

Sławomir Graweicz

MOŻLIWE NASTĘPSTWA INHIBICJI ACETYLOCHOLINOESTERAZY W ZATRUCIU ZWIĄZKAMI FOSFOROORGANICZNYMI – DYSKUSJI CIĄG DALSZY

POSSIBLE CONSEQUENCES OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION IN ORGANOPHOSPHATE POISONING. DISCUSSION CONTINUED

Z Zakładu Toksykologii i Kancerogenezy

Instytutu Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera w Łodzi

STRESZCZENIE

Wielu toksykologów nadal uważa, że jedyną fizjologiczną rolą acetylocholinoesterazy (AChE) jest katalizowanie hydrolitycznego rozkładu neurotransmitera acetylocholine (ACh), a toksyczność pestycydów fosforoorganicznych (PFO) wynika z ich zdolności do pozbawiania AChE właściwości katalitycznych. Pogląd ten wymaga gruntownej rewizji w świetle dokonanych ostatnio odkryć, dotyczących struktury i funkcji AChE a także regulacji syntezy tego białka w warunkach stresu. Nie ulega obecnie wątpliwości, że oprócz wspomagania hydrolitycznego rozkładu ACh, AChE pełni również funkcje nieenzymatyczne: troficzną (pobudza neurotogenezę) oraz neuromodulacyjną (promuje rozwój długotrwałych zmian czynnościowych w ośrodkowym układzie nerwowym). Związanie z pestycydem fosforoorganicznym nie upośledza nieenzymatycznych funkcji AChE inicjując jednocześnie proces wzmożonej syntezy tego białka. Prowadzi to do nadmiernej ekspresji nieenzymatycznych funkcji AChE. Niewykluczone, że ta nadmierna ekspresja funkcji nieenzymatycznych jest powodem przynajmniej części długotrwałych zmian czynnościowych, które mogą rozwijać się w następstwie narażenia na PFO. Med. Pr., 2006;57(3):291–302

Słowa kluczowe: acetylocholinoesteraza, pestycydy fosforoorganiczne, stres

ABSTRACT

Numerous toxicologists still believe that the only function of acetylcholinesterase (AChE) is to catalyse the hydrolysis of acetylcholine (ACh), and that the toxicity of organophosphorous pesticides (OP) results from their ability to switch this function off. This viewpoint, however, requires revision in the light of the recent findings concerning the AChE structure and function as well as in view of the regulation of the AChE protein synthesis in conditions of stress. There is now no doubt that apart from catalysing the ACh hydrolysis, AChE performs also nonenzymatic functions, trophic (eg., stimulation of neurogenesis and remodeling) and neuromodulatory (promotion of long-term functional changes in the central nervous system). Binding to OP does not interfere with its nonenzymatic functions, but it stimulates AChE mRNA transcription and overproduction of the AChE protein. This results in overexpression of nonenzymatic AChE functions. It is likely that this overexpression is responsible for at least some of the persistent alterations in the CNS functions which may develop after an OP exposure. Med Pr 2006;57(3):291–302

Key words: acetylcholinesterase, organophosphorous pesticides, stress

Adres autora: św. Teresy 8, 91-348 Łódź, e-mail: gra@imp.lodz.pl

Nadesłano: 12.04.2006

Zatwierdzono: 10.05.2006

ZDROWOTNE SKUTKI NARAŻENIA NA PESTYCYDY FOSFOROORGANICZNE

Spora część pestycydów stosowanych w rolnictwie i gospodarstwach domowych, to inhibitory esterazy acetylocholinoesterazy (EC 3.1.1.7), częściej nazywanej acetylocholinoesterazą (AChE). AChE katalizuje hydrolityczny rozkład neuroprzekaźnika acetylocholine (ACh), dzięki czemu pełni rolę regulatora poziomu transmisji w cholinergicznie unerwianych i kluczowych dla życia obszarach ośrodkowego układu nerwowego i efektorach obwodowych. Zahamowanie AChE, tzn. pozbawienie jej właściwości katalitycznych, prowadzi do akumulacji ACh w synapsach, co skutkuje najpierw nadmierną aktywacją receptorów cholinergiczych, a następnie

