Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2014; 39 (2) ; 126–131
doi: 10.5505/tjb.2014.00922

Derleme Makale [Review Article]

Yayın tarihi 30 Haziran, 2014 © TurkJBiochem.com

[Published online 30 June, 2014]

Organofosfat zehirlenmelerinde asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanılma olasılığı

[Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophasphate poisoning]

Tuba Tüylü Küçükkılınç

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD Sıhhiye Ankara

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Tuba Tüylü Küçükkılınç

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD Sıhhiye Ankara
Tel. 90 312 305 14 99
Faks. 90 312 311 47 77
E-posta. ttuylu@hacettepe.edu.tr

ÖZET

Organofosfatlar (OPlar) en yaygın kullanılan pestisitler olup, 1940'lardan bu yana zirai ve askeri bölgelerde kullanılmaktadırlar. Bu pestisitler asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek merkezi ve çevresel sinir sistemini etkilerler. OPların toksik etkileri solunum, gastrointestinal, dolaşım, bağışıklık, endokrin ve sinir sistemi üzerine olup; akut veya kronik maruziyetleri kanser, üreme problemleri, doğumsal ve gelişimsel anomaliler ile ilişkilendirilmiştir. OP zehirlenmeleri acil tıbbi tedavi gerektirir; genellikle çeşitli asetilkolinesteraz inhibitörleri, oksimler ve atropin birlikte kullanılır. OP zehirlenmelerinin tedavisinde asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanımı yeni bir yaklaşımdır.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, organofosfat zehirlenmesi, yaşlanma, biyotemizleyici

Çıkar çatışması: Yazarın çıkar çatışması bulunmamaktadır.

ABSTRACT

Organophosphates (OPs) are most widely used group of pesticides in the world that are employed in agriculture and militarian sites since the 1940s. These pesticides affect central and peripheral nervous system by inhibiting acetylcholinesterase. OPs have toxic effects on respiratory, gastrointestinal, circulatory, immune, endocrine and nervous systems. Acute or chronic exposure to OPs is associated with cancer, reproductive problems, birth defects and developmental anomalies. Widespread exposure to OPs makes adequate medical tratment urgent. General medical therapy consists of a combination of acetylcholinesterase inhibitors, oximes and atropine. A new approach in treatment of organophosphate poisoning is usage of human acetylcholinesterases as a bioscavenger.

Key Words: Acetylcholinesterase, organophosphate poisoning, aging, bioscavenger

Conflict of Interest: Author declares that there is no conflict of interest.

Kayıt Tarihi: 24 Temmuz 2013; Kabul Tarihi: 10 Ekim 2013
Registered: 24 July 2013; Accepted: 10 October 2013

