

# Hodnocení reaktivační účinnosti vybranných reaktivátorů paraoxonem inhibované acetylcholinesterasy *in vitro*

HOLAS O.<sup>1</sup>, MUSÍLEK K.<sup>1,2</sup>, OPLETALOVÁ V.<sup>1</sup>, KUČA K.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

<sup>2</sup>Univerzita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Katedra toxikologie

<sup>3</sup>Univerzita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Centrum pokročilých studií

Došlo 15. listopadu 2009 / Přijato 4. ledna 2010

## SOUHRN

### Hodnocení reaktivační účinnosti vybranných reaktivátorů paraoxonem inhibované acetylcholinesterasy *in vitro*

Organofosforové pesticidy (OFP) patří do skupiny vysoce toxických ireverzibilních inhibitorů acetylcholinesterasy (AChE). Kauzálními léčivy při intoxikacích OFP jsou oximové reaktivátory AChE. Reaktivační účinnost pěti nově připravených bispyridiniových reaktivátorů acetylcholinesterasy byla otestována na modelu paraoxonem inhibovaného enzymu. Reaktivační účinnost byla testována za pomoci standardního *in vitro* testu, kde byl jako zdroj acetylcholinesterasy použit homogenát mozku laboratorního potkana. Výsledky byly porovnány s pěti komerčně dostupnými reaktivátory AChE.

**Klíčová slova:** acetylcholinesterasa – organofosforový pesticid – reaktivátor – *in vitro* – SAR

Čes. slov. Farm., 2010; 59, 18–22

## SUMMARY

### Evaluation of the reactivating efficacy of selected reactivators of paraoxon-inhibited acetylcholinesterase *in vitro*

Organophosphorus pesticides (OPs) are ranked among the group of highly toxic irreversible inhibitors of acetylcholinesterase (AChE). The causal drugs in OPs intoxications are oxime reactivators of AChE. The reactivating efficacy of five newly prepared bispyridinium reactivators of acetylcholinesterase was tested on a model of a paraoxon-inhibited enzyme. The reactivating efficacy was tested by means of the standard *in vitro* test, the laboratory rat brain homogenate being used as the source of acetylcholinesterase. The result were compared with five commercially available AChE reactivators.

**Key words:** acetylcholinesterase – organophosphorus pesticide – reactivator – *in vitro* – SAR

Čes. slov. Farm., 2010; 59, 18–22

Má

## Úvod

První organofosforové inhibitory acetylcholinesterasy (OFI) byly vyvinuty pro vojenské účely jako bojové chemické látky (BChL) v Německu ve třicátých letech 20. století. Mezi tyto sloučeniny, označované také jako

nervově paralytické látky (NPL), patří např. sarin (GB; *O*-isopropylmethylfluorofosfonát), soman (GD; *O*-pinakolylmethylfluorofosfonát), tabun (GA; *O*-ethyl-diethylamidokyanofosfát), cyklosarin (GF; cyklohexylmethylfluorofosfonát) a látka VX (*O*-ethyl-S-2-(diisopropylamino)ethyl-methylthiofosfonát). Struk-

### Adresa pro korespondenci:

PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany – Katedra toxikologie

Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

e-mail: musilek@pmfhk.cz

turně velmi podobné látky jsou používány i jako pesticidy pro zemědělské účely, např. chlorpyrifos (*O,O*-dimethyl-*O*-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)-thiofosfát), parathion (*O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrofenyl)-thiofosfát) atd. Průmyslově se řada méně toxických OFI využívá jako změkčova-del nebo inhibitorů hoření<sup>1-4</sup>). Mefrifonát (*O,O*-dimethyl-(2,2,2-trichlor-1-hydroxyethyl)-fosfonát) našel uplatnění při léčbě Alzheimerovy nemoci<sup>5</sup>). OFI mohou být potenciálním nebezpečím díky své snadné dostupnosti<sup>6</sup>).

