

ACETYLO- I BUTYRYLOCHOLINOESTERAZA – BUDOWA, FUNKCJE I ICH INHIBITORY

BOŻENA BUKOWSKA*, DANUTA PIENIAŹEK, KATARZYNA HUTNIKI, WIRGILIUSZ DUDA

Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska

Cholinesterases are divided into two enzyme classes according to their substrate specificity, behaviour towards excess substrate and susceptibility to inhibitors: acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8). The enzyme acetylcholinesterase plays an essential role in acetylcholine-mediated neurotransmission. BChE is of pharmacological and toxicological importance, because it hydrolyzes ester - containing drugs and scavenges cholinesterase inhibitors including potent organophosphorous nerve agents before they reach their synaptic targets. AChE hydrolyzes acetylcholine faster than other cholinesterases and is much less active on butyrylcholine. BChE preferentially acts on butyrylcholine but also hydrolyzes acetylcholine. AChE and BChE show three different enzymatic activities: esterase, aryl acylamidase and peptidase (or protease). AChE and BChE share 65% amino acid sequence homology and have similar molecular forms and active center structure despite being products of different genes on human chromosomes 7 (7q22) and 3 (3q26), respectively. The activity of cholinesterases is inhibited by phosphoroorganic compounds, carbamates, phenoxyacetic pesticides and also hydrogen peroxide, aliphatic ketones and cholinomimetic drugs. Unfortunately, destructive processes that may even provoke death of neurons are also related to cholinesterase activity. Cholinesterases play an important role in neurological diseases, leukemia, phenylketonuria, inflammatory processes, hyperlipidemia and osteoporosis.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA CHOLINOESTERAZ

Cholinoesterazy u zwierząt są enzymami spotykanymi w tkankach cholinergicznym jak i niecholinergicznym. Wyróżniamy: acetylocholinoesterazę (AChE) – cholinoesterazę prawdziwą, hydrolazę acetylocholinę (E.C. 3.1.1.7) oraz butyrylocholinoesterazę (BChE) – pseudo-cholinoesterazę, acylohydrolazę acylocholinę (E.C. 3.1.1.8).

AChE i BChE przejawiają różnice w podatności na inhibitory, zachowaniu w sytuacji nadmiaru substratu, czy specyficzności łączenia substratu. Oba te enzymy w odróżnieniu od innych esteraz hydrolizują estry cholinę z

bardzo dużą szybkością (Janicki, 2001) i wykazują dodatkowo aktywność enzymatyczną - peptydazową oraz aryacylamidazową (Chattonet & Lockridge, 1986). Butyrylocholinoesteraza wpływa także na aktywność trypsyny E.C. 3.4.4.4 (Darvesh, Kumar, Roberts, Walsh & Martin, 2001).

AChE i BChE wykazuje 65% homologii aminokwasowej, mają one podobną formę molekularną oraz miejsce aktywne (Allerdice, Garner, Galutira, Lockridge, LaDu & McAlpines, 1991). Natomiast „kieszenie” wiążące acyl różni się u AChE i BChE. Cechy charakterystyczne dla acetylo- i butyrylocholinoesterazy przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Porównanie cech charakterystycznych dla acetylo- i butyrylocholinoesterazy.

	Acetylocholinoesteraza	Butyrylocholinoesteraza
Występowanie	Błona erytrocytów, mózg, rdzeń kręgowy, płytki motoryczne mięśni szkieletowych, mięśni gładkich drzewa oskrzelowego i pęcherza. Składnik synaps cholinergicznym oraz połączeń nerwowomięśniowych.	Osocze krwi, wątroba, jelita, serce, nerki, płuca, trzustka, nadnercza, zwoje czuciowe błony śluzowej.
Lokalizacja genu	Chromosom 7 (7q22) człowieka.	Chromosom 3 (3q26) człowieka.
Charakterystyka miejsca katalitycznego enzymu	Pierścienie arylowe Phe 295 i Phe 297 ograniczają stopień wolności związanych substratów a przez to umożliwiają tylko katalizę „najkrótszym” grup acylowych wchodzących w skład substratu, np. acetylocholinę.	W BChE w kieszeniach wiążących grupy acylowe występują Leu 286 i Val 288. Wymiana fenyloalaniny na alifatyczne reszty w BChE umożliwia katalizę „szerszym” grup acylowych, które zawiera substrat, np. butyrylocholinę.
Funkcje	Rozkłada estry cholinę.	Hydrolizuje butyrylocholinę, także acetylocholinę. BChE pełni funkcje detoksykujące, hydrolizuje estry leków i narkotyków.
Nadmiar substratu	Hamuje aktywność AChE.	Wykazuje aktywację substratową nawet w nadmiarze substratu.
Selektywne inhibitory	Dibromian 1,5-bis (4-allylo-dimetyloaminopropylu) pentan-3-on (BW 284C51).	Tetramid izotetra monoizopropylu pirofosforan (izo-OMPA).

* Adres do korespondencji: dr Bożena Bukowska, Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16 e-mail: bukow@biol.uni.lodz.pl

Dane w tabeli opracowano na podstawie publikacji: Sussmsn, Hardel, Frolow, Oefner, Goldman, Toker & Silman, 1991; Ekholm, 2001; Masson, Froment, Fortier, Visicchio, Bartels & Lockridge, 1998; Töugu, 2001; Puche & Perea, 2001; Dave, Syal & Katyare, 2000; Thatte & Dahanukar, 1997.

MOLEKULARNE FORMY CHOLINOESTERAZ

AChE i BChE posiadają podobne właściwości amfifilowe (część cząsteczki jest hydrofilowa, część zaś hydrofobowa) oraz podobne rozpuszczalne formy cząsteczkowe występujące w tkankach i płynach ustrojowych. Różnią się natomiast rozmieszczeniem w tkankach. Formy homoi heterooligomeryczne można podzielić następująco (Talesa, 2001; Altamirano & Lockridge, 1999):

- Typ I. Amfifilowe dimery: Formy te są połączone z błoną plazmatyczną poprzez glikofosfatydyloinozylol. Występują w mięśniach ssaków, erytrocytach i limfocytach. Są rozpuszczalne tylko przez detergenty a w ich nieobecności ulegają agregacji. Typ I jest charakterystyczny dla acetylocholinoesterazy.
- Typ II. Amfifilowe monomery i dimery: Formy te różnią się od typu I tym, że nie posiadają glikolipidowego zakotwiczenia i nie ulegają agregacji w nieobecności detergentów. Są rozpuszczalne w roztworach soli. Z nich zbudowane są wszystkie cholinoesterazy występujące w mózgu ssaków, mięśniach i rzewodzie pokarmowym.
- Typ III. Tetramer z hydrofobową resztą jest zakotwiczony w błonie przez hydrofobową podjednostkę polipeptydową o długości 20000. Forma ta występuje głównie w centralnym układzie nerwowym.
- Typ IV. Formy z resztą kolagenowo podobną i formy asymetryczne: Forma ta charakteryzuje się obecnością reszty kolagenowo podobnej, zakotwiczonej w blaszce podstawowej. Jest uformułowana przez potrójną helikalną strukturę składającą się z 3 podjednostek kolagenowych Q. Forma ta występuje w acetylocholinoesterazie i butyrylocholinoesterazie w połączeniach nerwowo-mięśniowych.
- Typ V. Tetrameryczna forma rozpuszczalna (G_4): Zbudowana jest z 4 identycznych monomerów i stabilizowana jest przez interakcje hydrofobowych aminokwasów. Forma ta dominuje w butyrylocholinoesterazie występującej w płynach ustrojowych ssaków oraz w rozpuszczalnej formie homogenatów tkankowych.

ACETYLOCHOLINOESTERAZA

AChE uznana jest przez enzymologów za enzym ewolucyjnie perfekcyjny. Wszystkie etapy katalizy (przyłączanie substratu, transformowanie substratu, dysocjacja produktu) przebiegają w zbliżonym tempie (Quinn, 1987).

Miejsce aktywne AChE usytuowane jest wewnątrz łańcuchów białkowych na dnie wąskiego katalitycznego wgłębienia. Taka struktura powoduje ograniczenia w

migracji zarówno substratów do wnętrza jak i produktów na zewnątrz centrum katalitycznego. Miejsce hydrolizy substratów znajduje się w esterazowym obszarze enzymu zawierającym serynę i jest funkcjonalnie połączone z miejscem łączącym substrat oraz z hydrofobowymi regionami odpowiedzialnymi za wiązanie alkilowych podstawników w cząsteczce substratu (Sussmsn, Hardel & Silman, 1992).

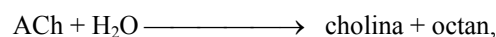
Istotną rolę w funkcjonowaniu aktywnego miejsca w enzymie odgrywają reszty takich aminokwasów jak seryna Ser 200, histydyna His 440 i kwas glutaminowy Glu 327. Centrum aktywne zawiera tylko kilka ujemnych ładunków jonowych, które mogą reagować z kationowymi substratami i inhibitorami. Stwierdzono, że trzy anionowe reszty aminokwasowe w obszarze prowadzącym do miejsca katalitycznego: Glu 327, Asp 443, Glu 199, które są podstawą dla działania mechanizmu katalitycznego enzymu. Ponadto we wgłębieniu prowadzącym do centrum aktywnego jest wiele reszt aromatycznych, które stanowią potencjalne miejsca hydrofobowe (Sussmsn *et al.*, 1991).