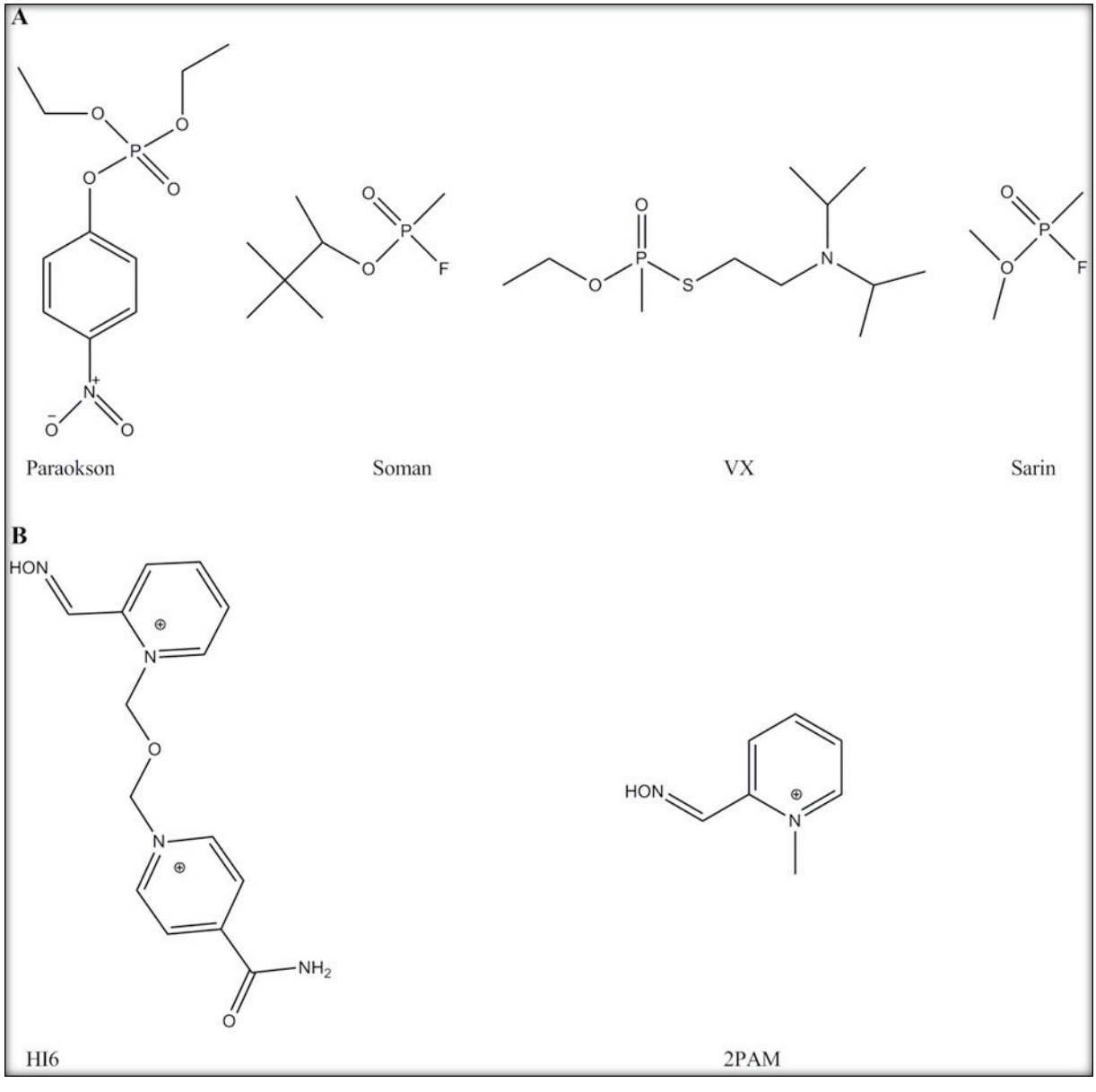
Giriş

Sarin, soman, siklosarin, tabun, VX, ve paraokson gibi organofosfatlar (OPlar) asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) enzimlerinin kovalan inhibitörleri olup çoğunlukla pestisit olarak kullanılırlar (Şekil 1). Akut ve kronik maruziyetleri sonucunda solunum, gastrointestinal, dolaşım, immün ve endokrin gibi birden fazla sistem etkilenir. OP zehirlenmelerinin tedavisi tersinir AChE inhibitörleri ve/veya oksimlerle (2-PAM, obidoksim, TMB4 veya HI-6) birlikte atropin kullanımına dayanır. Ancak OPların çeşitli vücut kompartmanlarında birikip plazmaya yeniden dağılarak asetilkolinesterazı tekrar tekrar inhibe etmesi oksim tedavisindeki temel sorundur. Asetilkolinesteraz enziminin biyotemizleyici olarak kullanımı OP zehirlenmelerinin tedavisinde yeni bir yaklaşımdır. OP toksisitesine karşı etkili bir biyotemizleyicinin sahip olması gereken özellikler şöyle bildirilmiştir: a) önilaç olarak kullanılmak üzere yeterli miktarlarda elde edilebilmesi b) yüksek dönüşüm sayısı c) dolaşımda uzun yarı ömür ve d) immunouygunluk [1].

