev z reaktivatorji AChE v razmerah *in vivo*. Spontana reaktivacija fosforiliranih ChE je pod fiziološkimi pogoji zanemarljiva. Znano pa je, da lahko nukleofilne spojine, kot sta hidroksilamin in holin (slika 15), povrnejo encimsko aktivnost (14).



Slika 16. Procesj, ki se dogajajo pri ireverzibilni inhibiciji, spontani reaktivaciji ter reaktivaciji z reaktivatorjem in staranje ChE. E – encim, I_{16} – intaktni ireverzibilni inhibitor, LG – skupina, ki zapušča (angl. leaving group), I – kislinski del ireverzibilnega inhibitorja, EI – reverzibilni kompleks med encimom in ireverzibilnim inhibitorjem, E-I – ireverzibilno inaktiviran encim, E-I* – postaran encim, R – reaktivator.

Še posebej učinkovita snov je piridin-2-aldoksim metodid (Pralidoxim, 2-PAM, slika 15), ki je kemično oksim (40).

Večina učinkovitih reaktivatorjev ChE je podobnih holinu, ki je produkt pri hidrolizi naravnega substrata (41). Vežejo se med indolno skupino triptofana v aktivnem mestu in Ser-His iz katalitične triade, kjer elektrofilne imino in oksimske skupine sprejmejo z aktivnega serina vezano fosforno kislino.

Leta 1955 je Hobbiger (42) opazil povežavo med izpostavljenostjo ChE organofosfatu in encimsko aktivnostjo po reaktivaciji z nukleofilnim aktivatorjem, saj so encimi, ki so bili dlje časa izpostavljeni inhibitorju, imeli manjšo aktivnost po reaktivaciji kot tisti, ki so bili izpostavljeni manj časa. Ta pojav je znan pod imenom staranje in velja za vse holin-esteraze, razlikuje pa se za vsak inhibitor in encim posebej. Najhitreje se stara AChE električne jegulje, če jo inhibiramo s somanom, saj je razpolovni čas le 8 sekund (43). V splošnem pa se BChE stara hitreje kot AChE.

Obstaja več teorij o mehanizmih staranja ChE (44, 45). Oosterbaan in sodelavci so predlagali, da se pri inhibiciji z DFP-jem to zgodi z odcepitvijo izopropilne skupine z organofosfata, vezanega na serin v aktivnem mestu, kar so poimenovali dealkilacija (46). Pred kratkim so pokazali, da pri s tabunom inhibirani in starani mišji AChE pride do deaminacije (PDB ID-kode: 2C0P, 2C0Q) (47). V vseh kristalografsko dokumentiranih primerih so opazili (PDB ID-kode: 1SOM, 1VXO, 1VXR) (48) zamenjavo enega od organskih substituentov s hidroksilno skupino na z organofosfatom inhibirani ChE, kar nakazuje, da His-Glu sistem za prenos protonov napade in hidrolizira napačno vez v kovalentnem kompleksu (PDB ID-kode: 1SOM, 1VXO, 1VXR) (48). Ko pride do staranja z organofosfati zastrupljene ChE, reaktivacija ni več mogoča. Vzrok je najbrž nastanek zelo močne vodikove vezi med N_{ϵ} histidina katalitične triade in kisikom nove hidroksilne skupine po dealkilaciji. To hipotezo podpira tudi dejstvo, da se sulfonilirane ChE ne starajo, pa tudi reaktivirajo se ne.

Kadar ocenjujemo reaktivacijo ireverzibilno inhibirane ChE, moramo biti pozorni, saj je običajno reaktivator tudi inhibitor, ki lahko reagira s substratom ali pa v reakciji s strupom tvori nov še nevarnejši inhibitor. Uspešnost

reaktivacije je torej odvisna od časa, ki je pretekel pred dodanim reaktivatorjem, od koncentracije inhibitorja in reaktivatorja, od vrste ChE in seveda splošnih pogojev, kot sta temperatura in ionska moč. Če lahko vse te vplive standardiziramo, je časovni potek reaktivacije ponavadi eksponentna krivulja, podobna, a obratna inhibicijski. Učinkovitost reaktivatorja-nukleofila pa je predstavljena z bimolekularno hitrostno konstanto, tokrat za hidrolizo ireverzibilnega inhibitorja.

