

Acetylcholinesterase에 대한 유기인산제 農藥의 抑制作用과 Oxime에 의한 再活性作用에 關한 研究

In Vitro Reactivation of Acetylcholinesterase Inhibited by Parathion and PAP

서울大學 醫科大學 藥理學教室

徐 維 憲 · 洪 思 岳

緒 論

Acetylcholinesterase는 여러組織에 광범위하게 分布되어 있으며 主로 細胞膜에 位置하고 있는 효소로서 (Kaplan等, 1963; Branley等, 1971) Leuzinger와 Baker(1967)에 의하여 Electriceel에서 처음으로 완전히 순수분리된 以來構造究明에 많은 進展을 보았다. 특히 이 효소는 여러 유기인산제 및 Carbamate제 農藥에 特異하게 抑制가 되며 普通狀態下에서는 不可逆性反應을 나타내어 臨床的으로 심각한 問題를 起起하고 있다. 1951년 Wilson이 hydroxylamine이 抑制된 효소를 再活性시키는 효과가 있음을 밝힌 以來로 여러 종류의 核好性化合物(Nucleophilic)이 同一한 機轉에 의해 再活性作用을 나타낸다는 것을 알게 되었으며 그중에서도 여러 Oxime제제가 가장 효과가 좋은 재활성제로 알려지고 있으나 현재 臨床에서의 사용은 활발히 되고 있지 못하다. 근래에 들어와 우리나라에서도 農藥에 의한 危害가 갈 수록 늘어가고 있는 것은 周知의 事實이다. 이에 본 저자는 우리나라에서 가장 널리 사용되고 있는 유기인산제 農藥 가운데서 2 가지를 택하여 이 효소에 미치는 抑制作用의 樣相을 比較해 보았으며 또 한 이 농약에 억제된 효소가 재활성제에 의해 재활성되는 程度와 樣相을 比較 實驗하여 보았다.

實驗材料 및 方法

1. 赤血球 Ghost 製造

건강인 10名으로 부터 선선헬액을 채취하여 EDTA 함유한 시험판에 넣고 $2,500 \times g$ 로 10분간 원침시키고 난 후 혈장과 buffy coat를 除去하기 위하여 0.9% 生理食鹽水로 3번 씻고 재원침 한후 적혈구만 分離시켰다. 이것을 가지고 Maddy(1966) 方法을 사용하여 Ghost

를 제조하였다. 即, 0.005M. phosphate buffer(pH 7.4) 5배를 넣고 溶血시킨 다음 $20,000 \times g$ 로 4°C 에서 원침시켜 Hb이 上層液에서 없어질 때까지 완충액으로 数次 씻고 재원침시켜 Ghost를 얻었으며 Lowry(1951) 方法에 의하여 단백양을 측정하였다.

2. 試薬 및 使用藥物

기질 : Acetylthiocholine iodide (Asch I, Sigma 회사제)

억제제 : 0,0-diethyl-o-p-nitrophenol thiophosphate(95%) (parathion, 한국농약제)

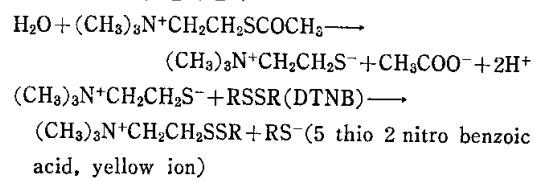
Ethyl ester of 0,0-dimethyl dithiophosphoryl phenyl acetic acid (95%) (PAP, 한국농약제)

재활성제 : 1-methyl pyridium 2-aldoxime iodide (2-PAM, Sigma 회사제)

변색시약 : 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoicacid (DTNB, Sigma 회사제)

3. Acetylcholinesterase活性度 測定方法

Automatic recording spectrophotometer(Gilford 회사제, Model 250)를 사용하여 Ellman(1961) 方法에 의하여 412nm, 25°C , pH 7.4에서 활성도를 측정하였다. 다음의 反應式이 일어난다.



활성도는 international unit (μ moles per min per ml)로 표시된다.