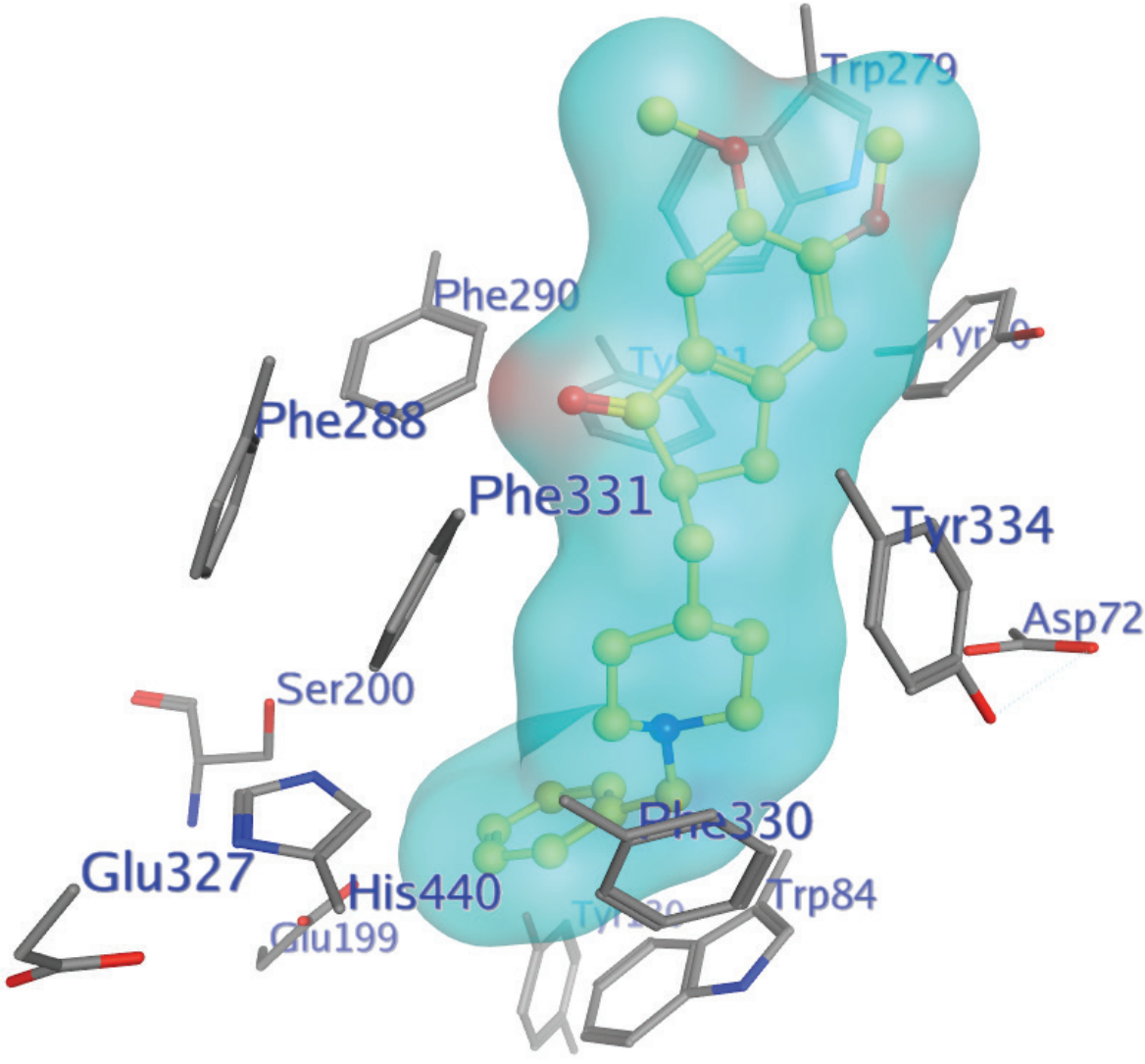
Asetilkolinesteraz enzimi

Asetilkolinesteraz başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferal birçok dokuda yaygın olarak bulunan bir enzim olup, ana görevi asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini bitirmektir. Asetilkolinesterazın temel yapısal ve katalitik birimi, kütlesi 70-80 kDa aralığında olan bir glikoproteindir. Enzim bulunduğu dokuya göre bu birimin monomer, dimer veya tetrameri şeklinde bulunur [2].

Aktif bölge oyuğunda 5 alt-bölge tarif edilmiştir (Şekil 2) [2,3]:



Şekil 1. Çeşitli OP (A) ve oksimlerin (B) kimyasal yapısı



Şekil 2. E2020 ligandı ile kompleks yapmış asetilkolinesteraz aktif merkez oyuğunun MOE yazılımı aracılığıyla gösterimi (protein data bank kodu: 1eve)