POSTOPKI OB ZLORABI HOLIN-ESTERAZNIH STRUPOV

Zaradi izredno pomembne fiziološke vloge AChE je inhibicija tega encima že desetletja predmet intenzivnih raziskav. V tem času je bilo razvitih veliko zelo učinkovitih reverzibilnih in ireverzibilnih inhibitorjev. Med vsemi so najnevarnejši organofosfati, ki že v zelo nizkih odmerkih povzročijo smrt. Pri akutnih zastrupitvah nevarnost še dodatno narašča s časom, saj pojav staranja zmanjšuje količino za reaktivacijo sposobnega encima. Pri zdravljenju žrtev je treba poleg umetne ventilacije takoj začeti s farmakološko terapijo (49). Konvencionalno se daje atropin vsakih nekaj ur, obenem pa tudi oksimske reaktivatorje (50). Ker sarin in tabun starata človeške encime zelo počasi, paralidoksim (2-PAM) deluje tudi nekaj ur po izpostavitvi. Nasprotno pa se s somanom zastrupljena človeška AChE stara v minutah, zato pomaga le takojšnje samoinjiciranje 2-PAM. Ob grozeči nevarnosti za zastrupitev z živčnimi bojnimi strupi, kot npr. med prvo zalivsko vojno, se uporablja karbamatna profilaksa. Zavezniške vojake so takrat sistemsko ščitili s piridostigminom, ki pa ga sedaj doktrinarno zamenjuje rekombinantna človeška BChE v enkratnem odmerku 200 mg (51).

V zvezi z zastrupitvijo z živčnim bojnim plinom je treba poudariti, da poleg inhibicije AChE in posledične takojšnje smrti, lahko strup poškoduje različne organe pri preživetih. Še posebej v kombinaciji s stresom privede do trajnih posledic, kot je nevarni sindrom zalivske vojne (52, 53). Naravne serumske esterase, npr. serumska paraoksonaza, niso dovolj učinkovite, da bi preprečile akutno organofosfatno inhibicijo holin-esteraz (54),

niti ne morejo varovati pred zakasnelo nevro-toksičnostjo (55).

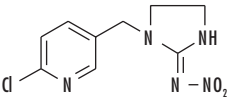
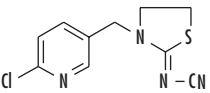
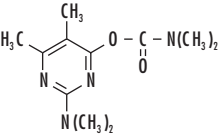
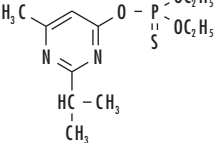
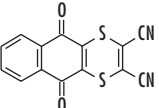
Inhibitorji ChE so tudi zelo zanimiva tero-ristična sredstva. Večina enostavno dostopnih insekticidov in pesticidov seveda ni tako učinkovitih kot leta 1995 v Tokiu uporabljeni sarin. Toda ogromne količine zaščitnih fitofarmaceutskih sredstev za uničenje vse bolj opornih škodljivcev (tabela 1) kljub poostre-

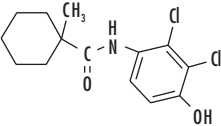
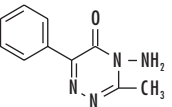
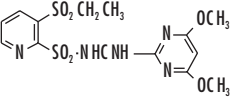
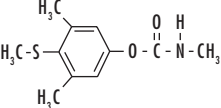
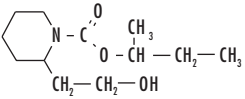
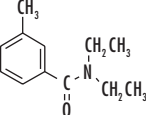
nemu nadzoru prodaje postajajo vse večja grožnja tudi na tem področju.

ZAHVALA

Delo je bilo delno opravljeno v okviru projekta 'Znanost za mir', ki ga je v letih 2006–08 financiralo Ministrstvo za obrambo Republike Slovenije.

Tabela 1. Nekateri pogosto uporabljeni insekticidi, fungicidi, herbicidi in repelenti.

	Strukturna formula	Kemijska skupina	Delovanje	Trgovsko ime
INSEKTICIDI Imidakloprid		Kloronikotinil	listne uši, hmeljeve uši, kolaradski hrošč	CONFIDOR SL 200
Tiakloprid		Kloronikotinil	listni zavrtači, zavijači	CALYPSO SC 480
Primikarb		Karbamat	listne uši	PIRIMOR 50 WG
Diazinon		Tioorganofosfat	kapar, uši, pršice, resarja, bolsice, bolhači, molji	DIAZINON 20
FUNGICIDI Propineb	$\left[-\text{Zn}-\overset{\text{S}}{\underset{\text{S}}{\text{C}}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\underset{\text{S}}{\text{C}}}- \right]_x$	Ditiokarbamat	peronospora, krompirjeva in čebulna plesen	ANTRACOL WG 70
Difianon		Kinon	škrlup, breskova kodravnost, črna pegavnost	DELAN 700 WG