4. Acetylcholinesterase值 測定

단백농도가 $2.5\text{mg}/\text{ml}$ 되도록 회색한 Ghost $50\mu\text{l}$ 를 10^{-2}M DTNB $50\mu\text{l}$ 를 含有한 0.1M , phosphate buffer (pH 7.4) 3ml 에 넣은 다음에, $7.5 \times 10^{-2}\text{M}$, Asch I 용액 $25\mu\text{l}$ 를 넣어서 측정하였다.

5. 抑制實驗

A) parathion에 의한 억제

parathion을 에타놀에 녹여 4.3×10^{-2} M의 표준용액을 만들었다. 이 용액 5 μ l 및 10 μ l씩 取하여 7.5×10^{-2} M의 Asch I 25 μ l와 함께 DTNB와 赤血球 Ghost가 들어 있는 3ml의 Cell에 넣어 時間에 따른 효소활성도의 변화를 관찰하였다. (최종농도; 7×10^{-5} M 및 1.4×10^{-4} M) 또한 위의 parathion 표준용액을 0.5 μ l 및 5 μ l씩 取하여 Ghost와 완충액과 DTNB가 들어 있는 2ml의 용액에 넣고 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 60분, 120분동안 각각 incubation시킨 후 Asch I 25 μ l를 넣어서 前處置시킨 시간에 따른 효소활성도의 억제를 觀察하였다. (최종 parathion 농도; 1.1×10^{-5} M 및 1.1×10^{-4} M)

B) PAP에 의한 抑制

PAP를 에타놀에 녹여 3.1×10^{-2} M의 표준용액을 만들었다. 이 용액 5 μ l 및 10 μ l를 取하여 효소와 DTNB가 들어 있는 3ml Cell에 넣은 다음 시간에 따른 활성도의 억제를 관찰하였다. (최종농도; 5×10^{-5} M 및 1×10^{-4} M) 또한 위의 표준용액 0.5 μ l와 5 μ l를 取하여 Ghost와 완충액과 DTNB가 들어 있는 2ml의 용액에 넣어 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 60분, 120분 동안 incubation 시킨 후 Asch I 25 μ l를 넣어 前處置시킨 時間に 따른 효소활성도의 억제를 관찰하였다. (最终농도; 7.5×10^{-6} M 및 7.5×10^{-5} M)

6. 再活性實驗

4.3×10^{-2} M의 parathion 용액과 3.1×10^{-2} M의 PAP 용액을 10 μ l씩 取하여 Ghost와 완충액과 DTNB가 들어 있는 5ml의 용액에 넣어, 40분(parathion) 20분(PAP) 씩 각각 효소를 억제시킨 다음 8×10^{-2} M의 2-PAM 용액 5 μ l와 20 μ l를 넣어 10분, 30분, 60분, 120분 後의 再活性度를 측정하였다. (2-PAM 最終농도; 2×10^{-4} M 및 8×10^{-4} M) 再活性제를 넣지 않은 억제용액을 Control로 사용했다.

實驗結果

1. Acetylcholinesterase值

10名의 赤血球膜의 효소활성도는 $11.85 \pm 1.80 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ 였다.

2. 억제실험

A) parathion에 의한 抑制

parathion과 효소의 前處置없이 實施한 억제 실험에서 보면 7×10^{-5} M의 parathion 사용했을 때는 30초에 82.3%의 억제가 나타으며 2분에 83.4%, 10분에 85.7

%, 15분에 86.1%, 20분에 87.7%, 30분에 89.5%, 35분에 91.7%, 45분에 94.5%, 50분에 96.3%의 억제가 나타났다. (Fig. 1) 1.4×10^{-4} M. 사용하였을 때는 30초에 82.0%, 2분에 83.4%, 6분에 84.9%, 10분에 86.1%, 15분에 88.9%, 20분에 89.6%, 30분에 92.9%, 45분에 96.7%, 50분에 97.0%의 억제를 나타내어서 높은 수록 억제가 심했으며 時間에 따라서 직선의 경향을 나타내었다. (Fig. 1)