OFI inhibují ireverzibilně enzym acetylcholinesterasu (AChE, E.C. 3.1.1.7). Toxicita OFI je založena na ireverzibilní fosforylaci, resp. fosfonylaci aktivního místa enzymu (Ser 203)<sup>2</sup>). Inhibovaný enzym není schopný štěpit neuromediátor acetylcholin, který se hromadí v centrálním i periferním nervovém systému a dochází k hyperstimulaci nervových receptorů. Od lokalizace a druhu receptorů se odvíjejí akutní účinky zasažení OFI, jedná se o příznaky nikotinové, muskarinové a centrální. Muskarinové příznaky se projevují miónou, zhoršením akomodace čočky, zvýšeným slzením a sliněním, zúžením bronchů, hypersekrecí bronchiálních žlázek, zvýšenou motilitou střev, poklesem krevního tlaku, bradykardií atd. Nikotinovými příznaky jsou svalová slabost a svalové fascikulace, které postupně přecházejí v tonicko-klonické křeče nebo až v celkovou paralýzu přičně pruhovaného svalstva. Příznaky centrální se projevují bolestí hlavy, úzkostí, neklidem, závratěmi, zmateností atd. Bezprostřední riziko pro osobu zasaženou OFI představuje akutní respirační insuficience daná útlumem dýchacího centra v prodloužené míše a následnou paralýzou dýchacích svalů. Pokud zasažená osoba překoná cholinergní krizi, nastupuje těžká chronická intoxikace způsobená metabolickým rozvratem v důsledku hypoxie a acidózy. Tento stav je charakterizován zvýšenou únavou, poruchami spánku, emoční labilitou a depresiemi. Při akutní intoxikaci se mohou organofosfáty (zejména pesticidy) ukládat do depotních tukových tkání. Při odbourávání těchto dep hrozí opětovné vyplavení organofosfátů do systémového oběhu<sup>7,8</sup>). Některé OFI odvozené od kyseliny thiofosforečné jsou méně toxické než jejich kyslíkaté analogy. Jejich přeměna na toxičtější oxoderiváty (s větší afinitou k AChE) probíhá v krevní plazmě a jaterní tkáni, jedná o tzv. letální syntézu (např. metabolická aktivace parathionu na paraoxon)<sup>9,10</sup>).

K léčbě intoxikací OFI se používá řada prostředků. Osobám potenciálně ohroženým zasažením OFI (např. vojáci) se podávají reverzibilní inhibitory AChE (např. pyridostigmin) sloužící k blokování aktivního místa AChE<sup>11</sup>). Standardní léčba se skládá z podání anticholinergního léčiva (přednostně se používá atropin), které antagonizuje působení nahromaděného ACh na receptorech, reaktivátoru AChE a diazepamem i.m. jako antikonvulzivem. Reaktivátory AChE jsou sloučeniny schopné nukleofilně štěpit kovalentní vazbu mezi OFI a aktivním místem enzymu a obnovit jeho fyziologickou funkci<sup>1,2,9</sup>). Ve své molekule nesou obvykle 1–2 nukleofilní oximové skupiny<sup>12</sup>). Ke komerčně dostupným reaktivátorům patří pralidoxim (1. 2-PAM, 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium-chlorid), trime-

doxim (2. bis-1,3-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propan-dibromid), obidoxim (3. 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan-dichlorid), HI-6 (4. 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan-dichlorid) a methoxim (5. bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-methandichlorid)<sup>13</sup>).

Vzhledem k velké variabilitě OFI neexistuje jeden univerzální reaktivátor schopný uspokojivě reaktivovat AChE inhibovanou všemi typy OFI<sup>14</sup>). Navíc po expozici OFI dochází k dealkylaci, popř. deaminaci komplexu AChE-OFI. Takto změněný komplex již není reaktivovatelný. Tento proces se nazývá stárnutí enzymu (tzv. „aging“)<sup>15,16</sup>). Účinnost reaktivátorů je mimo jiné dána i rychlostí, s jakou dochází ke stárnutí enzymu. Stárnutí NPL probíhá nejrychleji u somanu, u OFI pesticidů dochází ke stárnutí v řádu hodin<sup>17</sup>).

---

## CÍL PRÁCE

---

V současné době používané reaktivátory byly vyvinuty jako prostředky antidotní terapie pro případy zasažení NPL. Navzdory stejnému mechanismu inhibice (fosforylace Ser 203) nejsou tyto reaktivátory většinou vhodné pro terapii osob zasažených OFI pesticidy. Cílem této práce je nalezení účinných reaktivátorů pro OFI insekticidy cestou porovnání reaktivační účinnosti pěti komerčně užívaných reaktivátorů a pěti nově připravených sloučenin, jejichž reaktivační účinnost byla dosud ověřena pouze na modelu tabunem inhibované AChE. Za modelový pesticid byl zvolen insekticid paraoxon pro svoji vysokou inhibiční schopnost. Jeho použití v praxi je již několik desítek let zakázáno, nicméně jeho prekurzor parathion je stále celosvětově používán.