FUNKCJE AChE

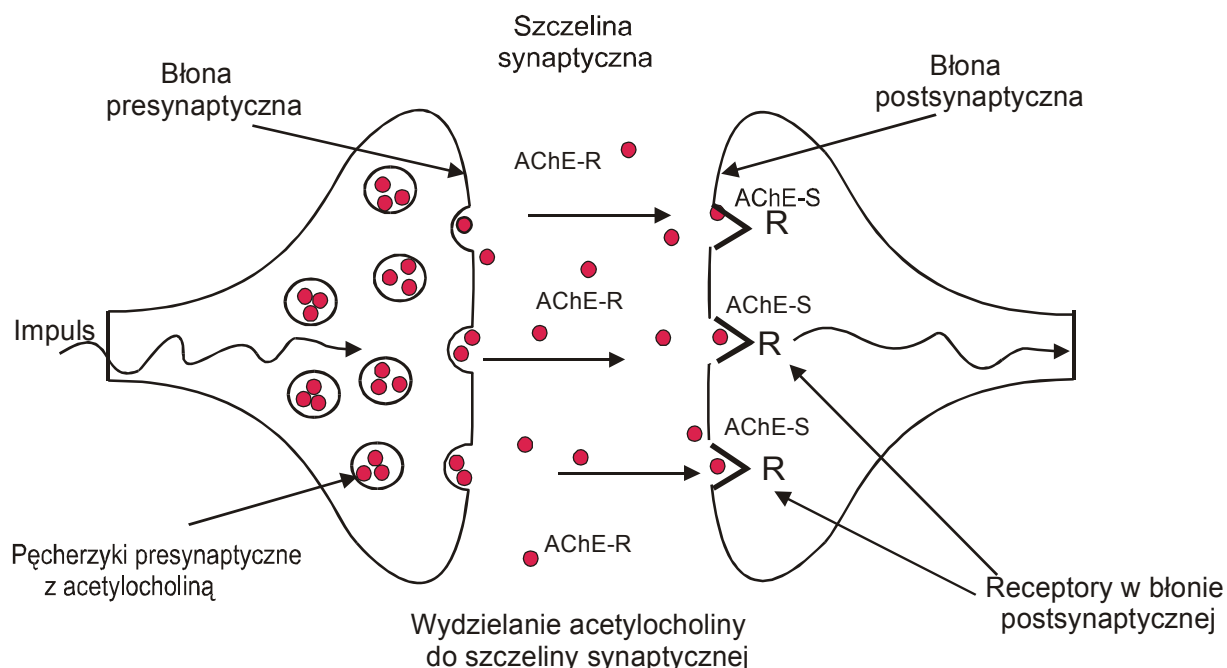
Wyróżniamy dwie formy AChE związane z jej funkcją:

- Formę synaptyczną acetylocholinoesterazy (AChE-S), która jest zakotwiczona w błonie komórkowej i odgrywa bezpośrednią rolę w przewodnictwie synaptycznym (hydrolizuje acetylcholinę w błonie postsynaptycznej)
- Formę rozpuszczalną acetylocholinoesterazy (AChE-R) wydzielaną jako monomer, pozbawioną końcowej C terminalnej cysteiny (brak cysteiny uniemożliwia połączenia z receptorem błonowym). Ta forma odgrywa istotną rolę w niesynaptycznej hydrolizie acetylcholinoi i morfogenezie komórek (Brenner, Hamra-Amitay, Evron, Boneva, Seidman & Soreq, 2003; Pick, Flores-Flores, Grisaru, Shochat, Deutch & Soreq, 2004).

Funkcja formy S acetylocholinoesterazy związana jest z hydrolizą neurotransmitera acetylcholinoi. Przewodzenie impulsów nerwowych w organizmie odbywa się wzdłuż neuronów (od dendrytu przez perikarion w stronę zakończenia aksonu). Przewodzenie impulsu między dwoma neuronami zachodzi poprzez szczelinę synaptyczną. Błona neuronowa w stanie spoczynku jest spolaryzowana. Jeżeli nastąpi jej depolaryzacja, wówczas impuls przemieszcza się w kierunku zakończenia neuronu. Gdy impuls dotrze do synapsy powoduje depolaryzację błony presynaptycznej. W błonie presynaptycznej znajdują się pęcherzyki z mediatorem (m.in. acetylcholiną). Depolaryzacja błony presynaptycznej powoduje uwolnienie mediatora do szczeliny synaptycznej. Acetylcholina dociera do błony postsynaptycznej i tam łączy się z receptorami, proces ten powoduje polaryzację błony postsynaptycznej, dzięki czemu impuls nerwowy może przemieszczać się wzdłuż następnego neuronu. Funkcją AChE jest hydroliza mediatora, czyli acetylcholinoi w błonie postsynaptycznej po zakończeniu przewodzenia wg. reakcji:



AChE pełni bardzo ważną funkcję, ponieważ zapobiega zbyt niemu nagromadzeniu mediatora w błonie postsynap- tycznej i zapobiega upośledzeniu dalszego przewodzenia nerwowego (Rys. 1).



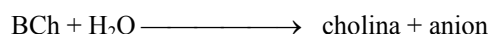
Rys. 1. Mechanizm synaptycznego przewodzenia impulsów nerwowych z udziałem neurotransmitera acetylocholinę.

Forma R acetylocholinoesterazy związana jest głównie z morfogenezą komórki i odgrywa kluczową rolę w reakcji na stress (Grisau, Deuth, Shapira, Pick, Sternferd & Melamedbook, 2001), oraz w powstawaniu i przebiegu chorób, np. białaczki (Perry, Sklan & Soreq, 2004) czy też choroby – ciężkiej nużliwości mięśni *Miastenia gravis* (Brenner, Hamra-Amitay, Evron, Boneva, Seidman & Soreq, 2003). Forma AChR hydrolizuje acetylocholinę zanim dotrze ona do błony postsynaptycznej, a jej nadmierna ekspresja może powodować znaczne zakłócenie w przewodnictwie nerwowym - jak ma to miejsce przy stosowaniu niektórych leków w *Miastenia gravis* (Brenner et al., 2003; Bukowska, 2005).

enzymu wykazujące również niższą aktywność niż zwyczajna BChE to: wariant J (Glu 497 → Val); wariant K (Ala 536 → Thr); mutanty odporne na działanie fluorków (Thr 247 → Met i Gly 390 → Val) (Çokuğraş, 2003). Szczegółowe badania tego enzymu dowiodły istnienia około 20 ukrytych genotypów, których aktywność wynosi około 0,2% wartości przypisywanej zwyczajnej BChE. Znane są również odmiany butyrylocholinoesterazy wykazujące wyższą aktywność niż normalna. Zaliczmy do nich: wariant C5+; wariant Cynthiana; wariant Johannesburg (Lockridge, 1990; Li, Stribley, Ticu, Xie, Schopfer & Hammond, 2000).

BUTYRYLOCHOLINOESTERAZA (BChE)

Gen kodujący BChE umieszczony jest na chromosomie 3 w miejscu 26, koduje różne genotypy enzymu różniące się między sobą aktywnością. Za enzym o prawidłowej aktywności, uznano ten występujący w surowicy i nazwano BChE zwyczajną. Butyrylocholinoesteraza działa na estry cholinowe (głównie butyrylocholinę) i wiele innych związków wg reakcji:



Niższą aktywnością charakteryzuje się najlepiej poznana zmutowana BChE (Asp 70 → Gly). Ta wymiana aminokwasów znacząco obniża aktywność BChE, gdyż Asp 70 zapoczątkowuje wiązanie dodatnio naładowanych substratów do miejsca aktywnego enzymu. Inne odmiany

BChE JAKO ENZYM DETOKSYKUJĄCY

Butyrylocholinoesteraza dzięki aktywności esterazowej pełni ważną funkcję w unieszkodliwianiu inhibitorów fosforoorganicznych oraz karbaminianowych zanim dotrą do acetylocholinoesterazy. Hydrolizuje ona hydrofilowe oraz hydrofobowe związki zawierające ester kwasu karboksylowego lub fosforowego. Z tego powodu uznaje się BChE za enzym detoksyfikujący, istotny z farmakologicznego punktu widzenia. BChE detoksykuje takie związki jak:

- Sukcynylodicholina – lek neuromięśniowy, bloker stosowany podczas operacji. Jest hydrolizowana do sukcynylomonocholiny i choliny (Lockridge, 1990).
- Estry fosforoorganiczne i karbaminianowe - stosowane jako pestycydy - insektycydy, związki stosowane w działaniach wojennych i leki stosowane w takich chorobach jak jaskra, infekcje pasożytnicze czy