ich odwróceniem i zablokowaniem przewodnictwa. Transmisja cholinergiczna odgrywa jednak kluczową rolę nie tylko u poddawanych eksterminacji szkodników, lecz również u gatunku dokonującego eksterminacji. Według przybliżonych ocen, co roku około miliona osób (większość z obszarów południowo-wschodniej Azji) traci życie wskutek zatrucia inhibitorami AChE. Niewykluczone, że wielokrotnie więcej osób traci zdrowie w następstwie łżejszych zatruc, z których tylko część jest zgłaszana służbom medycznym (1,2).

Większość pestycydów antycholinoesterazowych, znajdujących się w obrocie, to estry kwasu fosforowego i jego pochodnych. Dlatego też określa się je często mianem pestycydów fosforoorganicznych – PFO. Charak-



teryzuje je wysoka trwałość wiązania z AChE; powrót katalitycznej aktywności AChE do poziomu sprzed zatrucia trwa zwykle wiele dni, a nawet tygodni. Sprawność czynnościowa synaps cholinergiczných powraca – przynajmniej na pozór – znacznie wcześniej dzięki mechanizmom adaptacyjnym działającym na poziomie komórkowym i subkomórkowym (3).

Obraz ostrych skutków zatrucia PFO – objawy muskarynowe, nikotynowe i ośrodkowe – jest doskonale znany (3) i nie ma potrzeby jego omawiania. Ustąpienie objawów ostrych (w następstwie podjętej terapii, a także dzięki uruchomieniu przez organizm mechanizmów detoksykacyjnych i adaptacyjnych, reaktywacji, a także syntezy *de novo*, AChE) nie zawsze jednak oznacza powrót do zdrowia. Pewne skutki mogą ujawnić się dopiero po kilku dniach, a nawet tygodniach od wniknięcia trucizny do organizmu. Wśród tych skutków wyróżnia się tzw. zespół pośredni (intermediate syndrome – IS), neuropatię obwodową (organophosphorus-ester induced delayed neuropathy – OPIDN) oraz różnorodne dysfunkcje ośrodkowego układu nerwowego dla których brak wspólnego terminu. Czasem określa się je mianem chronicznej neurotoksyczności po zatruciu PFO (organophosphorus ester – induced chronic neurotoxicity, OPICN) (4).

Dominującym objawem w IS jest niedowład mięśni karku i kończyn górnych, lecz także mięśni oddechowych, zwłaszcza przepony, podniebienia oraz mięśni gałek ocznych. Jest to skutek długotrwałej, nadmiernej aktywacji cholinergiczných (nikotynowych) receptorów płytek ruchowych. W krańcowych przypadkach może dochodzić do rabdolizy (nekrozy sarkomerów), prawdopodobnie wskutek nagromadzenia wapnia w komórkach mięśniowych. IS rozwija się w ciągu 1–4 dni od wniknięcia trucizny do organizmu i cofa w ciągu kilkunastu dni nie pozostawiając trwałych śladów (5,6).

Symptomatologia OPIDN obejmuje zaburzenia ruchowe (niedowłady) i czuciowe (parestezje), zwłaszcza w obrębie kończyn dolnych. Są one związane z postępującymi zmianami zwyrodnieniowymi w nerwach czuciowych i ruchowych wskutek upośledzenia transportu aksonalnego. Przyczyną upośledzenia transportu nie jest jednak inhibicja AChE, lecz prawdopodobnie innej esterazy, zwanej – od domniemanego skutku inhibicji – esterazą neuropatyczną (neuropathy target esterase – NTE). Jako możliwą przyczynę upośledzenia transportu aksonalnego w OPIDN wskazuje się również nadmierną fosforylację kinaz białkowych, zwłaszcza wapniowo-kalmodulinowo zależnej kinazy II (1). Objawy OPIDN występują po upływie kilku tygodni od zatrucia (stąd

nazwa – neuropatia opóźniona). Powrót do zdrowia jest bardzo powolny (lata) i często niepełny(3).