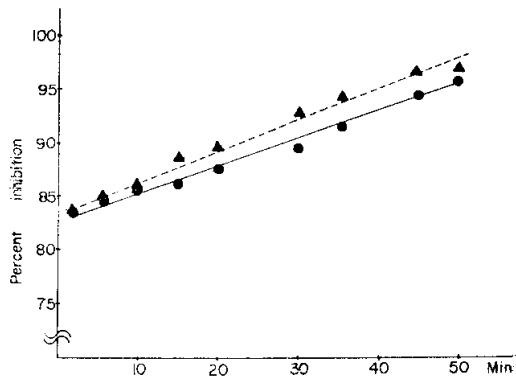


Fig. 1. Inhibition curve by parathion without preincubation of inhibitor and Enzyme at pH 7.4, 25°C.

●—● parathion 7×10^{-5} M
▲—▲ parathion 1.4×10^{-4} M

parathion과 효소를 前處置시킨 후에 측정한 抑制率은 1.1×10^{-5} M을 사용하였을 때는 5분대가 25%, 10분대가 33.4%, 30분대가 58.3%, 60분대가 75.0%, 120분대가 91.7%의 억제가 나타났으나 1.1×10^{-4} M의 parathion 사용 때는 5분대가 80%, 10분대가 92.9%, 15분대가 94.0%, 20분대가 95.8%, 30분대가 97.3%의 억제가 나타나서 역시 높은 수록 억제율의 증가가 있었으며 시간에 따라서 hyperbolic curve를 나타내었다. (Fig. 3)

B) PAP에 의한 抑制

PAP와 효소를 前處置하지 않고 實施한 실험에서 보면 5×10^{-6} M의 PAP를 사용하였을 때는 30초에 82.6%, 2분에 83.4%, 6분에 90.0%, 10분에 91.7%, 15분에 92.8%, 20분에 94.8%, 30분에 97.0%, 35분에 98.2%의 억제를 나타내었으며, 1×10^{-4} M의 PAP로 억제시켰을 때는 30초에 88.2%, 2분에 90.0%, 6분에 94.5%, 10분에 97.0%, 15분에 98.3%의 억제를 나타내었으며 parathion과 마찬가지로 높은 수록 억제정도의 증가가 있었으나 parathion보다는 抑制정도가 심

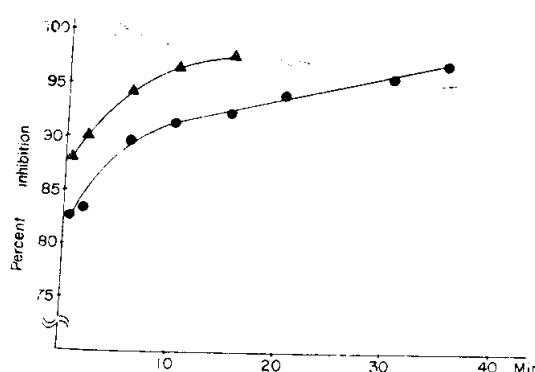


Fig. 2. Inhibition curve by PAP without preincubation of inhibitor and Enzyme at pH 7.4, 25°C.

●—● PAP $5 \times 10^{-5} M$
▲—▲ PAP $1 \times 10^{-4} M$

하고 더 빠르게 나타났다. PAP와 효소를 前處置시킨 후에 测定한 抑制率은 $7.5 \times 10^{-6} M$ 인 경우에는 5분대가 65.3%, 10분대가 70%, 30분대가 75%, 60분대가 79.2%, 120분대가 83.4%의 억제가 나타났으며 $7.5 \times 10^{-5} M$ 을 사용하였을 때는 5분대가 91.6%, 10분대가 93.0%, 15분대가 94.5%, 20분대가 95.8%, 30분대가 98.0%의 抑制를 나타내어 parathion보다 더 强하게 나타났다. (Fig. 2 및 Fig. 3)