- choroba Alzheimera. Związki te powodują fosforylację grupy -OH seryny znajdującej się w centrum aktywnym enzymu (Çokuğraş & Tezcan, 1997; Wilkinson, Francis, Schwam, & Payne, 2004; Worek, Eyer, Kiderlen, Thiermann & Szinicz, 2000).
- Kokaina – BChE odgrywa kluczową rolę w metabolizmie kokainy. Głównymi nieaktywnymi produktami rozkładu kokainy jest ester metylowy ekogniny i kwas benzoowy, które są usuwane przez nerki. Badania prowadzone na zwierzętach pokazały, że Sun, Yazal, Lockridge, Schopfer, Brimijoin & Pang, 2001; Sun, Pang, Lockridge & Brimijoin, 2002).
- Aspiryna (kwas acetylosalicylowy) - jest hydrolizowana w osoczu przez BChE do salicylanów i kwasu octowego (Masson, Froment & Lockridge, 2001). Stwierdzono, że przy wysokich stężeniach aspiryny (> 6 mM) następuje spontaniczna hydroliza aspiryny do salicylanów, co znacznie zakwasza środowisko i hamuje aktywność BChE.
- Amitriptylina, fluoksetyna, sertralina - kliniczne antydepresanty stosowane na całym świecie. Wszystkie hamują aktywność AChE kory mózgowej i znajdującej się w erytrocytach (Müller, Rocha, Morsch, Neis & Schetinger, 2002). Stwierdzono natomiast, że amitriptylina jest dodatkowo inhibitorem kompetycyjnym BChE (Çokuğraş, 1997).
- Leki przeciwdrgawkowe - diazepam, benaktyzyna, drofenina. Leki te są estrami kwasów karboksylowych i są hydrolizowane przez BChE. Benaktyzyna i drofenina są kompetycyjnymi inhibitorami osoczowej BChE (Bodur, Çokuğraş & Tezcan, 2001).
- Heroina jest hydrolizowana przez BChE do 6-acetylmorfiny, która przenika przez barierę krew-mózg i jest następnie hydrolizowana do morfiny przez enzymy znajdujące się w mózgu. BChE jest jedynym enzymem w surowicy człowieka, który hydrolizuje heroinę (Bodur *et al.*, 2001; Lockridge, Mottershow-Jackson, Eckerson & LaDu, 1980).

Ponadto reguluje ona przewodzenie cholinergiczne w nieobecności AChE. BChE odgrywa istotną rolę w metabolizmie lipoprotein, utrzymaniu odpowiedniej struktury mieliny, adhezji komórek i neurogeniezie (Kutty & Payne, 1994; Schwarz, Glick, Loewenstein & Soreq, 1995).

INHIBITORY CHOLINOESTERAZ

Zahamowanie aktywności cholinoesteraz prowadzi do nagromadzenia dużych ilości acetylocholine i nadpobudzenia układu cholinergicznego. W miarę narastającego pobudzenia receptorów cholinergiczych – muskarynowych i nikotynowych, umiejscowionych na powierzchni obwodowych tkanek efektorowych oraz w ośrodkowym układzie nerwowym, następuje znaczne podwyższenie stężenia acetylocholine.

Umieszczenie miejsca katalitycznego cholinoesteraz we wgłębieniu białka enzymu, utrudnia zarówno dyfuzję substratu do wnętrza jak i wydostawanie się produktów na zewnątrz cząsteczki enzymu. Taka struktura powoduje, że

enzym jest podatny na inhibitory niekompetycyjne (Töugu, 2001; Rosenberry, 2004).

Związki fosforoorganiczne

Zdolność hamowania AChE i BChE mają związki fosforo-organiczne, do których należą pochodne kwasu fosforowego i fosfonowego, np. malation, isofenos, chlorfenvinfos czy glifosat (Abdollahi, Mostsfalou, Pournourmohammadi & Shadnia 2004; Bukowska, Pieniążek & Duda, 2002; Costa, Cole, Vitalone & Furlong, 2005; Pieniążek, Bukowska & Duda, 2004; Rickwood & Galloway, 2004). Hamowanie aktywności cholinoesteraz jest wynikiem reakcji chemicznej enzymu z inhibitorem, w tym przypadku ze związkiem fosforoorganicznym (analogicznie do reakcji z substratem fizjologicznym – acetylocholiną). Jak wcześniej wspomniano związki fosforoorganiczne mają zdolność łączenia się z grupą OH seryny (Ser198 w BChE i Ser200 w AChE) znajdującej się w centrum aktywnym enzymów i powodują hamowanie rozkładania substratu. Fosforylacja seryny zachodzi 2-stopniowo i jest katalizowana przez zasadowe imidazolowe ugrupowanie cząsteczki histydyny. Ufosforylowany enzym podlega większej lub mniejszej hydrolizie i reaktywacji (Rys. 2). Dla niektórych związków fosforoorganicznych proces hydrolizy zachodzi tak powoli, że hamowanie enzymu staje się procesem nieodwracalnym (Seńczuk, 1999).

Insektocydy karbaminianowe

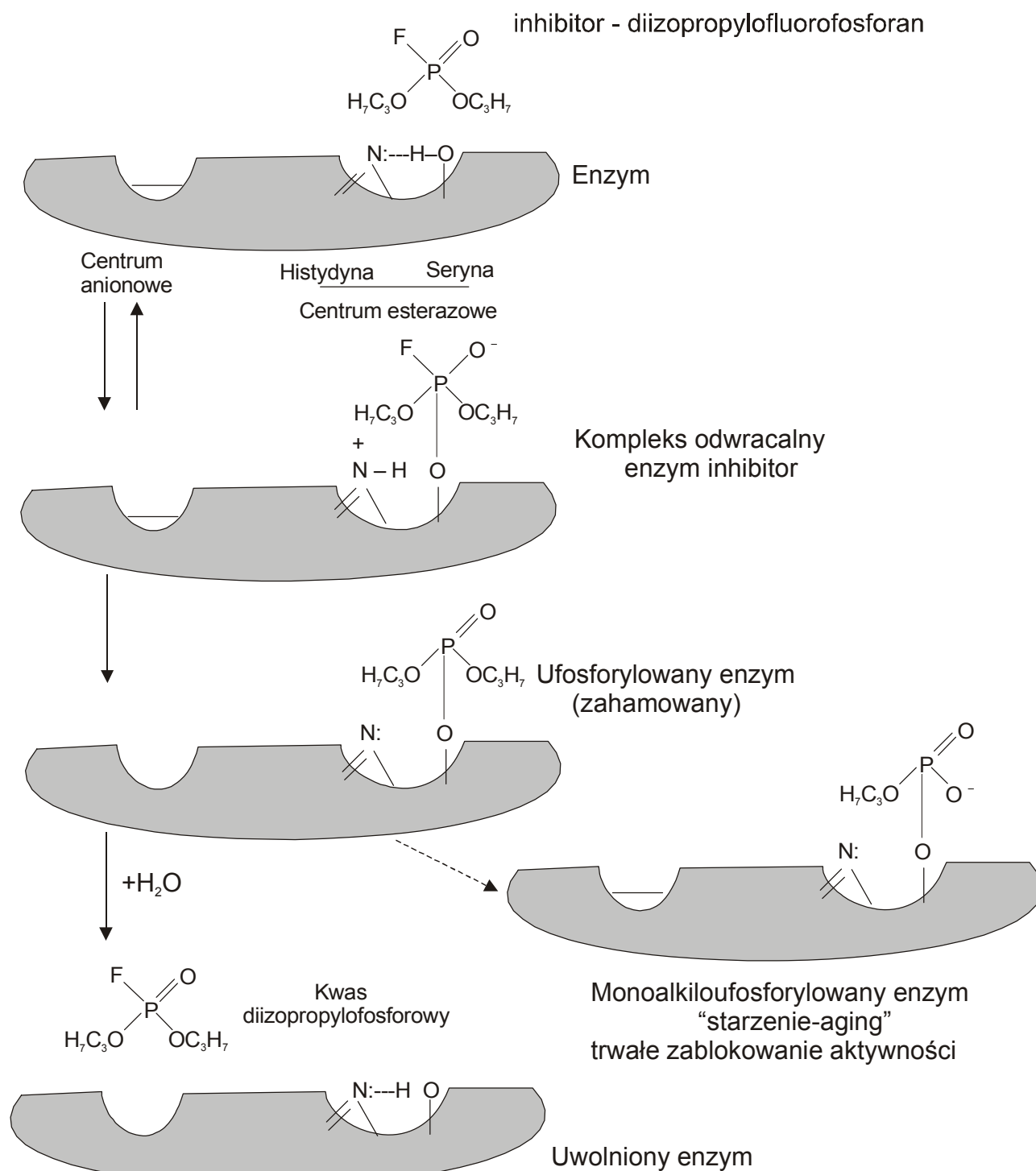
Insektocydy karbaminianowe, np. karbofuran itp. (Barata, Solayan & Porte, 2004) są bezpośrednimi inhibitorami cholinoesteraz, unieczynnijają one esterażę przez karbamyłację. Karbamyłacja przebiega z udziałem grupy hydroksylowej seryny, z którą wiąże się węgiel grupy karbonylowej insektocydu w części zasadowej centrum aktywnego esteraży. Karbamyłowany enzym jest bardzo nietrwały i szybko ulega rozpadowi. Z tego względu insektocydy karbaminianowe zalicza się do odwracalnych inhibitorów cholinesteraz o stosunkowo krótkim czasie bezpośredniego działania toksycznego (Seńczuk, 1999).