OPICN charakteryzuje się występowaniem różnorodnych zaburzeń, zwłaszcza w sferze emocyjnej (labilność emocjonalna, stany depresyjne, drażliwość) i poznawczej (upośledzenie pamięci, kłopoty z koncentracją uwagi). Niektórzy autorzy (7,8) zwracają uwagę na istotne podobieństwo symptomatologii OPICN do symptomatologii zespołu stresu pourazowego (posttraumatic stress disorder – PTSD). Zaburzenia te utrzymują się przez lata, a ich mechanizm pozostaje nieznanym (1,3). Wydaje się jednak nie ulegać wątpliwości, że OPICN, w odróżnieniu od OPIDN, jest następstwem interakcji PFO z AChE. Przedmiotem niniejszego artykułu jest omówienie tych interakcji i ich znaczenia w rozwoju długotrwałych skutków narażenia na PFO.

Związanie PFO z AChE powoduje, że traci ona zdolność hydrolitycznego rozkładu acetylocholin, tzn. traci funkcję regulatora transmisji cholinergicznę. Istnieje jednak szereg dowodów świadczących, że nie jest to jedyna fizjologiczna funkcja AChE. Od dawna wiadomo, że w układzie nerwowym lokalizacja AChE nie pokrywa się z lokalizacją drugiego głównego markera cholinergicznego: transferazy acetylocholinowej (9). Obecność AChE stwierdzono w neuronach układu dopaminergicznego, adrenergicznego i serotonergicznego. Co więcej, AChE jest obecna w wyjątkowo dużych ilościach w neuronach różnicujących się, przed wykształceniem synaps, gdy transmisja synaptyczna nie jest jeszcze możliwa (10). Obecnie wiadomo, że oprócz „klasycznej” funkcji hydrolizy ACh, AChE odgrywa również istotne znaczenie w procesach różnicowania i wzrostu komórek nerwowych, hematopoezie, regulacji stanu czynnościowego w układzie dopaminergicznym oraz indukcji długotrwałych zmian czynnościowych w strukturach OUN (10–14). AChE wydaje się również co najmniej współodpowiedzialna za tworzenie złogów amyloidu w chorobie Alzheimera (15,16).

W świetle powyższego nasuwają się pytania czy i w jaki sposób wiązanie z PFO może wpływać na nieenzymatyczne funkcje AChE oraz jakie mogą być skutki zdrowotne tego wpływu. Pytań tych nie stawia większość istniejących toksykologiczných opracowań dotyczących PFO. Odpowiedź na nie może mieć istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój OPICN. Przed kilkoma laty poruszyłem ten problem w artykule opublikowanym w Medycynie Pracy (17). Inspiracją do jego napisania była praca Margaret Appleyard, w której autorka wykazała, że AChE co najmniej współdziała w indukcji skutku znanego jako



długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (long-term potentiation – LTP) i uznawanego za przejaw funkcjonowania mechanizmów odpowiedzialnych za zapamiętywanie. Zdaniem autorki, uzyskane przez nią informacje mogły oznaczać, że AChE – przynajmniej ta obecna w mózgu – odgrywa istotną rolę w indukcji zmian stanowiących materialne podłoże pamięci oraz, że rola ta nie jest związana z funkcją katalityczną (18).