3. 再活性實驗

$8 \times 10^{-5} M$ 의 parathion으로 억제시킨 후 50분만에 93.4%의 억제가 나타났으며 $2 \times 10^{-4} M$ 의 2-PAM을 넣어 재활성시킨 후 10분후에는 50%의 抑制가 나타났으며, 30분후에는 33.4%의 억제가, 60분후에는 44.0%의 억제가, 120분후에는 50.0%의 억제가 나타나서 30분을 지나서 부터는 재활성 정도가 약간씩 하강하기 시작하였다. $8 \times 10^{-4} M$ 의 2-PAM을 사용하였을 때는 10분후가 33.4%의 억제를, 30분후가 17.4%의 억제를 60분

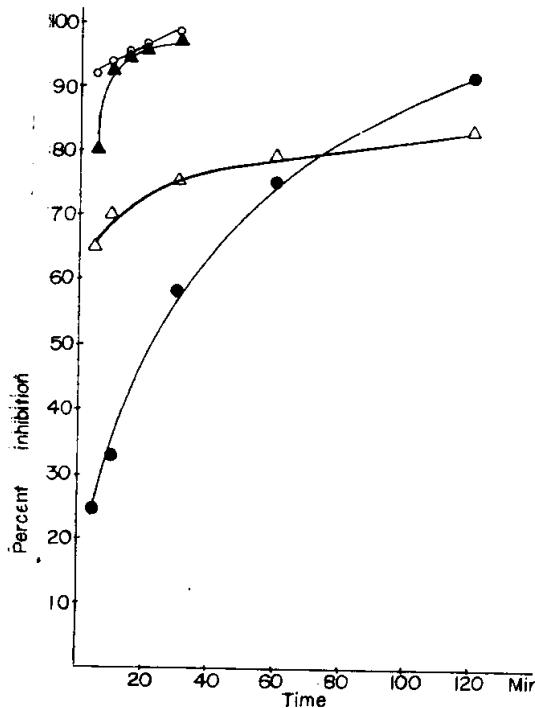


Fig. 3. Inhibition curve as a function of preincubation time at pH 7.4, 25°C.

●—● parathion $1.1 \times 10^{-5} M$
▲—▲ parathion $1.1 \times 10^{-4} M$
○—○ PAP $7.5 \times 10^{-6} M$
△—△ PAP $7.5 \times 10^{-5} M$

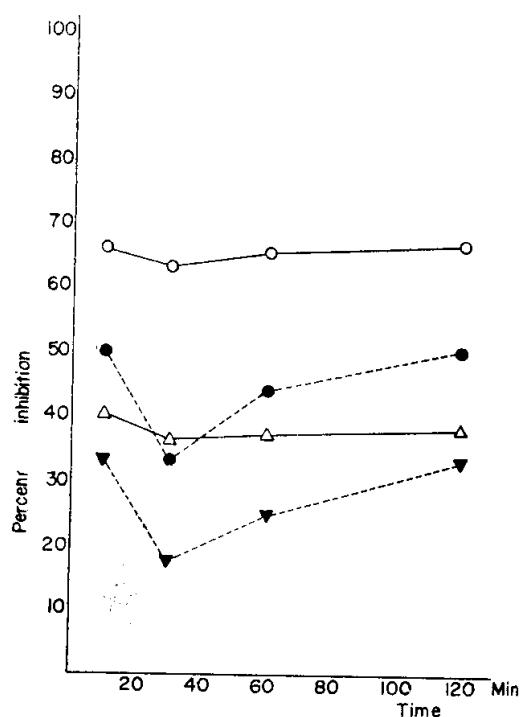


Fig. 4. Reactivation of parathion- or PAP-inhibited RBC by 2-PAM at pH 7.4, 25°C.

●—● para-inhibited enzyme + 2-PAM ($2 \times 10^{-4} M$)
▲—▲ para-inhibited enzyme + 2-PAM ($8 \times 10^{-4} M$)
○—○ PAP-inhibited enzyme + 2-PAM ($2 \times 10^{-4} M$)
△—△ PAP-inhibited enzyme + 2-PAM ($8 \times 10^{-4} M$)

후가 25.0%의 억제를, 120분후가 33.4%의 억제를 나타내어서 역시 30분을 지나서부터는 재활성화 정도가 하강하기 시작하였다.