---

## POKUSNÁ ČÁST

---

### Chemikálie

Použité chemikálie byly dodány od firem Fluka a Sigma-Aldrich a použity bez dalšího přečištění. Komerčně dostupné i nové reaktivátory byly dříve připraveny na pracovišti Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Jejich čistota byla ověřena pomocí spektrálních metod (NMR, HPLC-MS).

### Metodika

Homogenát z mozků laboratorního potkana (0,5 ml) byl smíchán s 20  $\mu$ l isopropylalkoholového roztoku paraoxonu ( $10^{-5}$  M) a inkubován za teploty 25 °C po dobu 30 minut (pH 7,6). Poté bylo ke směsi přidáno 2,5 ml roztoku chloridu sodného (3 M) a doplněno na celkový objem 23 ml destilovanou vodou. Nakonec byly přidány 2 ml roztoku acetylcholin-jodidu (0,02 M). Enzymová aktivi-

ta byla měřena při pH 7,6 a teplotě 25 °C na autotitrátoru RTS 822 (Radiometer, Dánsko). Aktivity intaktního ( $a_0$ ) a inhibovaného enzymu ( $a_1$ ) byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku NaOH (0,01 M) na čase. Po inkubaci paraoxonem inhibované AChE (30 min) byl k roztoku přidán reaktivátor (koncentrace  $10^{-3}$  M nebo  $10^{-5}$  M) a celá směs byla inkubována po dobu 10 minut. Aktivita reaktivované AChE ( $a_r$ ) byla opět odečtena ze závislosti spotřeby NaOH na čase.

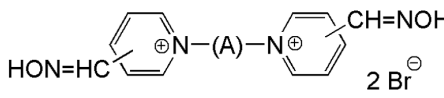
Z naměřených hodnot aktivit bylo vypočítáno množství reaktivované AChE (%) podle vzorce:

$$x = \left( 1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_1} \right) \cdot 100 (\%)$$

centraci  $10^{-5}$  M, výjimku tvoří trimedoxim a obidoxim <sup>20)</sup>. Pro reaktivátory ze skupiny komerčně dostupných sloučenin bylo proti paraoxonem inhibované AChE nejlepších výsledků dosaženo s obidoximem (**3**) a metoximem (**5**) při koncentraci  $10^{-3}$  M, při koncentraci  $10^{-5}$  M měli nejlepší výsledky reaktivace trimedoxim (**2**) a obidoxim (**4**). Vyšší toxicita trimedoximu i obidoximu vzhledem dalším komerčním reaktivátorům (např. HI-6) byla však dříve dokázána <sup>21)</sup>.

Ve skupině nově připravených sloučenin dosáhly nejlepší *in vitro* reaktivace při koncentraci  $10^{-5}$  M sloučeniny **8** a **9**. Kromě látky **7** bylo při této koncentraci u všech nových sloučenin dosaženo reaktivace vyšší než 10 %. To je základní předpoklad pro postoupení těchto sloučenin dalšímu testování. Pro koncentraci  $10^{-3}$  M bylo

Tab. 1. Struktura a reaktivační účinnost použitých reaktivátorů proti paraoxonem inhibované AChE

| Reaktivátor             |  |  | paraoxon (% reaktivace) |                |
|-------------------------|---|--|-------------------------|----------------|
|                         | poloha oximu  | spojovací řetězec                                  | $c(10^{-3}$ M)          | $c(10^{-5}$ M) |
| pralidoxim ( <b>1</b> ) | 2   | —  | 42 ± 1                  | 0              |
| trimedoxim ( <b>2</b> ) | 4,4'  | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - | 46 ± 1                  | 50 ± 4         |
| obidoxim ( <b>3</b> )   | 4,4'  | -CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> -                | 76 ± 2                  | 37 ± 2         |
| HI-6 ( <b>4</b> )       | 2   | -CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> -                | 35 ± 2                  | 0              |
| methoxim ( <b>5</b> )   | 4,4'  | -CH <sub>2</sub> -                                 | 71 ± 3                  | 0              |
| K027 ( <b>6</b> )       | 4   | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - | 59 ± 4                  | 21 ± 1         |
| K048 ( <b>7</b> )       | 4   | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -                 | 57 ± 4                  | 5 ± 2          |
| K074 ( <b>8</b> )       | 4,4'  | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -                 | 56 ± 2                  | 46 ± 1         |
| K075 ( <b>9</b> )       | 4,4'  | -CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -            | 60 ± 1                  | 46 ± 2         |
| K203 ( <b>10</b> )      | 4   | -CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -            | 64 ± 3                  | 23 ± 1         |