Dolegliwości sugerujące osłabienie procesów uczenia się i zapamiętywania należą do głównych objawów charakteryzujących OPICN. Dlatego też obserwacje Appleyard pozwalały podejrzewać, że ich przyczyną może być nie tylko upośledzenie katalitycznej funkcji AChE i spowodowana tym przejściowa nadczynność cholinergiczna, lecz również – a może przede wszystkim – upośledzenie funkcji nieenzymatycznej. Informacje uzyskane w kilku ośrodkach badawczych w ciągu ostatnich dziesięciu lat skłaniają do rewizji powyższego przypuszczenia. Wynika z nich bowiem, że związanie z PFO nie musi prowadzić do upośledzenia nieenzymatycznej funkcji AChE. Dlatego też należało powrócić raz jeszcze do problemu interakcji PFO z AChE i możliwych konsekwencji tych interakcji. Na wstępie przedstawiono – dla przypomnienia – kilka podstawowych informacji dotyczących struktury i właściwości AChE. Wybór tych informacji był podporządkowany celom niniejszego artykułu. Czytelnik chcący zapoznać się bardziej szczegółowo z problematyką AChE i fizjologicznej roli tego białka może skorzystać z opublikowanych artykułów przeglądowych (13,19–23).

ACETYLOCHOLINOESTERAZA

AChE jest enzymem należącym do sporej rodziny esteraż rozkładających estry karboksylowe (24). Jej czwartorzędowa struktura przypomina nieco dzbanek z wąskim gardłem. W jego dnie znajduje się centrum katalityczne, zawierające katalityczną triadę (Ser 200, His 440, i Glu 327). Na obrzeżu, odległym o ok 20 Å od dna, znajduje się drugi, bardzo istotny z punktu widzenia funkcji AChE obszar, określany jako peryferyjne miejsce anionowe (peripheral anionic site – PAS). Jest to miejsce wiązania wielu różnych ligandów. Jedną z funkcji PAS, lecz nie jedyną, jest regulacja czynności centrum katalitycznego (25).

ACETYLOCHOLINOESTERAZA – WARIANTY

Genomy kręgowców zawierają dwa geny cholinoesterazowe, z których jeden koduje AChE, natomiast drugi butyrylcholinoesterazę (BuChE). AChE i BuChE róż-

nią się specyficznością substratową; BuChE hydrolizuje acetylocholinę i butyrylocholinę, natomiast AChE – tylko acetylocholinę. Różnica ta jest związana z wielkością kieszeni acylowej aktywnego centrum tych enzymów. Gen *ACHE* jest stosunkowo mały (7 kD). W wyniku posttranskrypcyjnej obróbki (alternatywnego składowania) pierwotnego transkryptu AChE mRNA mogą powstać trzy warianty AChE, różniące się budową, lokalizacją i sposobem wiązania z błonami komórkowymi:

- wariant AChE-S – synaptyczny. Występuje w formie tetramerów związanych z błoną synaptyczną;
 - wariant AChE-E – erytrocytarny. Występuje w formie dimerów związanych z błoną erytrocytów;
 - wariant AChE-R – rozpuszczalny monomer.
- W odróżnieniu od AChE-S i AChE-E, w końcu karboksylowym AChE-R nie ma cysteiny, co sprawia, że wariant ten nie ma zdolności wiązania się z błonami komórkowymi. Dlatego też pozostaje wewnątrz komórek lub jest uwalniany. AChE-R występuje w komórkach zarodkowych i komórkach nowotworowych.

W mózgu i mięśniach ssaków obecna jest przede wszystkim AChE-S. W mózgu obecna jest również AChE-R, lecz ilość tego wariantu jest normalnie znikoma – ok. 1% całej puli AChE. Jednak w warunkach stresu, a także po narażeniu na inhibitory AChE, odsetek AChE-R istotnie wzrasta. Dlatego też wariant R jest czasem określany mianem AChE stresowej (23).