1. Periferal Anyonik Bölge: Aktif bölge oyuğunun ağzında olup Tyr70, Trp l21 ve Trp 279'dan meydana gelmiştir. Ligandlar ilk bu bölgeye bağlanır, sonrasında aktif merkeze yönlendirilirler [4,5].
2. Kolin Bağlama Bölgesi: Bu bölgede bulunan Trp84 ve Phe330 rezidularının elektron açısından zengin aromatik halkaları, substrat ve inhibitörlerin katyonik ucu ile katyon-π etkileşimi oluştururlar.
3. Oksi-Anyon Deliği (OAD): Kolin bağlama bölgesinin yanında bulunan oksi-anyon deliği Gly118, Gly119 ve Ala201 rezidularını içerir. Bu bölgede geçis durumları stabilize edilir ve aktivasyon enerjisi bariyeri azaltılır. Substrat dikey pozisyondan yatay pozisyona döndürülerek; katalitik Ser200'ün etkisine girmesi sağlanır [6].
4. Açil Bağlama Cebi: Substrat yatay olarak döndürüldüğünde, substratın açil kısmı açil bağlama cebine bağlanır. AChE'ın açil bağlama cebinde Phe288 ve Phe290'nin fenil halkaları, bağlı substratın hareketini kısıtlar ve asetilkolin gibi kısa açil grubu içeren substratların katalizini hızlandırır [5,7].
5. Katalitik Triad: OAD ve açil bağlama cebiyle yaptığı etkileşimler sonucu stabilize olan substrat, aktif merkezin esteratik bölgesinde yer alan ve Ser200, His440 ve Glu327'den oluşan katalitik triadın etkisine girer. Katalitik triad bir yük dağıtım sistemi olup, ilk aşamada Ser200'ün OH grubundan His440-Glu327 ikilisi yönünde proton aktarımı sonucunda Ser200 nükleofilik özellik kazanır. Ser200 oksijeninin substrat asetilkoline atağı sonucunda açil-enzim ara yapısı oluşur. Devamında elektron dağıtımının ters dönmesi ile bu ara yapıdan alkol biriminin uzaklaşması katalizlenir. İkinci ürün olan karboksilik asidin açığa çıkması ve son olarak Ser200'ün His440'den bir proton alarak serbest kalması sonucunda artık enzim başlangıç durumuna dönmüştür [6,8].

Asetilkolinesterazın OPlarca inhibisyon mekanizması

Organofosfatlar (OP) enzim aktif merkezinin uzun süre dolu kalmasına ve bu yüzden asetilkolini hidroliz edememesine neden olurlar. OPların aktif serini fosforilasyonlarını takiben bir geçiş formu oluşur ve aktif merkez dolu hale gelir [9,10]. Bu aşamadan sonra çoğu OP "yaşlanma" adı verilen ek bir reaksiyona uğrarlar. Yaşlanma durumunda OP kökünden ek bir alkil substituenti kaybederek negatif yüklü hale gelen OP, enzimden uzaklaşamaz. Fosforile enzim, oksimler gibi nükleofiller aracılığıyla deaçilasyona uğratılarak eski haline getirilebilir, ancak yaşlanmış enzim için bu mümkün değildir (Şekil 3) [11]. Soman gibi sinir ajanlarının yaşlanmaları çok hızlı olup dakikalar içinde gerçekleşirken, paraokson ya da etildiklorvos gibi pestisitlerin yaşlanması günler sürer [12].

AChE fonksiyonlarının kaybı sinaptik aralıklarda asetil kolinin birikmesine neden olur ve bunun sonucunda kas paralizi, nöbet ve asfiksiye bağlı ölüm meydana gelir.

OP zehirlenmesi tedavisinde yararlanılan maddeler, karbamik asit türevleri (pridostigmin), antimuskarinik maddeler (atropin), sinir sitemini ekileyen maddeler (diazepam) ve güçlü nükleofiller olan oksimler (ör. pralidoksim ve obidoksim tuzları) gibi maddelerdir. Pralidoksim, obidoksim, pridostigmin gibi bileşikler fosforil (fosfonil) gruplarını uzaklaştırarak kolinesterazı reaktive ederken; atropin, otonomik fonksiyonların normale dönmesi için tedavi sonuna kadar kullanılır. Ancak enzimlerin "yaşlanmış enzim" adı verilen formunun reaktivasyonu mümkün değildir. Bu nedenle in vivo ortamda enzimin plazmadaki aktivitesinin normal düzeye dönmesi ancak karaciğerde yeni enzim sentezlenmesiyle sağlanır. Geleneksel tedavinin dezavantajları gözetilerek, AChE veya BChE'ın eksojen uygulamasının daha etkili olacağı düşünülmüştür[13].