## VÝSLEDKY A DISKUZE

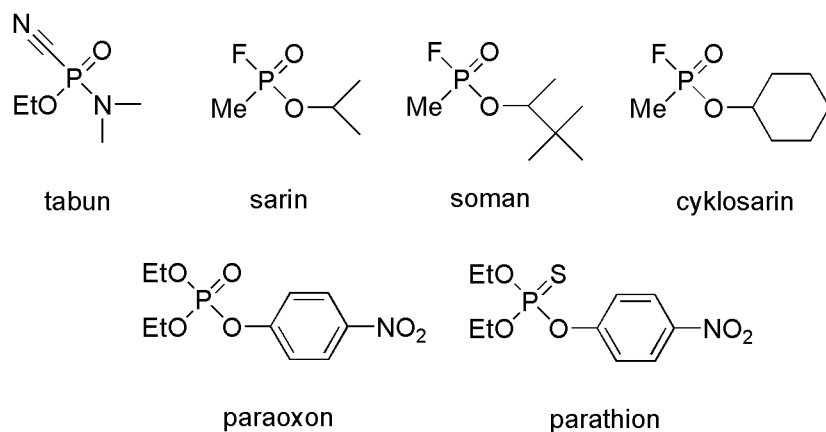
Vypočítané hodnoty reaktivace jsou průměrem ze dvou nezávislých měření. Výsledky komerčně dostupných a nově připravených reaktivátorů pro paraoxonem inhibovanou AChE jsou uvedeny v tabulce 1 a na obrázcích 1, 2 a 3. Maximální dosažitelná koncentrace reaktivátoru v plazmě je  $10^{-4}$  M <sup>18)</sup>. Proto o možnostech dalšího využití více vypovídají výsledky naměřené při koncentraci reaktivátoru  $10^{-5}$  M. Schopnost oximů reaktivovat OF inhibovanou AChE při této koncentraci by měla být alespoň 10%, aby mohla být ověřena i jejich účinnost *in vivo* <sup>19)</sup>.

Obecně se dá konstatovat, že v současné době používané reaktivátory mají nízkou reaktivační účinnost proti paraoxonem inhibované AChE, a to zejména při kon-

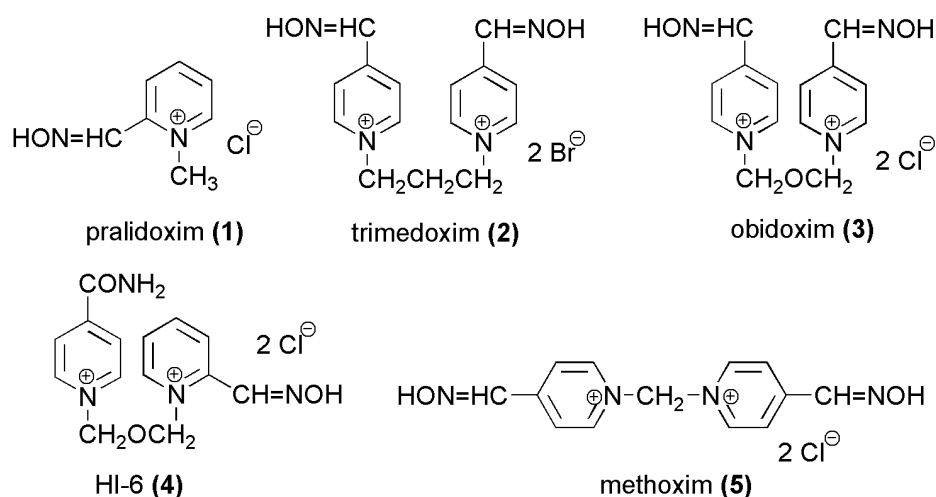
u všech nových reaktivátorů dosaženo reaktivace překračující 50 %.