ENZYMATYCZNA FUNKCJA AChE

Wszystkie formy AChE posiadają zdolność hydrolitycznego rozkładu ACh. AChE-S katalizuje rozkład ACh w cholinergicznych synapsach nerwowo-nerwowych i nerwowo-mięśniowych. AChE-E rozkłada ACh obecną we krwi obwodowej regulując w ten sposób działanie tego neurotransmitera na układ odpornościowy. AChE-R jest enzymem „ratunkowym”. W ośrodkowym układzie nerwowym i na obwodzie (w osoczu) ilość ACh istotnie wzrasta po narażeniu na różnorakie stresory (23), co sprzyja szybkiemu przywróceniu równowagi czynnościowej w układzie cholinergicznym.

Warunkiem pełnienia katalitycznej funkcji przez AChE jest dostępność centrum aktywnego (zawierającego katalityczną triadę) dla substratu. Trwałe wiązanie, np. PFO z grupą hydroksylową seryny w centrum aktywnym, czyni AChE niezdolną do katalitycznego rozkładu acetylocholíny (hamowanie kompetytywne). „Wydajność katalityczna” centrum aktywnego kontrolowana jest również allosterycznie przez PAS. Naturalnym endogennym ligandem PAS jest ACh. ACh w nadmia-



rze hamuje (niekompetytywnie) aktywność katalityczną AChE (26–30). Istnieje również szereg egzogennych ligandów PAS, np. faskykulina – jad zielonej mamby, zdolnych skutecznie i długotrwale blokować katalityczną funkcję AChE (31,32).

NIEENZYMATYCZNE WŁAŚCIWOŚCI AChE

Poza hydrolitycznym rozkładem acetylocholin i kontrolą przekazywania cholinergicznego AChE pełni co najmniej jeszcze dwie funkcje fizjologiczne: morfogenną oraz neuromodulacyjną. Istnieją ponadto dowody wskazujące na istotne znaczenie AChE w procesie hematopoezy oraz w rozwoju zmian zwyrodnieniowych związanych z różnego rodzaju urazami układu nerwowego oraz z wiekiem (choroby zwyrodnieniowe).

Morfogenna funkcja AChE. Większość informacji wskazujących na morfogenną funkcję AChE pochodzi z badań nad ekspresją AChE w różnych fazach rozwoju układu nerwowego oraz z badań nad skutkami egzogennej AChE w kulturach komórkowych lub tkankowych. Ekspresja AChE jest najsilniejsza podczas neurytogenezy (tworzenia wypustek) i słabnie w okresie tworzenia synaps (33). Dobrym przykładem są projekcyjne neurony wzgórzowe, gdzie AChE pojawia się obficie wkrótce po urodzeniu i znika po upływie 2–3 tygodni. Okres obecności AChE koresponduje z okresem intensywnego wzrostu ich połączeń z celami komórkowymi w korze mózgowej (33). Pobudzające wpływ AChE w neurytogenezie potwierdzają również wyniki badań na kulturach komórkowych i tkankowych. Silniejszy rozrost wypustek nerwowych po dodaniu AChE do medium stwierdzono w kulturach hipokampalnych, zarówno embrionalnych, jak i postnatalnych. Zdaniem autorów AChE jest konieczna do normalnego rozwoju aksonów i dendrytów (34,35). Stymulujące działanie AChE na rozwój wypustek stwierdzono również w badaniach na innych modelach doświadczalnych *in vitro*: dopaminergicznych neuronach ślimaka morskiego *Aplysia* (36) i komórkach zwojów grzbietowych, pobranych z rozwijających się zarodków szczurzych (37). W tych ostatnich badaniach dodanie do kultury przeciwciał wiążących AChE powodowało odklejanie się neurytów od podłoża i zahamowanie ich wzrostu, co oznacza, że stymulowanie neurytogenezy przez AChE jest związane z jej właściwościami adhezyjnymi. Właściwości te wynikają ze strukturalnego podobieństwa cząsteczki AChE do neuroliginy-1, białka adhezyjnego (37). Wykazano ponadto, że o właściwościach adhezyjnych AChE decyduje peryferyjne miejsce anionowe (38).