6×10^{-5} M의 PAP로 抑制시킨 후 30분만에 94.5%의 억제를 나타내었으며, 2×10^{-4} M의 2-PAM을 넣고 10분후에 측정한 활성도의 억제는 66.5%, 60분후의 억제는 65.7% 120분후의 억제는 66.7%를 나타내어 역시 30분을 지나서부터는 회복하는 정도가 하강하였다.

Table 1. Reactivation of parathion-or PAP-inhibited Erythrocyte by 2-PAM, at pH 7.4, 25°C.
(Enzyme preinhibited at 25°C for 40min. by parathion and for 20min. by PAP)
(% Inhibition)

Time after addition of 2-PAM(min.)	Parathion-inhibited enzyme			PAP-inhibited enzyme		
	Control	+2-PAM (2×10^{-4} M)	+2-PAM (8×10^{-4} M)	Control	+2-PAM (2×10^{-4} M)	+2-PAM (8×10^{-4} M)
10	93.4%	50.0%	33.4%	94.5%	66.5%	40.0%
30	96.7%	33.4%	17.4%	96.7%	63.4%	36.0%
60	97.2%	44.0%	25.0%	97.2%	65.7%	36.8%
120	97.6%	50.0%	33.4%	97.2%	66.7%	37.5%

考 按

1939년 Nachmanshon과 Lederer가 전기조직에서 처음으로 多量 發見했던 Acetylcholinesterase는 현재 物理·化學的 特性에 대하여 많은 研究가 進行되고 있다. 그중에서도 아미노산 配列에 있어서는 Butyryl cholinesterase보다 Valine, methionine, tyrosine이 많이 包含되어 있으나 Serine, glutamic acid, glycine, alamine은 적게 함유되어 있는 것으로 알려지고 있다. (Augustinsson, 1971) 20년전 Wilson이 active center는 Anionic site와 esteratic site로 구성되어 있다고 주장하였으며 현재 anionic site는 glutamic acid로 구성되어 110~150Å 크기의 이온을 포용할 수 있는 주머니 모양이라고 밀고 있으며, 혈장 cholinesterase가 Van der Waals force로 결합을 구성할 수 있는 대신에 Acetylcholinesterase는 Coulombic force에 의해 결합이 이루어 진다고 밀고 있다. (Augustinsson, 1971; Brimblecombe, 1974; Kitz, 1973) 反面에 esteratic site는 serine이 鹽基部를, tyrosine이 酸基部를 이루고 있다고 밀고 있다(Augustinsson, 1971; Kitz, 1973) Edrophonium, tetramethyl ammonium ion 等의 anionic subsite 억제제로 作用하며, 유기인산제, carbamate제제, methane sulfonate제제 등이 esteratic subsite 억제제로 作

8×10^{-4} M의 2-PAM으로 재활성시킨 경우는 10분후가 40.0%의 억제를, 30분후가 36.0%의 억제를, 60분후에는 36.8%의 억제를, 120분후에는 37.5%의 억제를 나타내어 30분후가 최고도의 활성도회복률을 나타내었고, 以後는 하강의 경향을 보았다. Control 억제는 94.5%, 96.7%, 97.2%, 97.2%를 보여서 괄목할 만한 自動再活性은 관찰되지 않았다(Table 1 및 Fig. 4).

用하고 있다. 효소와 정상기질(Ach E)의 作用기전과 같이 유기인산제의 'P'는 전자가 비교적 결합되어 있어서 이 효소의 esteratic site에 있는 비교적 전자가 풍부한 serine의 'O'에 공격해서 不可逆性的 인산화를 이루어 된다고 생각되고 있다. 大部分의 學者들은 비상경적 억제제로 보고 있으나, Kitz等(1973)은 active site에서 정상기질과 경쟁적으로 결합하여 상경적 억제 양상도 나타난다고 주장했다. 본실험에서는 生體에서의 中毒課程과 비슷하게 미리 효소를 억제시킨 후, 기질을 넣은 실험과 실험관내에 억제제와 기질을 동시에 넣어서施行한 實驗을 따로 實施하여 그 억제효과를 관찰하였는바, 前者の 경우에서는 後者の 경우보다 active sitz에 強한 결합력을 가진 억제제가 미리, 경쟁 없이 결합되어, 견고하고 안정된 억제화합물을 이를 수 있어서 抑制효과가 약간 높았다고 생각된다.