Pestycydy fenoksyoctowe

Herbicyd fenoksyoctowy – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) powoduje zmiany w układzie nerwowym polegające na łączeniu się herbicydu i acetylocholine (Kalab & Skladal, 1997), hamowaniu aktywności AChE oraz podnoszeniu poziomu innego neurotransmitera – serotoniny (Bortozoli, Duffard, Antonelli & Evangelista de Duffard, 2002; Garcia, Tagliferro, Bortoolozzi, Madariaga, Brusco, Evangelista de Duffard, Duffard & Pecci Saavedra, 2001). 2,4-D wpływa na proces mielinacji CUN (Robitzki, Mack, Hoppe, Chatonnet & Layer, 1998; Rosso, Caseres, Evangelista de Duffard, de Duffard & Quiroga, 2000), na stężenie neurotransmiterów i morfologię komórek nerwowych i glialowych (Garcia, Tagliferro, Ferri, Evangelista de Duffard, Duffard & Brusco, 2004). Badania prowadzone przez Pieniążek, Bukowską, Sicińską & Dudę (2004) wykazały niewielki bezpośredni wpływ tego pestycydu na aktywność AChE w erytrocytach człowieka

15

(*in vitro*). Dopiero dawka 1000 ppm 2,4-D powodowała istotny statystycznie spadek aktywności tego enzymu.



Rys. 2. Mechanizm hamowania aktywności acetylocholinoesterazy przez insektycyd fosforoorganiczny – diizopropylfluorofosforan (zmodyfikowany rysunek wg. Seńczuka, 1999).

Alifatyczne ketony

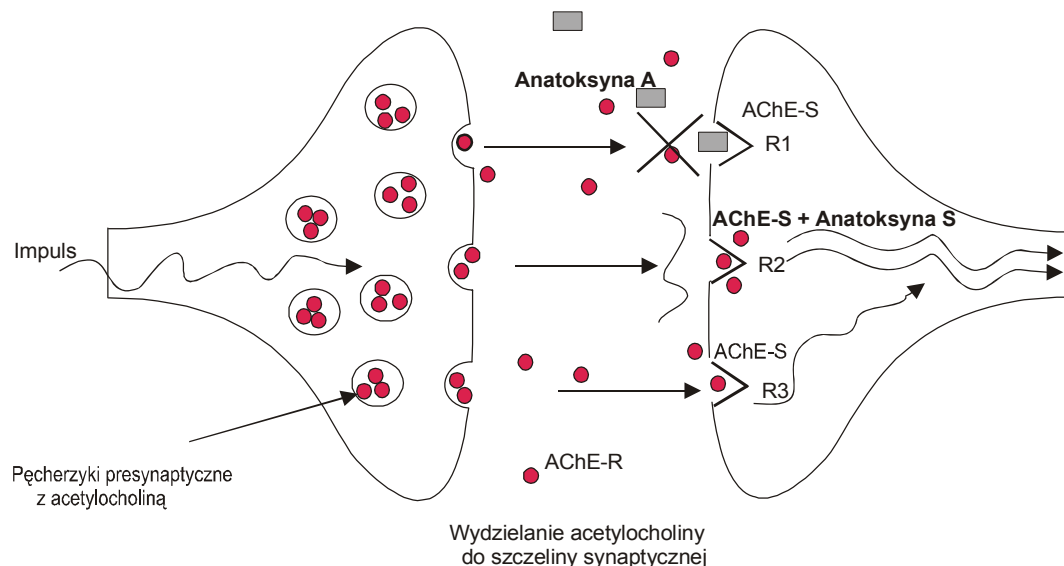
Alifatyczne ketony o liczbie węgla C4-C9 uznane są również za inhibitory AChE np. 2,5-heksandion. Badania aktywności AChE w mózgu szczurów prowadzone przez Pereira, Adamsa & Silvę (2004) pokazują, iż dawki wyższe niż 10 mM 2,5-heksandionu podwyższają K_m i obniżają

$V_{\max}$. To wskazuje na mieszany rodzaj inhibicji, obejmujący tworzenie się mieszanego kompleksu enzym-substrat-inhibitor. Nawet w dużym nadmiarze substratu nie jest możliwe osiągnięcie $V_{\max}$ ponieważ zawsze część kompleksu będzie połączona z inhibitorem.

Toksyny sinicowe

Coraz większym problemem są zakwity sinic a z nimi produkcja dużych ilości neurotoksyn i hepatotoksyn. Carmichel (1994) stwierdził, iż anatoksyna A jest analogiem neurotransmitera acetylocholino, łączy się ona zatem z receptorem acetylocholino w błonie postsynapty-

cznej i przez to hamuje przewodnictwo nerwowe. Natomiast anatoksyna S łączy się z enzymem acetylocholinoesterazą i inaktywuje enzym, co także jednoznacznie przyczynia się do zaburzeń w neuroprzekaznictwie (Rys. 3).



Rys. 3. Mechanizm działania Anatoksyny A i Anatoksyny S na neuroprzekaznictwo nerwowe w synapsie. R1 receptor acetylocholino hamowany bezpośrednio przez przyłączoną do niego Anatoksynę A, R2 receptor w którym przekazywanie zostało zaburzone przez Anatoksynę S na skutek braku rozłożenia acetylocholino (inhibicja acetylocholinoesterazy), R3 prawidłowo działający receptor acetylocholino.

Nadtlenek wodoru

Stosując metodę fluorescencji immunochemicznej Schallreuter i wsp., (Schallreuter, Elwary, Gibbons, Rokos & Wood, 2004) wykazali, że przy niskich stężeniach H_2O_2 (10^{-6} mol/l) następuje aktywacja wzorcowej AChE aż do wzrostu $V_{max} > 2$ -razy, tymczasem większe dawki H_2O_2 (10^{-3} mol/l) inhibują ten enzym z istotnym statystycznie obniżeniem V_{max} . Ponadto stosując modelowanie komputerowe autor twierdzi, iż H_2O_2 – powoduje utlenienie Trp⁴³², Trp⁴³⁵ i Met⁴³⁶ oraz przesunięcia i destrukcję aminokwasu w centrum aktywnym enzymu, tj. His⁴⁴⁰.

Fenol

Wyniki badań (*in vivo*) wpływu fenolu na mózgową acetylocholinoesterazę karpia dowiodły, iż fenol powodował zmniejszenie aktywności AChE (Kozlovskaya & Martemyanov, 1991). Autorzy sugerują jednak, iż był to efekt działania stresu oksydacyjnego powstałego pod wpływem fenolu a nie bezpośredniego działania fenolu. Zostało to potwierdzone w pracy Bukowskiej (Bukowska, 2004), w której zastosowanie nawet dawki 1000 ppm fenolu nie inaktywowało tego ważnego enzymu.

Leki wpływające na układ cholinergiczny

Acetylocholina poza synapsami Centralnego Układu Nerwowego, zwojami przywspółczulnymi i pozazwojowym układem przywspółczulnym przenosi pobudzenie także w zwojach współczulnych i w płycie mięśni

poprzecznie prążkowanych. Dlatego posiada zdolność oddziaływania zarówno na cholinergiczne receptory muskarynowe jak i nikotynowe. Receptory muskarynowe (m-cholinergiczne) występują w mózgu, w zwojach wegetatywnych i naczyniach krwionośnych. Receptory nikotynowe (n-cholinergiczne) występują w Centralnym Układzie Nerwowym, zwojach wegetatywnych i w płytkach nerwowo-mięśniowych. Leki pobudzające receptory muskarynowe nazywane są parasympatykami (Mutschler, Geisslinger, Kroemer & Schäfer-Korting, 2001). Powszechnie stosowane leki wpływające na układ cholinergiczny można podzielić na następujące grupy:

- Agoniści receptora muskarynowego. Leki te pobudzają receptory muskarynowe podobnie do acetylocholino i są nazywane lekami m-cholinomimetycznymi. Działanie acetylocholino jest bardzo szybkie i gwałtowne chociaż krótkie, ponieważ jest ona bardzo szybko rozkładana przez AChE (Danysz, 2002). Dlatego w leczeniu stosuje się leki, które podobnie do acetylocholino pobudzają receptory muskarynowe, ale są od niej wolniej inaktywowane np. matacholina, betanechol, karchol. Stosuje się je w atonii pooperacyjnej jelit i pęcherza moczowego i w jaskrze (Mutschler, Geisslinger, Kroemer & Schäfer-Korting, 2001).
- Antagoniści receptora muskarynowego. Leki te hamują receptory muskarynowe. Leki te ujawniają swoje działanie dzięki temu, że blokują przekazywanie przez acetylocholino pobudzenia na receptory m-cholinergiczne.

czne, znosząc w ten sposób muskarynowe działanie acetylcholino. Leki te znajdują zastosowanie w leczeniu skurczy mięśni gładkich przewodu pokarmowego, dróg żółciowych i moczowych, w zespole Parkinsona, w zaburzeniach rytmu serca, w celu wyłączenia odruchu błędnego. Należą tu: skopolamina, atropina, buscopan (Van Der Staay & Bouger, 2005).