Rekombinant DNA teknikleriyle asetilkolinesterazın kataliz gücünün artırılması

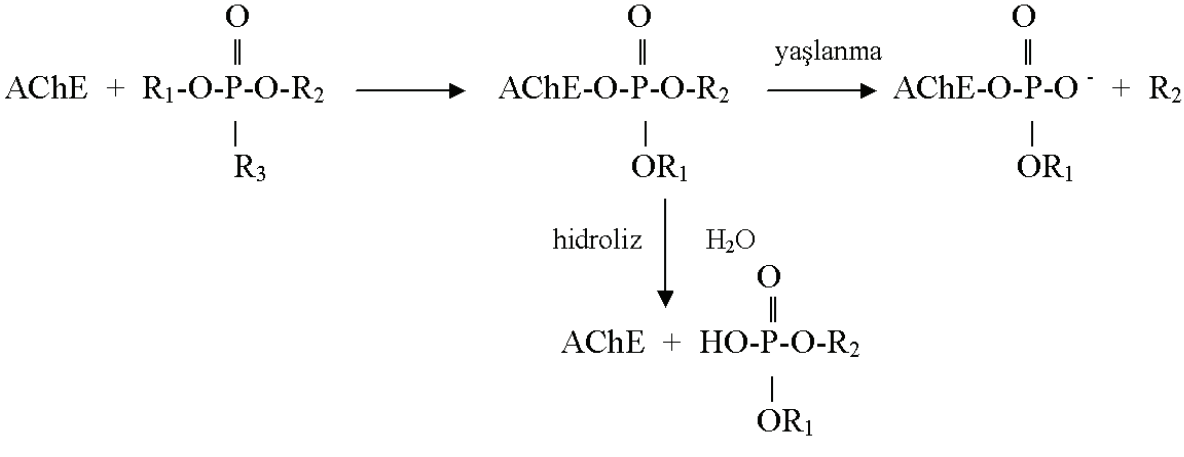
Asetilkolinesterazın kataliz ve yaşlanma mekanizmalarını çözebilmek için yapılan X-ray kristalografi ve bölge yönelimli mutagenez çalışmaları sonucunda enzimin aktif merkezinde bulunan bazı amino asit yan gruplarının çeşitli ligandların bağlanmasından sorumlu olduğu görülmüştür [5,14].

OPların hidrofobik karakteri nedeniyle AChE aktif merkezindeki aromatik halkaya sahip rezidulerin etkileşimi araştırılmış, Trp86Ala mutasyonunun vahşi tipe göre en az 1000 kat daha yavaş yaşlandığı gözlemlenmiştir. Triptofanın aromatik halkasının OPları katyon-π etkileşimleriyle stabilize ettiği, alanin mutasyonun bu etkileşimleri bozarak yaşlanmayı yavaşlattığı düşünülmüştür [15].

OPlarla inhibe olmuş enzimde yaşlanmaya neden olan dealkilasyonun pH'a olan bağımlılığı araştırılmış, Glu202 rezidusunun dealkilasyonu kolaylaştırdığı öngörülmüştür[16,17]. Sonrasında fare asetilkolinesterazında yaratılan Glu202Gln mutasyonunun soman ile yaşlanmaya büyük ölçüde dayanıklı olduğu bildirilmiştir[18]. Aktif serinin komşuluğunda yer alan Glu202'nin negatif yükünün, konjüge OP'dan alkil grubunun ayrılmasına yardımcı olduğu anlaşılmıştır[18].

Hidrofobik etkileşimleri bulunan diğer rezidular ise kolin bağlama bölgesinde bulunan Tyr337 ve Phe338 olup, OPların imidazol halkasını stabilize ederek yaşlanmaya katkıda bulunmaktadır. Bu rezidulerin alanin ile değiştirilmesi sonucu yaşlanmada belirgin yavaşlamalar elde edilmiştir [15,17,19].

Tyr337Ala mutasyonuna ek olarak açil cebinde bulunan, aromatik halkaya sahip Phe295 rezidusunun alifatik yan zincire sahip Leu ile yer değiştirilmesi sonucu fare AChE'ının HI6 aracılı reaktivasyonu yaklaşık 120 kat hızlanmıştır[19]. Ancak aynı mutasyonun (Phe295Leu/Tyr337Ala) insan AChE enzimine uygulanması sonucunda benzer sonuçlar elde edilememiştir[20] .