Kitz等(1973)은 억제제의 유리반응群의 구조에 따라 활성도의 억제가 좌우된다고 하였다. Metcalf等(1965), Durden 및 Weiden(1969), Nikles(1969)等은 유리反應群(leaving group)이 O-化合物로 되어 있는 것 보다 S-化合物로 되어 있는 것이 5~10배 抗 cholinesterase 作用이 강하다고 말했다. 即, 그들은 S를 가진 phenyl基에서 이 'S'가 極性化가 증가되어 部分의 양성전위를 가지게되어 anionic site에 대한 결합력이 강하게 되는 것이 原因이라고 말했다. 본실험에서도 S-

phenyl을 가진 PAP이 O-phenyl을 가진 parathion보다 억제정도가 빨리, 더 강하게 나타났다. Heath (1961)는 2×10^{-4} M의 parathion으로 50%의 억제를 나타내었고, 10^{-6} M의 paraoxon으로 같은 효과를 나타내었다. parathion은 肝의 microsome에서 paraoxon으로 변환뿐 아니라 자외선이나 熱을 加해도 paraoxon, S-phenyl이 성체, S-ethyl이 성체등의 보다 極性이 큰 產物로 酸化될 수 있다고 하였다. (Dauterman, 1971) 본실험에서는 10^{-4} M의 parathion을 사용하였을 때 최고 97%의 억제가 나타나서 Heath의 경우보다 높았는데, 이것도 위의 원인이 관계하리라 생각된다. 억제효소의 재활성은 Nucleophile의 음이온이 'P'에 核好性공격을 해서 생긴다고 보고 있으며, hydroxamic acid와 Oxime이 이런作用을 하는 대표적 약물이다. 본실험에서는 2-PAM을 넣은지 30분에 최고의 활성도의 회복을 보이다가 서서히 하강의 양상을 보였다. 이의 原因으로는 다음의 몇 가지를 생각할 수 있다. 첫째, 인산화 Oxime이 다시 효소를 재억제한 경우이다. Rogne (1967), Barstad (1969), Hackley等(1959)은 인산화 Oxime은 매우 強力한 抗 cholinesterase作用을 가지고 있다고 主張하였으며, Schoene(1972)는 paraoxon과 toxogenin(4-PAM 유도체)의 化合物이 paraoxon보다 10배 강한 억제효과를 나타낸다고 하였으며, Zech等 (1967), Fonuum (1975)은 弱한 억제제와 Oxime이 結合하면 비교적 안정해서 상당한 억제를 미칠 수 있다고 하였으며, 이는 2-PAM 유도체보다 4-PAM 유도체에서 더 문제가 될다고 하였다. 그러나 인산화 Oxime은 경우에 따라 강력한 억제제로서 역활은 가능하나 매우 不安定해서 대다수는 不活性物質인 Oxime과 alkylphosphonic acid로 분해되는 것 같다. (Fonuum, 1975)

둘째, Ageing을 생각할 수 있다. 대개는 24시간以上 경과후에 나타나는 것이 많다. Ageing의 機轉은 잘 모르나 'dealkylation'으로 생각하는 學者가 많다. (Kitz, 1971; Harris等, 1966; Loomis等, 1966; Wilson, 1971) 그러나 Larson (1953)은 alkoxy基에 dimethylalido基가 떨어져 나가서 Ageing 현상이 생긴다고 하였다.

結論

赤血球 Ghost에서 얻어진 Acetylcholinesterase에 parathion과 PAP를 作用시켜 농도 및 시간에 따른 효소의 抑制樣態와 2-PAM을 加하여 생긴 再活性樣態를 比較實驗하여 다음의 結果를 얻었다.