- Pośrednie cholinomimetyki. Do grupy tej należą związki, które hamują acetylcholinoesterazę, przez co zwiększają stężenie acetylcholino i powodują napięcie układu przywspółczulnego i mięśni poprzecznie prążkowanych. Z tego względu leki tego typu są podstawą leczenia choroby nużliwości mięśni - *Miastenia gravis* i choroby Parkinsona. Szczególną rolę odgrywają tu leki takie jak: huperzyna, donazepil, rivastigmina, takryna (Liang & Tang, 2004) czy galantamina i memantyna (Sorbado, Roda, Lopez, Egda & Garcia, 2004; Geerts, 2005).

ROLA CHOLINOESTERAZ W WYBRANYCH JEDNOSTKACH CHOROBYCH

Choroby nowotworowe

AChE odgrywa istotną rolę w powstawaniu chorób nowotworowych. Jej aktywność wiąże się zarówno z procesem trombocytopoezy (Fox & Kaushansky, 2005) jak i hematopoezy (Williams, Boros, Kolanko, Jackman & Egers, 2004). AChE wpływa na proces różnicowania się komórki macierzystej szpiku. Związki fosforoorganiczne hamują ekspresję prekursora AChE i aktywność samego enzymu. Obserwowano znaczny wzrost ryzyka zachorowalności na białaczkę osób poddanych ekspozycji na związki fosforoorganiczne np. isofenfos (Williams et al., 2004). Hamowanie aktywności AChE prowadzi do nadmiaru wolnej acetylcholino ta z kolei aktywuje hematopoezę mieloidową określonego onkogenu (Liberman & Hoffman, 2003). Acetylcholina pobudza proliferację komórek miofibroblastycznych i ekspresję genów kolagenu, wpływa na syntezę kwasów nukleinowych przez istotne podniesienie aktywności polimerazy DNA i RNA oraz wzmacnia cykliczną fosforylację białek (Oben, Yang, Lin, Ono & Diehl, 2003).

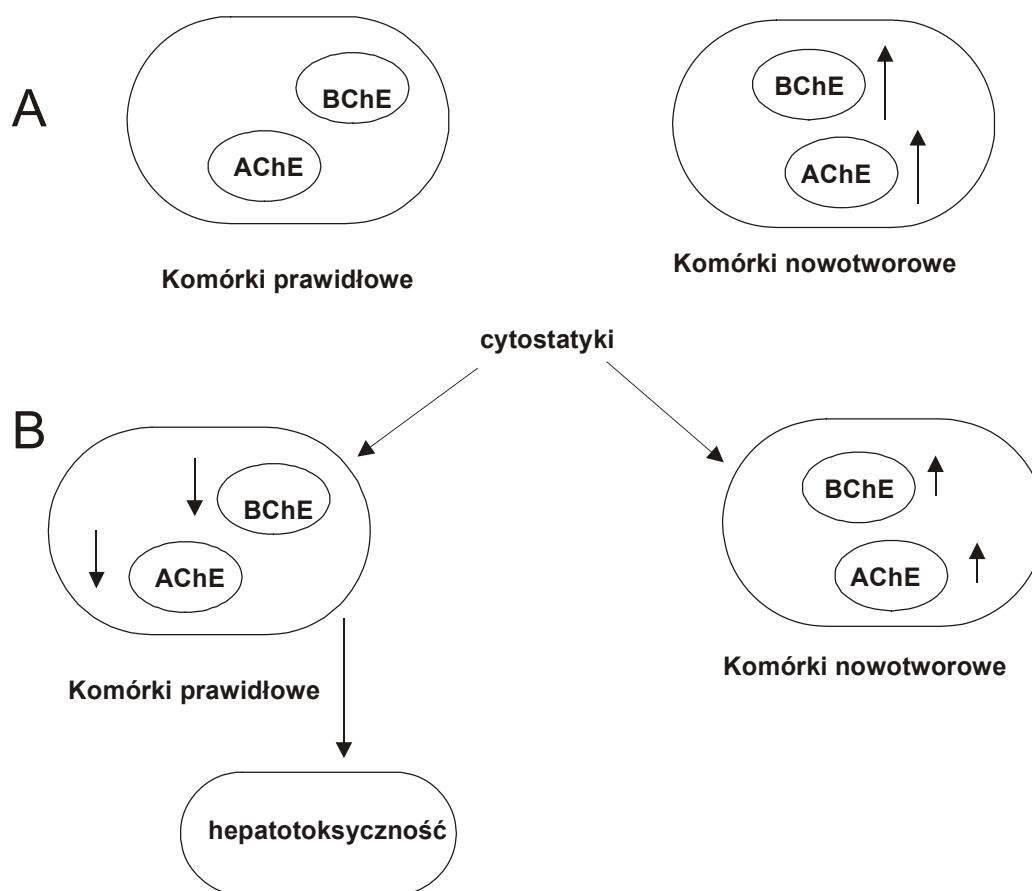
W ostatnim okresie wzrasta zainteresowanie rolą cholinoesteraz w powstawaniu guza mózgu. Barbosa i wsp. (Barbosa, Rios, Velásquez, Villalobos & Ehrmanns, 2001) stwierdził, że aktywność AChE i BChE jest bardzo wysoka

w agresywnych guzach mózgu (glejaku IV, oponiaku, czaszokogardlaku) i znacznie mniejsza w mniej agresywnych guzach (glioma II i III oraz oligodendrogliomie) (Rys. 4. A). Badania ostatnich lat pokazały współistnienie wszystkich molekularnych form AChE i BChE w guzach mózgu i raku wątroby (Saez-Valero & Vidal, 1996; Yokoyama, Kaneko, Dempo, Chisaka, Mori & Onoe, 1982). Unieczynienie BChE hamuje proliferację komórek i komórkowe różnicowanie (Robitzki, Mack, Hoppe, Chatonnet & Layer, 1998). Barbarosa sugeruje, że możliwa jest koamplifikacja aktywności cholinoesteraz uruchamiająca białka CDC 2k-A a także 2k-E, które indukują fazę S cyklu komórkowego, złośliwość komórek nowotworowych w mitozie i dalsze ich namnażanie.

Przeciwnie zmiany aktywności (zdecydowany spadek) AChE i BChE obserwuje się w prawidłowych komórkach pacjentów poddanych chemioterapii. Puche & Perea (2001) stwierdził, że aktywność BChE wyraźnie spadła po 24 godzinach leczenia cytostatykami. Pacjenci chorzy na raka są leczeni wieloma lekami i prolekami, które są eliminowane przez esterazy krwi obwodowej. Spadek aktywności BChE (pełniące funkcje detoksykacyjne) w tej sytuacji może bardzo niepokoić. Ostatecznie spadek BChE może, bowiem wywierać bezpośrednie hepatotoksyczne działanie (Rys. 4. B). Leki takie jak cytostatyki, hormony, interleukiny i interferon wywierają hepatotoksyczne działanie, a znane są również z obniżenia aktywności osoczowej BChE (Taylor, 2004).

Fenyloketenuria

Inną jednostką chorobową, w której obserwuje się znaczące obniżenie aktywności AChE jest fenyloketenuria. Jest to choroba genetyczna spowodowana mutacją pojedynczego genu kodującego hydroksylazę fenyloalaniny. Enzym ten katalizuje przemianę fenyloalaniny do innego aminokwasu, tyrozyny. Gromadzące się w organizmie toksyczne produkty rozkładu fenyloalaniny uszkadzają rozwijający się układ nerwowy chorego dziecka, prowadząc do upośledzenia umysłowego. Ponadto obserwuje się podwyższone stężenie fenyloalaniny we krwi a obniżone stężenie dopaminy i jej prekursora tyrozyny. Stwierdzono, że podwyższone stężenie fenyloalaniny, hamuje aktywność acetylcholinoesterazy we krwi, co prowadzi do gromadzenia dużych ilości acetylcholino (Rys. 5) (Tsakiris, Schulpis, Tjamouranis, Michelakakis & Karias, 2002).



Rys. 4. Aktywność AChE i BChE w komórkach prawidłowych i nowotworowych przed terapią (A) i po terapii cytostatykami (B).

Zakłócenia w budowie kości

Pestycydy fosforoorganiczne - inhibitory AChE, powodują znaczącą redukcję w masie kości i ich gęstości. Długotrwałe narażenie na działanie tych inhibitorów może doprowadzić do zmian strukturalnych kości (Inkson, Brabbs, Grewal, Skerry & Genever, 2004).

AChE występuje w komórkach kościotwórczych, w osteoblastach. AChE uczestniczy w kościach w regulowaniu oddziaływań komórka - matriks. Prawdopodobnie AChE może wiązać się do innych cząsteczek acetylocholinoesterazy obecnych na różnych komórkach albo w ich macierzy poprzez mechanizm podobny do oligomeryzacji wielokrotnych cząsteczek AChE. AChE zlokalizowana na powierzchni komórki wiąże się do AChE w macierzy, dostarczając tym samym mechanizmu dla przylegania osteoblastu. Inkson *et al.*, (2004) uważa, że dzięki ww. właściwościom acetylo-cholinoesteraza umożliwia przyleganie osteoblastów do kości.