Şekil 3. Yaşlanma (aging) mekanizması

Asetilkolinesteraz enzimi stoikiyometrik bir biyotemizleyici olup, enzim başına bir molekül OP temizlemektedir. Bu kapasiteyi arttırmaya yönelik çalışmalar sonucunda elde edilen en önemli gelişme Tyr337Ala/ Phe338Ala çifte mutantı olup, Soman ile inhibe edilmiş enzimin HI6 aracılı reaktivasyon hızı vahşi tipe oranla 6 kat artmıştır[20].

Küçükkılınç ve arkadaşları tarafından enzimin aktif bölge oyuğunun dışında bulunan ve doğal bir SNP olan Asp134His mutasyonunun reaktivasyona etkileri çalışılmış, paraokson ile inhibe edilmiş enzimin 2PAM ile reaktivasyon hızında yaklaşık 6 kat artış gözlemlenmiştir[21].

Yüksek miktarlarda AChE üretimi ve yarı ömür problemi

OPlarla asetilkolinesteraz molar düzeyde bire bir oranında tepkidiğinden, enzimin biyotemizleyici olarak kullanılabilmesi için yüksek miktarlarda üretilmesi gereklidir. Bu amaçla insan asetilkolinesteraz enzimi rekombinant hücre kültürü teknikleri kullanılarak insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293), Escherichia coli ve bitkilerde eksprese edilmiştir[22-26]. Ancak deney hayvanlarında yapılan farmokokinetik çalışmalar ister memeli hücresinde ister bakteride eksprese edilmiş olsun dolaşımdaki yarı ömrünün çok kısa olduğunu göstermiştir[22,23]. Rekombinant enzimin yarı ömrünü uzatmak amacıyla AChE'ın post translasyonel modifikasyonları ve kandan nasıl temizlendiğine dair çalışmalar yapılarak, enzimin sialik asit içermesinin ve oligomerizasyonun AChE'nin dolaşımdaki ömrüne katkıda bulunduğu aydınlatılmıştır[27-29]. Chitlaru ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sializasyon ve tetramerizasyonun beraberinde N-glikan eklenmesinin rekombinant enzimin ortalama plazma ömrünü(mrt) neredeyse doğal serum kolinesterazı kadar uzatmıştır[30]. Ancak bu fazladan glikan yapılarının eklenmesi rekombinant AChE enziminin immünojenik niteliğini arttırmıştır[31-33]. Fare ve maymunda yapılan çalışmalarda enzimin lizin yan zincirlerine polietilen glikol eklenmesinin rekombinant enzimin hem farmakokinetik özelliklerini iyileştirdiğini hem de immün cevabı azalttığını göstermiştir[31,34-36].

İmmün cevabın önüne geçebilmek için denenen bir diğer yol da enzimin gen terapisi yoluyla vücut içinde ürettirilmesi olmuştur. Yöntem enzimin cDNA'sının vücut hücrelerine vektörler aracılığıyla sokularak, ilgili proteinin düzeyini arttırmayı kapsamaktadır. Bu amaçla AChE cDNA'sı adenovirus-ilgili virüs (AAV) vektörleri aracılığıyla farelerde ürettirilmiş, ancak sistemik enzim düzeyinde %15 kadar artış sağlanabilmiştir[37,38].

Sonuç ve geleceğe bakış

OPlara akut ve kronik maruziyet sonucu gelişen zehirlenmeler hem sivil hem de askeri topluluklar için önemli bir risk oluşturmaktadır. OP zehirlenmelerinin tedavisindeki yetersizlikler, alternatif yaklaşımların aranmasına neden olmuştur. Stoikiyometrik ve katalitik enzimlerin terapötik amaçlı kullanımını yeni bir yaklaşımdır. Asetilkolinesteraz enziminin enantioselektivitesi ve yavaş yaşlanması, onu biyotemizleyici çalışmaları için iyi bir hedef yapmaktadır. Literatürde günümüze dek yapılan çalışmalarda AChE'ın hem kataliz gücü arttırılmış hem de farmakokinetik özellikleri iyileştirilmeye çalışılmıştır. Tyr337Ala/ Phe338Ala çifte mutantı 6 kat hızlı reaktivasyon gücüyle şimdiye kadar tasarlanan en umut verici mutant olmuştur. Rekombinant enzime polietilen glikol eklenmesinin ise enzimin plazma yarı ömrünü arttırırken immünojenitesini ise azalttığı bildirilmiştir. Tüm bu çalışmalar AChE'ın terapötik bir biyotemizleyici olarak potansiyelini göstermiştir. Rekombinant enzimin büyük ölçekli üretiminin gerçekleştirilmesi, raf ömrünün uzatılması ve klinik çalışmalarının yakın zamanda tamamlanması beklenmektedir.