Při srovnání obou skupin je patrné, že nově připravené reaktivátory mají lepší reaktivační účinnost ve srovnání s dnes používanými standardy. Sloučeniny **8** a **9** se svou reaktivační účinností vyrovnaly trimedoximu (**2**) a překonali obidoxim (**3**). Reaktivátory **6** a **10** předčily pralidoxim (**1**) HI-6 (**4**) a methoxim (**5**), avšak svou reaktivační účinností se nevyrovnaly obidoximu (**2**) a trimedoximu (**3**). Světově nejpoužívanější reaktivátor pralidoxim je pro reaktivaci paraoxonem inhibované AChE nevhodný <sup>22, 23)</sup>.

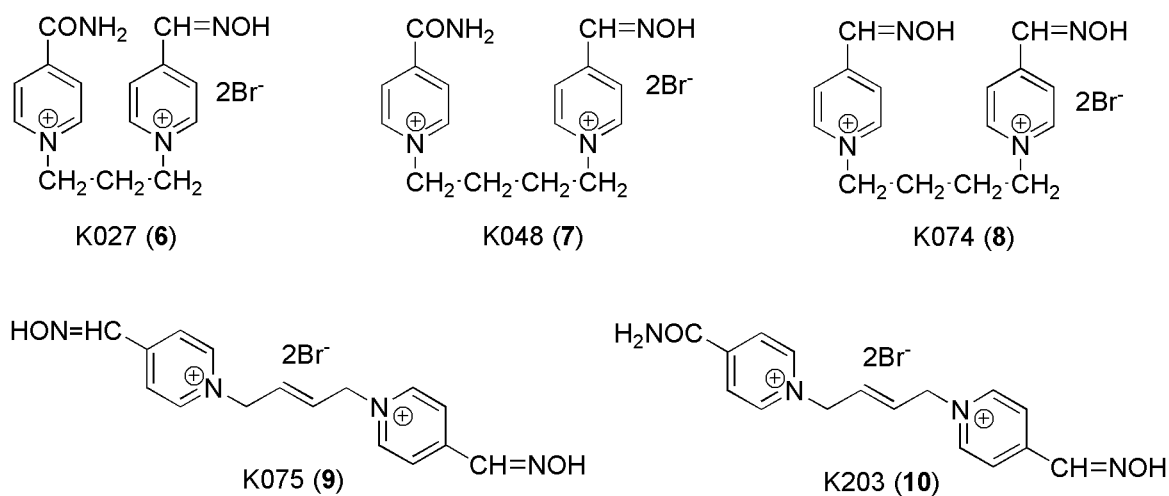
Reaktivační účinnost oximových reaktivátorů je závislá na několika strukturálních motivech. Je to počet kvarterních pyridinových dusíků, počet a poloha oximových skupin, délka spojovacího řetězce a přítomnost  $\pi$  elektronů ve spojovacím řetězci <sup>12)</sup>.



Obr. 1. Příkladů organofosforových inhibitorů acetylcholinesterasy



Obr. 2. Testované komerčně dostupné reaktivátory acetylcholinesterasy



Obr. 3. Struktury nově testovaných reaktivátorů

Při srovnání monokvarterních a biskvarterních reaktivátorů dosahují lepších výsledků biskvarterní reaktivátory<sup>24)</sup>. Jejich průchod přes hematoencefalickou bariéru je

však omezený<sup>25-27)</sup>. Pro účinnost reaktivátoru je dále zásadní alespoň jedna oximová skupina v poloze 2 nebo 4 na pyridiniovém jádru<sup>28)</sup>. Optimum pro délku uhlíka-

tého spojovacího řetězce leží v rozmezí 3–4 methylenových jednotek. Zavedením jiného strukturního motivu nesoucího volné elektronové páry (např. heteroatom) nebo  $\pi$  elektrony (např. dvojná vazba) dochází ke změně vlastností reaktivátoru<sup>12)</sup>. Tyto změny mohou být způsobeny interakcí elektronů se zbytky aminokyselin v aktivním místě AChE<sup>29)</sup>.

---

## ZÁVĚR

---

Při porovnání výsledků reaktivační účinnosti proti paraoxonem inhibované AChE se komerčně dostupné reaktivátory jeví jako méně vhodné ve srovnání s reaktivátory testovanými v této práci. S výjimkou trimedoximu převyšují nové reaktivátory komerčně dostupné sloučeniny zejména při koncentraci  $10^{-5}$  M, která je dosažitelná také *in vivo*.