Choroba Alzheimer

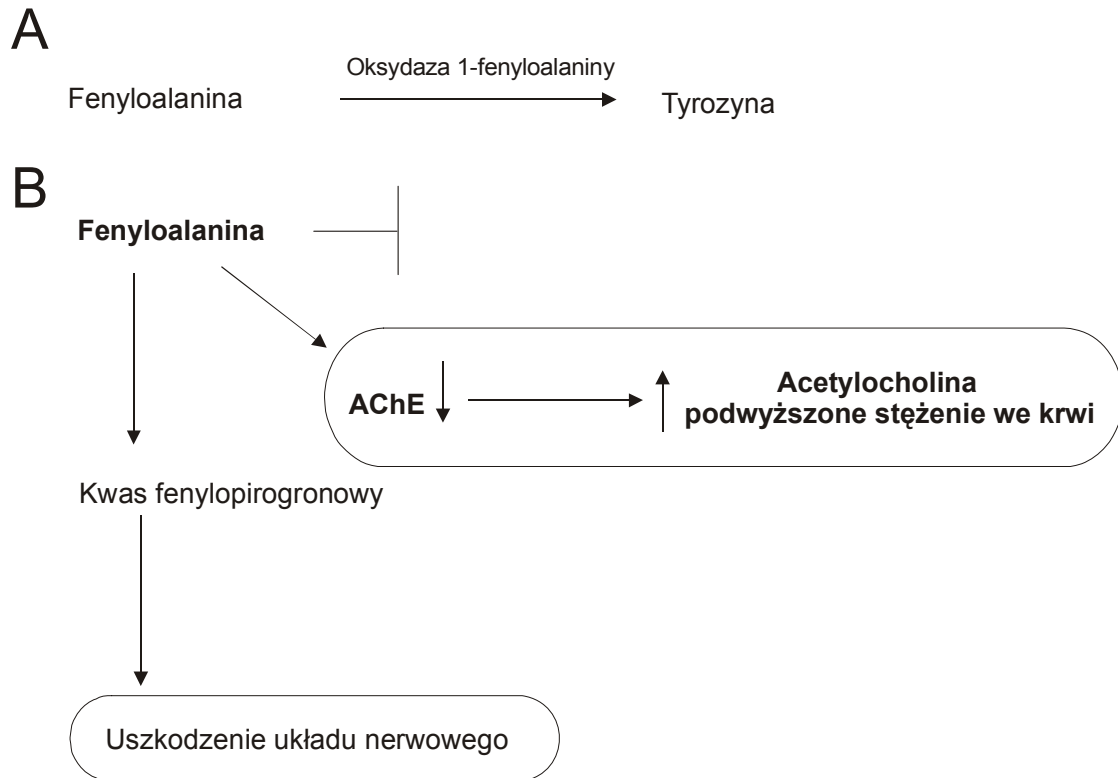
Bezpośrednią przyczyną choroby Alzheimer jest przyspieszone wymieranie pewnych populacji neuronów, powodujące występowanie poważnych zmian psychicznych, które się potęgują i prowadzą do pełnego ośpienia i śmierci. W chorobie Alzheimer dochodzi do stałego i postępującego uszkodzenia, głównie układu cholinergicznego, a więc do ciągłego zmniejszania się acetylocholiny (neuroprzekaźnika). System cholinergiczny odgrywa podstawową, kluczową rolę w uczeniu się i

pamięci a choroba Alzheimer wiąże się bezpośrednio z dysfunkcją systemu cholinergicznego (Yamada & Nebeshima, 2000).

Butyrylocholinoesteraza i acetylocholinoesteraza wykazują aktywność peptydazową niezwykle ważną w patogenezie choroby Alzheimer. Dzięki aktywności peptydazowej, AChE rozkłada białko prekursora amyloidu w miejscu nieamyloidogennym, natomiast BChE jest w stanie produkować białko A β -amyloidu i indukować jego rozpowszechnianie w płytkach β -amyloidowych (Dave, Syal & Katyare, 2000; Barber, Mesular, Kraft & Klein, 1996; Balasubramanian, 2001; Darvesh, Martin, Walsh & Rockwood, 2004). W wyniku ubytku neuronów cholinergicznym znacznie spada stężenie AChE w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimer, natomiast aktywność BChE gwałtownie wzrasta (Giacobini, 2000; Li, Stribley, Ticu, Schopfer & Hammond, 2000). Taką samą sytuację obserwuje się wraz z wiekiem, aktywność AChE spada zaś BChE wzrasta (Meslam, Guillozet, Shaw & Quinn, 2002).

Ostatnio sugeruje się jednak, iż samo białko enzymu AChE może indukować neurologiczne zmiany w chorobie Alzheimer. Stwierdzono, iż kompleks AChE z A β -amyloidem jest znacznie bardziej toksyczny niż sam amyloid i powoduje większe zmiany neurologiczne niż czysta AChE wywołuje powstawanie amyloidu poprzez podwyższoną ekspresję prekursora białkowego w komórkach glejowych. AChE odgrywa także bezpośrednią rolę w wywoływaniu apoptozy komórek nerwowych. (Bukowska, 2005; Bodles & Barger, 2005). Postuluje się,

że związki chemiczne takie jak takryna czy eseryna poprzez hamowanie AChE w neuronach mogą zmniejszać apoptotyczną śmierć tych komórek (Francis, Nordberg & Arnold, 2005).



Rys. 5. Metabolizm feniloalaniny u osób zdrowych (A) i u pacjentów z fenylketonurią (B). Wpływ podwyższonego stężenia feniloalaniny na aktywność AChE we krwi.

Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona występująca u ludzi, przejawia się chroniczną degeneracją Centralnego Układu Nerwowego. U podłoża choroby Parkinsona leży stopniowe zwyrodnienie i zanik tzw. istoty czarnej - miejsca w głębi mózgu odpowiedzialnego za prawidłową koordynację ruchów i odpowiednią sztywność mięśni. Choroba Parkinsona związana jest głównie z systemem dopaminergicznym a nie z systemem cholinergicznym, a niewiele badań dotyczy AChE w tym schorzeniu (Popescu & Lippa, 2004; Greenfield & Vaux, 2002). Wiele badań natomiast wzajemnie się wyklucza donosząc o spadku jej aktywności bądź braku zmian (Sirviö & Riekkinen, 1992; Konings, Kuiper, Mulder, Calliauw & Wolters, 1995). Niemniej obserwuje się u 30 % chorych osób spadek aktywności AChE i zmiany ilościowe jej odpowiednich form cząsteczkowych.

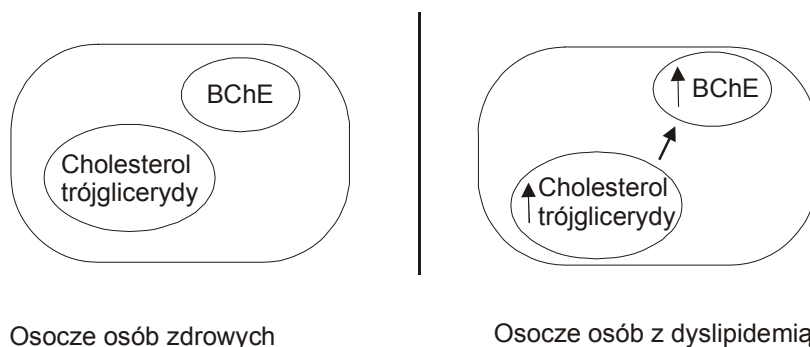
Stany zapalne

Acetylocholinoesteraza poprzez hydrolizę acetylocholino, kontroluje ścieżki metaboliczne związane z odpo-

wiedzią immunologiczną i zapalną u ssaków. Wiąże się to z faktem, że acetylocholina ma bezpośredni wpływ na te procesy (Kawashima & Fujii, 2003; Tracey, 2002; Bodles & Barger, 2005). Istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej i stanach zapalnych odgrywa receptor α -7 nikotynowy (Wang, Ochani, Amella, Tanovic & Susarla, 2003; Tuppo & Arias, 2005), a wszelkie zakłócenia jego funkcjonowania mogą prowadzić do sytuacji patologicznych.

Dislipidemia

W dislipidemii obserwuje się znacznie podwyższoną aktywność BChE, natomiast AChE nie ulega zmianie (Kálmán, Juhász, Rakonczy, Ábrahám, Zana, Boda, Farkas, Penke & Janka, 2004). Podkreśla się również (Alcantra, Chautard-Freire-Maia, Scartezini, Cerci, Braun-Prado & Picheth, 2002), korelację pomiędzy aktywnością osoczowej BChE a wzrostem cholesterolu i trójglicerydów w osoczu człowieka *in vivo* (Rys. 6).



Rys. 6. Aktywności BChE u osób zdrowych i pacjentów z dyslipidemią.