1. 測定한 효소활성도는 $11.85 \pm 1.80 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}^{1/2}$ 였다.

2. 미리 효소를 억제시킨 경우가 억제 안시킨 경우보다 효소활성도의 억제가 약간 크게 나타났다.

3. parathion보다 PAP이 더 강하게 효소를 억제시켰다.

4. 높은 농도에서 활성도의 회복이 높았으며, 2-PAM의 치료효과를 나타낼 수 있는 빙주의 농도에서는 parathion에 의해 미리 억제된 경우는 82.6%의 활성도의 회복이 있었고, PAP에 의해 억제된 경우는 64.0% 까지만, 회복되었다. 8×10^{-4} M이하의 2-PAM 사용時는 不完全한 회복이 나타났다.

5. 재활성도가 2-PAM의 농도에 不拘하고 2-PAM을 넣은지 30분에 最高度를 나타내다가 그 以後는 약간 감소를 나타내었다.

6. 실험관찰시간동안에는 자동적 재활성현상이 뚜렷이 관찰되지 않았다.

以上의 結果로 보아 S-phenyl基를 유리反應群으로 가진 PAP가 O-phenyl基를 유리反應群으로 가진 parathion보다 抑制能力이 強했으며, 인산화 Oxime이 再活性課程에서 生成되어 효소를 再抑制 시킬 수 있다고 생각되는 바이다.

—ABSTRACT—

In Vitro Reactivation of Acetylcholinesterase Inhibited by Paration and PAP

Yoo Hun Suh, M.D., Sa Ack Hong, M.D.

Department of Pharmacology, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul, Korea

Cholinesterase in human blood cells and plasma are inhibited in varying degrees by organophosphorus insecticides and nerve agents through phosphorylation. The phosphorylated enzymes can often be reactivated by nucleophilic compounds such as oximes and hydroxamic acids provided conversion of inhibited enzyme to a nonreactive form(aging) has not occurred.

In this work, the effects of organophosphorus insecticides (Parathion and PAP) on membrane-bound acetylcholinesterase from human erythrocyte 'ghosts' were studied by using automatic recording spectrophotometer according to the method of Ellman et al.

Also, the influence of the oxime upon reactivation was studied.

1. There was a concentration dependent inhibition of acetylcholinesterase by parathion and PAP. The inhibition of acetylcholinesterase by PAP was shown to be more rapid and complete than that by parathion.

2. Decreasing the concentration of 2-PAM below 8×10^{-4} M resulted in incomplete reactivation. At therapeutic concentration of 2-PAM, 82.6% of the enzyme activity was restored in parathion-inhibited enzyme, and 64.0% in PAP inhibited enzyme.

3. In vitro reactivation by 2-PAM of PAP inhibited cholinesterase was shown to be more difficult than that of parathion-inhibited cholinesterase.

4. Maximal reactivation of inhibited acetylcholinesterase was noted 30 minutes after addition of 2-PAM and thereafter the degree of reactivation decreased.

5. No spontaneous reactivation was noticed during the time of the experiment.

It was concluded that the rate and ease of inhibition and reactivation are dependent on the bulk of the side chain(leaving group), and the phosphorylated oximes may act as anticholinesterase.