	Strukturna formula	Kemijska skupina	Delovanje	Trgovsko ime
Fenheksamid		Cikloheksano-karboksiamid	sadna gniloba, cvetna monilija, siva plesen	TELDOR SC 500
HERBICIDI Glifosat	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{P}(\text{OH})_2$	Organofosforni glicin	uničuje zelene dele rastlin	BOOM EFEKT
Metamitron		Triazinon	dotikalno, talni zatiralec plevelov	GOLTIX WG 90
Rimsulfuron		Sulfonat	zatiranje večletnih plevelov v koruzi	TAROT 25 WG
REPELENTI Metiokarb		Karbamat	repelent in odvraca ptice od mladih rastlin	MESUROL FS-500
Icaridin		Karbamat	mřes	AUTAN
Dietitoluamid		Amid	mřes	PIPS BIBAN DEET

LITERATURA

1. Usdin E. In: Karczmar AG, ed. *Anticholinesterase Agents*. Oxford: Pergamon Press; 1970. p. 61.
2. Taylor P. *Anticholinesterase Agents*. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. *Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill Press; 2001. p. 184.
3. Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, et al. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293 (3): 896–902.
4. Dudai Y, Herzberg M, Silman I. Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of the electric eel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 2473–6.
5. Silman I, Futerman AH. Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur J Biochem* 1987; 170: 11–22.
6. Inestrosa NC, Roberts WL, Marshall TL, et al. Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues. *J Biol Chem* 1987; 262: 4441–4.
7. Dvir H, Harel M, Bon S, et al. The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *EMBO J* 2004; 23 (22): 4394–405.
8. Bon S, Ayon A, Leroy J, et al. Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. *Neurochem Res* 2003; 28: 523–35.
9. Šentjerc M, Štalc A, Župančič AO. On the location of active serines of membrane acetylcholinesterase studied by the ESR method. *Biochim Biophys Acta* 1976; 438 (1): 131–7.
10. Sussman JL, Harel M, Frolov F, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991; 253: 872–9.
11. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, et al. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* 2003; 278 (42): 41141–7.
12. Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1975; 43: 103–218.
13. Colletier JP, Fournier D, Greenblatt HM, et al. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J* 2006; 25 (12): 2746–56.
14. Krupka RM. Chemical structure and function of the active center of acetylcholinesterase. *Biochemistry* 1996; 35 (6): 1988–97.
15. Wilson IB. Acetylcholinesterase. XI. Reversibility of tetraethyl pyrophosphate inhibition. *J Biol Chem* 1951; 190 (1): 111–7.
16. Stojan J, Brochier L, Alies C, et al. Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate. *Eur J Biochem* 2004; 271 (7): 1364–71.
17. Stojan J. Rational polynomial equation helps to select among homeomorphic kinetic models for cholinesterase reaction mechanism. *Chem Biol Interact* 2005; 157–158: 173–9.
18. Gilson MK, Straatsma TP, McCammon JA, et al. Open »back door« in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* 1994; 263 (5151): 1276–8.
19. Bartolucci C, Perola E, Cellai L, et al. »Back door« opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase. *Biochemistry* 1999; 38 (18): 5714–9.
20. Harel M, Kryger G, Rosenberry TL, et al. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* 2000; 9 (6): 1063–72.
21. Nachon F, Stojan J, Fournier D. Insights into substrate and product traffic in the *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase active site gorge by enlarging a back channel. *FEBS J* 2008; 275 (10): 2659–64.
22. Rosenberry TL, Rabl CR, Neumann E. Binding of the neurotoxin fasciculin 2 to the acetylcholinesterase peripheral site drastically reduces the association and dissociation rate constants for N-methylacridinium binding to the active site. *Biochemistry* 1996; 35 (3): 685–90.
23. Goličnik M, Stojan J. Multi-step analysis as a tool for kinetic parameter estimation and mechanism discrimination in the reaction between tight-binding fasciculin 2 and electric eel acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1597 (1): 164–72.
24. Krupka RM. Hydrolysis of neutral substrates by acetylcholinesterase. *Biochemistry* 1966; 5 (6): 1983–8.
25. Harel M, Hyatt JL, Brumshstein B, et al. The 3D structure of the anticancer prodrug CPT-11 with *Torpedo californica* acetylcholinesterase rationalizes its inhibitory action on AChE and its hydrolysis by butyrylcholinesterase and carboxylesterase. *Chem Biol Interact* 2005; 157–158: 153–7.
26. Harel M, Sussman JL, Krejci E, et al. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 (22): 10827–31.
27. Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (19): 9031–5.
28. Brodbeck U, Schweikert K, Gentinetta R, et al. Fluorinated aldehydes and ketones acting as quasi-substrate inhibitors of acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 1979; 567 (2): 357–69.

29. Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, et al. (1993) An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (11): 5128–32.
30. Bourne Y, Taylor P, Radic Z, et al. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J* 2003; 22 (1): 1–12.
31. Changeux JP. Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs. *Mol Pharmacol* 1966; 2 (5): 369–92.
32. Stojan J, Pavlič MR. On the inhibition of cholinesterase by D-tubocurarine. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1079 (1): 96–102.
33. Bourne Y, Taylor P, Marchot P. Acetylcholinesterase inhibition by fasciculon: crystal structure of the complex. *Cell* 1995; 83 (3): 503–12.
34. Kitz RJ, Ginsburg S, Wilson IB. The reaction of acetylcholinesterase with O-dimethylcarbamyl esters of quaternary quolinium compounds. *Biochem Pharmacol* 1967; 16 (11): 2201–9.
35. Engelhard N, Prchal K, Nenner M. Acetylcholinesterase. *Angew Chem Int Ed Engl* 1967; 6 (7): 615–26.
36. Metzger HP, Wilson IB. The acceleration of the acetylcholinesterase catalyzed hydrolysis of acetyl fluoride. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 28 (2): 263–9.
37. Pavlič MR. On the nature of the acceleration of the methanesulfonylation of acetylcholinesterase by tetraethylammonium. *Biochim Biophys Acta* 1973; 327 (2): 393–7.
38. Goličnik M, Fournier D, Stojan J. Acceleration of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase methanesulfonylation: peripheral ligand D-tubocurarine enhances the affinity for small methanesulfonyl fluoride. *Chem Biol Interact* 2002; 139 (2): 145–57.
39. Aldridge WN. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl-p-nitrophenyl triphosphate (E605) and analogues. *Biochem J* 1950; 46: 451–60.
40. Wilson IB, Ginsburg S. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 1955; 18: 168–70.
41. Musilek K, Kuca K, Jun D, et al. Synthesis of a novel series of bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2005; 20 (5): 409–15.
42. Hobbiger F. Effect of nicotinhydroxamic acid methiodide on human plasma cholinesterase inhibited by organophosphates containing a dialkylphosphato group. *Br J Pharmacol Chemother.* 1955; 10 (3): 356–62.
43. Michel HO, Hackley BE Jr, Berkowitz L, et al. Ageing and dealkylation of Soman (pinacolylmethylphosphono fluoride)-inactivated eel cholinesterase. *Arch Biochem Biophys* 1967; 121 (1): 29–34.
44. Wagner-Jauregg T, Hackley BE Jr. Model reactions of phosphorus-containing enzyme inactivators. III. Interaction of imidazole, pyridine and some of their derivatives with dialkyl halogeno-phosphates. *J Am Chem Soc* 1953; 75: 2125–30.
45. Davies DR, Green AL. The kinetics of reactivation by oximes of cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Biochem J* 1956; 63: 520–35.
46. Oosterbaan RA, Warringa MG PJ, Jansz HS, et al. The reaction of pseudocholinesterase with diisopropyl phosphorofluoridate (DFP). *Abstracts of IV International Congress of Biochemistry* 1958, 4, p. 38.
47. Ekstrom F, Akfur C, Tunemalm AK, et al. Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. *Biochemistry* 2006; 45 (1): 74–81.
48. Millard CB, Koellner G, Ordentlich A, et al. Reaction Products of Acetylcholinesterase and VX Reveal a Mobile Histidine in the Catalytic Triad. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 9883–4.
49. de Jong RH. Nerve gas terrorism: a grim challenge to anesthesiologists. *Anesth Analg* 2003; 96 (3): 819–25.
50. Kuca K, Bartosova L, Kassa J, et al. Comparison of the potency of newly developed and currently available oximes to reactivate nerve agent-inhibited acetylcholinesterase in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact* 2005; 157–158: 367–8.
51. Cerasoli DM, Griffiths EM, Doctor BP, et al. In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent bioscavenger. *Chem Biol Interact* 2005; 157–158: 363–5.
52. Loewenstein-Lichtenstein Y, Schwarz M, Glick D, Norgaard-Pedersen B, et al. Genetic predisposition to adverse consequences of anti-cholinesterases in 'atypical' BCHE carriers. *Nat Med* 1995; 1 (10): 1082–5.
53. Moss JL. Many Gulf War illnesses may be autoimmune disorders caused by the chemical and biological stressors pyridostigmine bromide, and adrenaline. *Med Hypotheses* 2001; 56 (2): 155–7.
54. Amitai G, Gaidukov L, Adani R, et al. Enhanced stereoselective hydrolysis of toxic organophosphates by directly evolved variants of mammalian serum paraoxonase. *FEBS J* 2006; 273 (9): 1906–19.
55. Damodaran TV, Abou-Donia MB. Alterations in levels of mRNAs coding for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin genes in the central nervous system of hens treated with diisopropyl phosphorofluoridate (DFP). *Neurochem Res* 2000; 25 (6): 809–16.