Wzrost aktywności osoczowej BChE był wynikiem zmian powodowanych przez hiperlipidemię w trzeciorzędowej i czwartorzędowej strukturze enzymu. Hipotezę tę potwierdzają oznaczenia aktywności erytrocytarnej błonowej AChE, która jest silnie modulowana przez hydrofobowe środowisko w warunkach *in vitro* (Frenkel, Roelofsen, Brodbeck, Von Deenen & Ott, 1980). Innym wyjaśnieniem wzrostu aktywności BChE w dyslipidemii jest zwiększenie ekspresji genów kodujących białko BChE. Nie ma dostępnych danych, jak cholesterol i triglicerydy wpływają na ekspresję i translację genów białka BChE. Połączenie pomiędzy aktywnością BChE i wydajnością syntezy trójglicerydów było sugerowane u pacjentów z typem IIb cukrzycy (Alcantra *et al.*, 2002; Rustemeijer, Schouten, Voerman, Beynen, Donker & Heine, 2001).

Obserwacje wskazujące, że wzrost aktywności osoczowej BChE jest połączony z typem IIb dyslipidemii mogą być interesujące z klinicznego punktu widzenia, w terapii choroby Alzheimera (Kálmán, Juhász, Rakonczy, Ábrahám, Zana, Boda, Farkas, Penke & Janka, 2004).

W chorobie Alzheimera stosuje się różne inhibitory cholinesteraz i powyższe dane mogą pomagać w ustalaniu klinicznej dawki, która musi być wyższa niż w grupach kontrolnych o prawidłowej aktywności BChE. Darvesh i wsp. (2004) wskazuje na hamowanie aktywności butyrylocholinoesterazy przez niektóre statyny (np. simvastatinę) stosowane w dyslipidemii. Takie hamowanie może sugerować ochronną rolę statyn w powstawaniu chorób neurodegeneracyjnych.

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat z coraz większą precyzją wskazują na związek między chorobami neurologicznymi czy nowotworowymi a zaburzeniami funkcji cholinesteraz. Jak przedstawiono w niniejszym artykule AChE czuwa nad prawidłowym przewodzeniem impulsów zaś BChE pełni funkcje detoksykujące i przez to ma ochronne działanie w stosunku do AChE i całej komórki. Udział cholinesteraz w tak wielu procesach w komórce (m.in. w metabolizmie lipoprotein, adhezji komórek, neurogeniezie) jest niezwykle ważny i jeśli zostanie zaburzony może skutkować wieloma negatywnymi następstwami. Szczególnie istotne wydają się choroby związane z układem nerwowym, które w starzejących się społeczeństwach stanowią ogromny

problem społeczny. Z tego chociażby względu zainteresowanie tymi enzymami z roku na rok rośnie a prace nad ich komórkową rolą prowadzone są w wielu laboratoriach na całym świecie.

PIŚMIENNICTWO

- Abdollahi M., Mostsfalou S., Pournourmohammadi S. & Shadnia S. (2004). Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. 137, 29-34.
- Alcantra V. M., Chautard-Freire-Maia E. A., Scartezini M., Cerci M. S., Braun-Prado K. & Picheth G. (2002). Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62, 399-404.
- Allderice P.W., Garner H. A. R., Galtura D., Lockride O., LaDu B. N. & McAlpines J. (1991). The cloned butyrylcholinesterase (BChE) gene maps to a single chromosome site. *Genomics*. 11, 452-454.
- Altamirano C. V. & Lockride O. (1999). Association of tetramers of human butyrylcholinesterase is mediated by conserved aromatic residues of the carboxy terminus. *Chem-Biol. Int.* 119, 53-60.
- Balasubramanian A. S. (2001). Amyloid beta peptide processing, insulin degrading enzyme and butyrylcholinesterase. *Neurochem. Res.* 26, 453-456.
- Barata C., Solayan A. & Porte C. (2004). Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol.* 66, 125-139.
- Barber K. L., Mesular M. M., Kraft G.A. & Klein W. L. (1996). Butyrylcholinesterase alters the aggregation state of β -amyloid. *Proc. Soc. Neurosci.* 72, 1172-1179.
- Barbosa M., Rios O., Velásquez M., Villalobos J. & Ehrmanns J. (2001). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors. *Surg. Neurol.* 55, 106-112.
- Bodles A. M. & Barger S. W. (2005). Secreted β -amyloid precursor protein activates microglia via JNK and p38-MAPK. *Neurobiology of Aging*. 26, 9-16.
- Bodur E., Çokuğraş A. N. & Tezcan E. F. (2001). Inhibition effects of benactyzine and drofenine on human serum butyrylcholinesterase. *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 25-29.
- Bortozoli A., Duffard R., Antonelli M. & Evangelista de Duffard A. M. (2002). Increased sensitivity in dopamine D2-like brain receptors from 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-exposed and amphetamine challenged rats. *Ann N/Y Acad Sci.* 965, 314-323.
- Brenner T., Hamra-Amitay Y., Evron T., Boneva N., Seidman S. & Soreq H. (2003). The role of readthrough

- acetylcholinesterase in the pathophysiology of *myasthenia gravis*. *FASEB J.* **17**, 214-222.
- Bukowska B. (2004). AChE activity in human erythrocytes incubated with 2,4-D and their phenolic metabolites. In: Abstracts of the XII Conference of Polish Biophysical Society, Wrocław, Sept., 15-17. *Curr. Topics Biophys.* **28** A 18.
- Bukowska B. (2005). Acetylcholinoesteraza – rola w apoptozie komórek nerwowych, chorobach neurologicznych i białaczce. *Postępy Biochemii*. 5. W druku
- Bukowska B., Pieniążek D. & Duda W. (2002). Hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with Roundup. *Curr. Topics Biophys.* **26**, 245-249.
- Carmichael W. W. (1994). The toxin of cyanobacteria. *Sci. Am.* **270**, 64-72.
- Chattonet A. & Lockride O. (1986). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **260**, 625-634.
- Çokuğras A. N. & Tezcan E. F. (1997). Amitriptyline: A potent inhibitor of butyrylcholinesterase from serum. *Gen. Pharmacol.* **29**, 835-838.
- Çokuğras A. N. (2003). Butyrylcholinesterase structure and physiological importance. *Turk J. Biochem.* **28**, 54-61.
- Costa L. G., Cole T. B., Vitalone A. & Furlong C. E. (2005). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta.* **352**, 37-47.
- Danysz A. (2002). Kompendium Farmakologii i Farmakoterapii Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław
- Darvesh S., Kumar R., Roberts S., Walsh R. & Martin E. (2001). Butyrylcholinesterase-mediated enhancement of the enzymatic activity of trypsin. *Cell Mol. Neurobiol.* **21**, 285-296.
- Darvesh S., Martin E., Walsh R. & Rockwood K. (2004). Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases. *Clin. Biochem.* **37**, 42-49.
- Dave K. R., Syal A. R. & Katyare S.S. (2000). Tissue cholinesterase. A comparative study of their kinetic properties. *Z Naturforsch.* **55c**, 100-108.
- Ekholm M. (2001). Predicting relative binding free energies as substrate and inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Theo. Chem.* **572**, 25-34.
- Fox N. E. & Kaushansky K. (2005). Engagement of integrin $\alpha 4 \beta 1$ enhances thrombopoietin-induced megakaryopoiesis. *Exp. Hematol.* **33**, 94-99.
- Fransis P. T., Nordberg A. & Arnold S. E. (2005). A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? *TRENDS in Pharmacol. Sciences* **26**, 104-111
- Frenkel E. J., Roelofs B., Brodbeck U., Van Deenen L. L. & Ott P. (1980). Lipid – protein interactions in human erythrocyte - membrane acetylcholinesterase. Modulation of enzyme activity by lipids. *Eur. J. Biochem.* **109**, 377-382.
- Garcia G., Tagliferro P., Bortolozzi A., Madariaga M., Brusco A., Evangelista de Duffard A. M., Duffard R. & Pecci Saavedra J. (2001). Morphological study of 5-HT neurons and astroglial cells on brain of adult rats perinatal or chronically exposed to 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid. *Neurotoxicology*. **22**, 733-741.
- Garcia G., Tagliferro P., Ferri A., Evangelista de Duffard A. M., Duffard R. & Brusco A. (2004). Study of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in neonate rats lactationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Neurotoxicol.* **25**, 951-957.
- Geerts H. (2005). Indicators of neuroprotection with galantamine. *Brain Res. Bulletin*. **64**, 519-524.
- Giacobini E. (2000). Cholinesterase inhibitors: from the calabrian bean to Alzheimer therapy. W: Giacobini E (red) Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. Martin Dunitz, London. str. 181-226.
- Greenfield S. & Vaux D. J. (2002). Parkinson's disease, Alzheimer's disease and motor neuron disease: identifying a common mechanism. *Neurosci.* **113**, 485-492.
- Grisau D., Detuch V., Shapira M., Pick M., Sternferd M. & Melamed-Book N. (2001). ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant has hematopoietic growth promoting activities. *Mol. Med.* **7**, 93-105.
- Inkson C.A., Brabbs A.C., Grewal T.S., Skerry T.M. & Genever P.G. (2004). Characterization of acetylcholinesterase expression and secretion during osteoblast differentiation. *Bone*. **35**, 819-827.
- Janicki K. (2001). Hematologia. PZWL, Warszawa.
- Kalab T. & Skladal P. (1997). Disposable multichannel immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using acetylcholinesterase as an enzyme label. *Electroanalysis* **9**, 293-297.
- Kálmán J., Juhász A., Rakonczy Z., Ábrahám G., Zana M., Boda K., Farkas T., Penke B. & Janka Z. (2004). Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. *Life Sci.* **75**, 1195-1204.
- Kawashima K. & Fujii T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* **74**, 675-696.
- Konings C. H., Kuiper M. A., Mulder C., Calliauw J. & Wolters E. C. (1995). CSF acetylcholinesterase in Parkinson disease: decreased enzyme activity and immunoreactivity in demented patients. *Clinica Chimica Acta.* **235**, 101-105.
- Kozłowskaya V.I. & Martem'yanov V.I. (1991). Brain acetylcholinesterase activity in the carp *Cyprinus carpio* L., subjected to acute and chronic phenol intoxication. *Gidrobiol. Zh.* **27**, 75-81.
- Kutty K. M. & Payne R.H. (1994). Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. *J. Clin. Lab. Anal.* **8**, 247-250.
- Li B., Stribley J. A., Ticu A., Xie W., Schopfer L. M. & Hammond P. (2000). Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Neurochem.* **75**, 1320-1331.
- Liang Y. Q. & Tang X. C. (2004). Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. *Neurosci. Lett.* **361**, 56-59.
- Liberman D. A. & Hoffman B. (2003). Myeloid differentiation (MyD) primary response genes in hematopoiesis. *Blood Cells Mol. Dis.* **31**, 213-228.
- Lockride O. (1990). Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmac. Ther.* **47**, 35-60.
- Lockride O., Mottershow-Jackson N., Eckerson H. W. & LaDU B. N. (1980). Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *J. Pharmac. Exp.* **215**, 1-8.
- Masson E., Froment M. T., Fortier P. L., Visicchio J. E., Bartels C. F. & Lockride O. (1998). Butyrylcholinesterase – catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin related neutral esters. *Biochim. Biophys. Acta* **1387**, 41-52.
- Masson E., Xie W., Froment M. T. & Lockride O. (2001). Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with Ω loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1544**, 166-176.
- Meslam M., Guillozet A., Shaw P. & Quinn B. (2002). Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology of Disease* **9**, 88-93.
- Müller T. C., Rocha J.B.T., Morsch V. M., Neis R. T. & Schetinger M. R. C. (2002). Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**, 92-98.

- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K. & Schäfer-Korting M. (2001). *Farmakologia i toksykologia*. Red. Danysz A. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław.
- Oben J. A., Yang S., Lin H., Ono M. & Diehl A. M. (2003). Acetylcholine promotes the proliferation and collagen gene expression of myofibroblastic hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 172-177.
- Pereira M. E., Adams A. I. H. & Silva N. S. (2004). 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol. Lett.* **146**, 269-274.
- Perry C., Sklan E. H. & Soreq H. (2004). CREB regulates ACHE-R-induced proliferation of human glioblastoma cells. *Neoplasia*. **6**, 279-288.
- Pick M., Flores-Flores C., Grisar D., Shochat S., Deutch V. & Soreq H. (2004). Blood-cell-specific acetylcholin-esterase splice variations under changing stimuli. *Int. J. Devl. Neurosc.* **22**, 523-531.
- Pieniążek D., Bukowska B. & Duda W. (2004). Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pest. Biochem. Physiol.* **79**, 58-63.
- Pieniążek D., Bukowska B., Sicińska P. & Duda (2004). Wpływ występujących w wodach rejonu Borów Tuchołskich herbicydów fenoksyoctowych i fosfonianowych na erytrocyty człowieka oraz wynikające z ich występowania zagrożenia dla ekosystemów naturalnych. XI Ogólnopolska Konferencja Naukowa - Diagnostowanie stanu środowiska, metody badawcze - prognozy. Kompleksowe badania i ochrona środowiska naturalnego, s.134-144, red. S. Borsuk. Tleń, 8-9 listopada 2004.
- Popescu A. & Lippa C. F. (2004). Parkinsonian syndromes: Parkinson's disease dementia, dementia, with Lewy bodies and progressive supranuclear palsy. *Clin. Neurosci. Res.* **3**, 461-468.
- Puche E. & Perea M. (2001). Esterases and anti-tumoral chemotherapy: an interaction of clinical and toxicological interest. *Clinica Chimica Acta*. **304**, 133-136.
- Quinn D. M. (1987). Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Rev.* **87**, 955-979.
- Rickwood C. J. & Galloway T. S. (2004). Acetylcholin-esterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicol.* **67**, 45-56.
- Robitzki A., Mack A., Hoppe U., Chatonnet A. & Layer P. G. (1998). Butyrylcholinesterase antisense transfection increased apoptosis in differentiating retinal reagregates of the chick embryo. *J. Neurochem.* **71**, 413-420.
- Rosenberry T. L. (2004). New inhibitors of the peripheral site in acetylcholinesterase that specifically block organophosphorylation. *Gort Reports Announcements & Index (GRA&I)* 03.
- Rosso S. B., Caseres A. O., Evangelista de Duffard A. M., de Duffard R. O. & Quiroga S. (2000). 2,4-dichlorophenoxyacetic acid disrupts the cytoskeleton and disorganizes the Golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicol. Sci.* **56**, 133-140.
- Rustemeijer C., Schouten J. A., Voerman H. J., Beynen A. C., Donker A. J. & Heine R. J. (2001). Is pseudocholin-esterase activity related to markers of triglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? *Clin Sci (Lond)*. **101**, 29-35.
- Saez-Valero J. & Vidial C. J. (1996). Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma. *Biochim. Biophys. Acta* **1317**, 210-218.
- Schallreuter K. U., Elwary S. M. A., Gibbons N. C. J., Rokos H. & Wood J. M. (2004). Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 502-508.
- Schwarz M., Glick D., Loewenstein Y. & Soreq H. (1995). Engineering of human cholinesterase explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol. Ther.* **67**, 283-322.
- Seńczuk W. (1999). *Toksykologia*. PZWL, Warszawa.
- Sirviö J. & Riekkinen P. J. (1992). Brain and cerebro-spinal fluid cholinesterases in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and aging. A critical review of clinical and experimental studies. *J Neural. Transm.* **4**, 337-358.
- Sobrado M., Roda J. M., Lopez M. G., Egea J. & Garcia A. G. (2004). Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* **365**, 132-136.
- Sun H., Pang Y. P., Lockridge O. & Brimijoin S. (2002). Re-engineering Butyrylcholinesterase as a Cocaine Hydrolase. *Mol. Pharmacol.* **62**, 220-224.
- Sun H., Yazal J.E., Lockridge O., Schopfer L.M., Brimijoin S. & Pang Y.P. (2001). Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butyrylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **276**, 9330-9336.
- Sussman J.L., Hardel M. & Silman I. (1992). In multidisciplinary approaches to cholinesterase function. Shaffermann A, Velan B. Eds. *Plenum Press*, New York. 95-108.
- Sussman J. L., Hardel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Tokar L. & Silman I. (1991). Atomic - structure of Acetylcholinesterase from Torpedo - California - A Prototypic acetylcholine - binding protein. *Science* **253**, 872-879.
- Talesa V. N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1961-1969.
- Taylor P. (2004). Cholinesterase structure: identification of mechanisms and residues involved in organophosphate and enzyme reactivation. Govt. Reports Announcements & Index (GRA&I). 2.
- Thattai U. & Dahanukar S. (1997). Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs*. **54**, 511-532.
- Tougu V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and inhibition. *Curr. Med. Chem-Central Nervous System Agents*. **1**, 155-170.
- Tracey K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853-859.
- Tsakiris S., Schulpis K. H., Tjamouranis J., Michelakakis H. & Kariasis G. A. (2002). Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Clin. Biochem.* **35**, 615-619.
- Tuppo E. E. & Arias H. R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **37**, 289-305.
- Van Der Staay F.J. & Bouger P.C. (2005). Effect of the cholinesterase inhibitors donepezil and metrifonate on scopolamine-induced impairments in the spatial cone field orientation task in rats. *Behavioural Brain Res.* **156**, 1-10.
- Wang H., Yu M., Ochani M., Amella C. A., Tanovic M. & Susarla S. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. **421**, 384-388.
- Wilkinson D. G., Francis P. T., Schwam E. & Parris J. (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. **21**, 453-478.
- Williams R. D., Boros L. G., Kolanko C. H. J., Jackman S. M. & Egers T. R. (2004). Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to the anticholinesterase pesticide isofenphos with mechanisms of leukemogenesis. *Leuk. Res.* **28**, 947-958.
- Worek F., Eyer P., Kiderlen D., Thiermann H. & Szinicz L. (2000). Effect of human plasma on the reactivation of sarin-

- inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase. *Arch. Toxicol.* **74**, 21–26.
- Yamada S. & Nebeshima T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol. Therap.* **88**, 93-113.
- Yokoyama S., Kaneko A., Dempo K., Chisaka N., Mori M. & Onoe T. (1982). Histochemical and cytochemical study of butyrylcholinesterase activity in rat hepatocellular carcinomas induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **42**, 4158-4163.