REFERENCES

- Aloni, B. and A. Livne: *Acetylcholinesterase as a probe for erythrocyte membrane intactness*, *Biochim. Biophys. Acta*, 339:359-366, 1974.
- Ashani, Y., P. Nins, I.B. Wilson: *The inhibition of cholinesterase by diethyl phosphorochloridate*, *Biochim. Biophys. Acta*, 284:427-434, 1972.
- Augustinsson, K.B.: *Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterase*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44:81-89, 1971.
- Barstad, J.A.B., G. Lilleheil and T.J. Skobba: *Phosphorylated oximes*. *Arch. Int. Pharma. Ther.*, 179: 352-363, 1969.
- Berman, G.D.: *Structural properties AchE. from Eel electric tissue and bovine erythrocyte membranes*. *Biochemistry*, 12:9, 1973.
- Braid, P.E., M. Nix: *The kinetic constants for the inhibition of AchE. by phosdrin, Sumioxon, DDVP and phosphamidon*. *Canadian J. of Biochemistry*, 47:1-6, 1969.
- Brimblecombe, R.W.: *Drug actions on cholinergic systems. Anticholinesterase agents*. University Park Press, 64-132, 1974.
- Dauterman, W.C.: *Biological and nonbiological modifications of organophosphorus compounds*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 44:133-150, 1971.
- Ellman, G.L., K.D. Courtney, and V. Andres, Jr.: *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochemistry, Pharm.* 7:88-95, 1961.
- Fassett, D.W., D.D. Irish: *Industrial hygiene and toxicology*. 2nd edition Vol.II Interscience publisher, 1935-1958, 1963.
- Featherstone, R.M.: *A guide to Molecular Pharmacology and Toxicology part I*. Marcel Dekter, Inc. New York, 333-373, 1973.
- Fonnum, F.: *Phosphorylated oximes a problem in therapy. Cholinergic mechanisms*. Raven Press, 401-403, 1975.
- Goldstein, A., Aronow. and S.M. Kalman: *Principles of drug action, Molecular mechanisms of drug action*. Wiley international publication, 2nd edition. 7-30, 1974.
- Hackley, B.E. Jr., B.M. Steinberg, and J.C. Lamb: *Formation of potent inhibitors of AchE. by reaction with pyridinaldoximes with isopropyl methyl phosphonofluoridate (GB)*. *Arch. Biochem. Biophys.* 80: 211-214, 1659.
- Harris, L.W., J.H. Fleisher, J. Clark, and W.J. Cliff: *Dealkylation and loss of capacity for reactivation of cholinesterase inhibited by sarin*. *Science*. 154:404-407, 1966.
- Heath, D.F.: *Organophosphorus poisons*. Pergamon Press. Oxford and New York, 54, 1961.
- Heilbronn, E.: *In vitro reactivation and aging of tabun inhibited blood cholinesterases*. *Biochem. Pharm.* 12: 25-35, 1963.
- Holmstedt, B.: *Distribution and determination of cholinesterase in mammals*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44:99-107, 1971.
- Lonomis, T.A., D.D. Johnson: *Ageing and reversal of*

- soman induced effects on neuromuscular function with oximes in presence of dimethyl sulfoxide. *Toxi. Appl. Pharm.* 8:533-539, 1966.
- Loomis, T.A., B. Salafsky: Antidotal action of pyridinium oxime in anticholinesterase poisoning. Comparative effects of soman, sarin, neostigmine on neuromuscular function. *Toxicol. and Appl. Pharm.* 5:685-701, 1963.
- Lowry, O.H., M.J. Rose Brough, A.L. Farr, and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 163:265, 1951.
- Maddy, A.H.: The properties of the plasma membrane of ox erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 11:193-200, 1966.
- Metcalf, R.L.: Structural activity relationships for insecticidal carbamates. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44: 43-78, 1971.
- O'Brien, R.D.: Toxic phosphorus esters. Academic Press. New York & London, 1960.
- Rogne, L.: The reaction of AchE. with phosphorylated oximes. *Biochem. Pharm.*, 21:163-170, 1967.
- Schoene, K.: Reaktivierung von O,O-diethyl phosphoryl acetylcholinesterase. *Biochem. Pharm.*, 21: 163-170, 1972.
- Sidell, F.R., W.A. Groff: The reactivity of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* 27:241-252, 1974.
- Weyand, F.C., V.L. Bowers: Determination of cholinesterase activity. Manual and automated methods. Department of the Army Technical bulletin. Headquarters, Department of the Army, 1975.
- Wilson, L.B.: The possibility of conformational changes in acetylcholinesterase. Cholinergic ligandinteractions. Academic Press, 1-20, 1971.
- Zech, R., H. Engelhard, and W.D. Erdman: Phosphorylation of ChE. by various organophosphates in the presence of oximes. Proceeding of the conference on the structure and reactions of DFP sensitive enzymes. FDA, Stockholm, 179, 1967.