Bilgi ve teşekkür: Yrd.Doç. Dr. Oya Ünsal Tan'a asetilkolinesteraz enzimi aktif merkez oyuğunun MOE yazılımı aracılığıyla gösterimindeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çıkar çatışması: Yazarın çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

[1] diTargiani RC, Chandrasekaran L, Belinskaya T, Saxena A. In search of a catalytic bioscavenger for the prophylaxis of nerve agent toxicity. Chem-Biol Interact 2010; 187(1-3):349-354.

[2] Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette F-M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Progress in Neurobiology 1993; 41(1):31-91.

[3] Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. Science 1991; 253(5022):872-879.

[4] Barak D, Kronman C, Ordentlich A, Ariel N, Bromberg A et al. Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. J Biol Chem 1994; 269(9):6296-6305.

[5] Radic Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, Taylor P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. Biochemistry 1993; 32(45):12074-12084.

[6] Zhang Y, Kua J, McCammon JA. Role of the Catalytic Triad and Oxyanion Hole in Acetylcholinesterase Catalysis: An ab initio QM/MM Study. J Am Chem Soc 2002; 124(35):10572-10577.

[7] Pezzementi L, Johnson K, Tsigelny I, Cotney J, Manning E et al. Amino acids defining the acyl pocket of an invertebrate cholinesterase. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 2003; 136(4):813-832.

[8] Koellner G, Kryger G, Millard CB, Silman I, Sussman JL et al. Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from Torpedo californica. J Mol Biol 2000; 296(2):713-735.

[9] Aldridge WN, Reiner E. Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate. Biochem J 1969; 115(2):147-162.

[10] Fukuto TR. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. Environ Health Perspect 1990; 87:245-254.

[11] Barak D, Ordentlich A, Kaplan D, Barak R, Mizrahi D et al. Evidence for P-N bond scission in phosphoroamidate nerve agent adducts of human acetylcholinesterase. Biochemistry 2000; 39(5):1156-1161.

[12] Nachon F, Asojo OA, Borgstahl GE, Masson P, Lockridge O. Role of water in aging of human butyrylcholinesterase inhibited by echothiophate: the crystal structure suggests two alternative mechanisms of aging. Biochemistry 2005; 44(4):1154-1162.

[13] Doctor BP, Raveh L, Wolfe AD, Maxwell DM, Ashani Y. Enzymes as pretreatment drugs for organophosphate toxicity. Neurosci Biobehav Rev 1991; 15(1):123-128.

[14] Sussman J, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science 1991; 253(5022):872-879.

[15] Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Stein D, Ariel N et al. Aging of phosphylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. Biochem J 1996; 318(3):833-840.

[16] Ashani Y, Radic Z, Tsigelny I, Vellom DC, Pickering NA et al. Amino Acid Residues Controlling Reactivation of Organophosphonyl Conjugates of Acetylcholinesterase by Mono- and Bisquaternary Oximes. J Biol Chem 1995; 270(11):6370-6380.

[17] Ordentlich A, Kronman C, Barak D, Stein D, Ariel N et al. Engineering resistance to 'aging' of phosphylated human acetylcholinesterase Role of hydrogen bond network in the active center. FEBS Lett 1993; 334(2):215-220.

[18] Saxena A, Doctor BP, Maxwell DM, Lenz DE, Radic Z et al. The Role of Glutamate-199 in the Aging of Cholinesterase. Biochem Biophys Res Commun 1993; 197(1):343-349.

[19] Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E et al. Mutant Cholinesterases Possessing Enhanced Capacity for Reactivation of Their Phosphonylated Conjugates†. Biochemistry 2004; 43(11):3222-3229.

[20] Cochran R, Kalisiak J, Küçükkılınç T, Radić Z, Garcia E et al. Oxime-assisted Acetylcholinesterase Catalytic Scavengers of Organophosphates That Resist Aging. J Biol Chem 2011; 286(34):29718-29724.

[21] Küçükkilinç T, Cochran R, Kalisiak J, Garcia E, Valle A et al. Investigating the structural influence of surface mutations on acetylcholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and oxime reactivation. Chem-Biol Interact 2010; 187(1–3):238-240.