---

## LITERATURA

---

- Bajgar, J.:** Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 2004; 38, 151–216.
- Marrs, T. C.:** Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Therapeut.*, 1993; 58, 51–66.
- Patocka, J., Kuca, K., Jun D.:** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica*, 2004; 47, 215–228.
- Satoh, T., Hosokawa, M.:** Organophosphates and their impact on the global environment. *Neurotoxicol.*, 2000; 21, 223–227.
- Francotte, P., Graindorge, E., Boverie, S., de Tullio, P., Pirotte B.:** *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11, 1757–1778.
- Marklund, A., Andersson, B., Haglund, P.:** Organophosphorus flame retardants and plasticizers in air from various indoor environments. *J. Environ. Monit.*, 2005; 7, 814–819.
- Tattersall, J.:** Seizure activity post organophosphate exposure. *Front. Biosci.*, 2009; 14, 3688–3711.
- Patocka, J.:** *Vojenská toxikologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2004; 180.
- Bajgar, J., Fusek, J., Kuca, K., Bartosova, L., Jun, D.:** Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2007; 7, 461–466.
- Newmark, J.:** Nerve agents. *Neurologist*, 2007; 13, 20–32.
- Saxena, A., Sun, W., Luo, C., Myers, T. M., Koplovitz, I., Lenz, D. E., Doctor, B. P.:** Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds. *J. Mol. Neurosci.*, 2006; 30, 145–148.
- Kuca, K., Jun, D., Musilek, K.:** Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2006; 3, 269–277.
- Poziomek, E. J., Hackley, B. E., Steinberg, G. M.:** Pyridinium aldoximes. *J. Org. Chem.*, 1958; 23, 714–717.
- Kuca, K., Jun, D., Musilek, K., Bajgar, J.:** Reactivators of tabun-inhibited acetylcholinesterase: Structure-biological activity relationship. *Front. Drug. Des. Discov.*, 2007; 3, 381–394.
- Ekstrom, F., Pang, Y. P., Boman, M., Artursson, E., Akfur, C., Borjegen, S.:** Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 72, 597–607.
- Ekstrom, F., Akfur, C., Tunemalm, A. K., Lundberg, S.:** Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 2006; 45, 74–81.
- Eddelston, M., Dawson, A. H., Buckley, N. A.:** Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*, 2008; 371, 597–607.
- Tattersall, J. E.:** Ion channel blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 1993; 108, 1006–1015.
- Kuca, K., Cabal, J., Musilek, K., Jun, D., Bajgar, J.:** Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J. Appl. Toxicol.*, 2005; 25, 491–495.
- Musilek, K., Holas, O., Kuca, K., Jun, D., Dohnal, V., Dolezal, M.:** Synthesis of asymmetrical bispyridinium compounds bearing cyano-moiety and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006; 16, 5673–5676.
- Bartosova, L., Kuca, K., Kunesova, G., Jun, D.:** The acute toxicity of acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. *Neurotox. Res.*, 2006; 9, 291–296.
- Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P.:** Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 68, 2237–2248.
- Racakova, V., Jun, D., Opletalova, V., Kuca, K.:** Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by the pesticide chlorpyrifos. *J. Appl. Biomed.*, 2006; 4, 147–151.
- Musilek, K., Holas, O., Kuca, K., Jun, D., Dohnal, V., Opletalova, V., Dolezal, M.:** Novel series of bispyridinium compounds bearing a (Z)-but-2-ene linker—synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007; 17, 3172–3176.
- Sakurada, K., Matsubara, K., Shimizu, K., Shiono, H., Seto, Y., Tsuge, K., Yoshino, M., Sakai, I., Mukoyama, H., Takatori, T.:** Pralidoxime iodide (2-pAM) penetrates across the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.*, 2003; 28, 1401–1407.
- Okuno, S., Sakurada, K., Ohta, H., Ikegaya, H., Kazui, Y., Akutsu, T., Takatori, T., Iwadate, K.:** Blood-brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008; 227, 8–15.
- Lorke, D. E., Hasan, M. Y., Nurulain, S. M., Sheen, R., Kuca, K., Petroianu, G. A.:** Entry of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. *J. Appl. Toxicol.*, 2007; 27, 482–490.
- Kuca, K., Patocka, J.:** Reactivation of cyclosarin-inhibited rat brain acetylcholinesterase by pyridinium-oximes. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 2004; 19, 19–22.
- Musilek, K., Holas, O., Kuca, K., Jun, D., Dohnal, V., Opletalova, V., Dolezal, M.:** Synthesis of a novel series of non-symmetrical bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 2007; 22, 425–432.