[22] Fischer M, Ittah A, Liefer I, Gorecki M. Expression and reconstitution of biologically active human acetylcholinesterase fromEscherichia coli. Cell Mol Neurobiol 1993; 13(1):25-38.

[23] Kronman C, Velan B, Gozes Y, Leitner M, Flashner Y et al. Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. Gene 1992; 121(2):295-304.

[24] Geyer BC, Muralidharan M, Cherni I, Doran J, Fletcher SP et al. Purification of transgenic plant-derived recombinant human acetylcholinesterase-R. Chem-Biol Interact 2005; 157–158(0):331-334.

[25] Velan B, Kronman C, Grosfeld H, Leitner M, Gozes Y et al. Recombinant human acetylcholinesterase is secreted from transiently transfected 293 cells as a soluble globular enzyme. Cell Mol Neurobiol 1991; 11(1):143-156.

[26] Mor TS, Sternfeld M, Soreq H, Arntzen CJ, Mason HS. Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants. Biotechnol Bioeng 2001; 75(3):259-266.

[27] Kronman C, Chitlaru T, Elhanany E, Velan B, Shafferman A. Hierarchy of post-translation modifications involved in the circulatory longevity of glycoproteins demonstration of concerted contributions of glycan sialylation and subunit assembly to the pharmacokinetic behavior of acetylcholinesterase. J Biol Chem 2000.

[28] Chitlaru T, Kronman C, Velan B, Shafferman A. Effect of human acetylcholinesterase subunit assembly on its circulatory residence. Biochem J 2001; 354(3):613-625.

[29] Kronman C, Chitlaru T, Elhanany E, Velan B, Shafferman A. Hierarchy of post-translational modifications involved in the circulatory longevity of glycoproteins. Demonstration of concerted contributions of glycan sialylation and subunit assembly to the pharmacokinetic behavior of bovine acetylcholinesterase. J Biol Chem 2000; 275(38):29488-29502.

[30] Chitlaru T, Kronman C, Velan B, Shafferman A. Overloading and removal of N-glycosylation targets on human acetylcholinesterase: effects on glycan composition and circulatory residence time. Biochem J 2002; 363(3):619-631.

[31] Chilukuri N, Sun W, Parikh K, Naik RS, Tang L et al. A repeated injection of polyethyleneglycol-conjugated recombinant human butyrylcholinesterase elicits immune response in mice. Toxicol Appl Pharmacol 2008; 231(3):423-429.

[32] Rosenberg Y, Luo C, Ashani Y, Doctor BP, Fischer R et al. Pharmacokinetics and immunologic consequences of exposing macaques to purified homologous butyrylcholinesterase. Life Sci 2002; 72(2):125-134.

[33] Matzke SM, Oubre JL, Caranto GR, Gentry MK, Galbicka G. Behavioral and immunological effects of exogenous butyrylcholinesterase in rhesus monkeys. Pharmacol Biochem Behav 1999; 62(3):523-530.

[34] Cohen O, Kronman C, Chitlaru T, Ordentlich A, Velan B et al. Effect of chemical modification of recombinant human acetylcholinesterase by polyethylene glycol on its circulatory longevity. Biochem J 2001; 357(3):795-802.

[35] Kronman C, Cohen O, Raveh L, Mazor O, Ordentlich A et al. Polyethylene-glycol conjugated recombinant human acetylcholinesterase serves as an efficacious bioscavenger against soman intoxication. Toxicology 2007; 233(1–3):40-46.

[36] Kronman C, Cohen O, Mazor O, Ordentlich A, Raveh L et al. Next generation OP-bioscavengers: A circulatory long-lived 4-PEG hypolysine mutant of F338A-HuAChE with optimal pharmacokinetics and pseudo-catalytic characteristics. Chem-Biol Interact 2010; 187(1–3):253-258.

[37] Li B, Duysen EG, Poluektova LY, Murrin LC, Lockridge O. Protection from the toxicity of diisopropylfluorophosphate by adeno-associated virus expressing acetylcholinesterase. Toxicol Appl Pharmacol 2006; 214(2):152-165.

[38 Hrabovska A, Duysen EG, Sanders JD, Murrin LC, Lockridge O. Delivery of human acetylcholinesterase by adeno-associated virus to the acetylcholinesterase knockout mouse. Chem-Biol Interact 2005; 157–158(0):71-78.