Rola AChE w procesie synaptogenezy nie jest jasna. Wspomniane już badania Oliveiry i wsp. (34) sugerowały, że AChE stymuluje tworzenie synaps. Z kolei z badań Donga i wsp. (39) przeprowadzonych na podobnym modelu doświadczalnym, wynika, że AChE, promując rozrost neurytów, hamuje synaptogenezę. Te ostatnie obserwacje pozostają w zgodzie z wspomnianymi wcześniej rezultatami badań morfogenetycznych, z których wynika, że ekspresja AChE słabnie w okresie nasiloniej synaptogenezy.

Z niedawno opublikowanej pracy Dori i wsp. (40) wynika, że AChE (R i S) odgrywa istotne znaczenie w rozwoju układu nerwowego jako kontroler procesu proliferacji komórek nerwowych w strefie przykomorowej (ventricular zone) i ich migracji do miejsc przeznaczenia. Wiadomo obecnie, że neurogeneza zachodzi również w dojrzałym mózgu (41–43). Jak dotychczas brak danych na temat roli AChE w tej późnej neurogeniezie. Niewykluczone jednak, że jest równie istotna, jak w okresie rozwoju układu nerwowego.

AChE jako neuromodulator. W szeregu badań, prowadzonych głównie przez zespół prof. Suzan Greenfield, wykazano, że AChE jest uwalniana z tkanki nerwowej w odpowiedzi na bezpośrednie drażnienie mózgu lub nerwów obwodowych (10). Wydzielanie to nie ma prawdopodobnie związku z transmisją cholinergiczną; AChE jest wydzielana obficie w obszarach, w których poziom acetylotransferazy cholinyl, markera neuronów cholinergicznych, jest bardzo niski (44). W korze mózdzku AChE jest uwalniana z niecholinergicznych zakończeń nerwowych (45). Obwodowe podanie amfetaminy powoduje uwalnianie AChE z neuronów dopaminergicznych istoty czarnej (46), przy czym uwalnianie to nie jest związane z zachowaniem (ruchowym) emitowanym podczas aktywności tych neuronów.

Fizjologiczne znaczenie procesu uwalniania AChE pod wpływem bodźców nie jest jasne. Zebrane dowody nie pozostawiają jednak wątpliwości, że białko to w istotny sposób wpływa na stan czynnościowy neuronów. Dodanie AChE do medium wpływa korzystnie na rozwój i przeżywalność neuronów dopaminergicznych w hodowli, co sugeruje funkcję troficzną. W obecności egzogennej AChE reakcja komórek Purkiniego na pobudzenie kwasem glutaminowym jest silniejsza (45). W badaniach na skrawkach hipokampa wykazano, że AChE indukuje LTP (18,) natomiast w skrawkach śródmózgowia AChE hyperpolaryzuje błonę neuronów dopaminergicznych i zmniejsza ich oporność wejściową (44). Takie działanie sugeruje ułatwienie czynności neuronalnej. Zablockowanie AChE somanem nie wpływało



na skuteczność AChE w indukcji wspomnianych efektów, co oznacza, że zależą one od innej niż katalityczna właściwość tego enzymu (18).

Pewne obserwacje wskazują, że następstwa wydzielonej AChE mogą być zaskakująco długotrwałe. Po jednorazowym podaniu AChE do istoty czarnej reakcja lokomocyjna na podaną obwodowo amfetaminę jest nasiloną i efekt ten utrzymuje się przez wiele tygodni (47). Wysłunięto przypuszczenie, że przyczyną tej wzmożonej wrażliwości jest spowodowane przez AChE długotrwałe ułatwienie uwalniania dopaminy z neuronów istoty czarnej. Warto w tym miejscu wspomnieć, że podobna zmiana może rozwinąć się po jednorazowym lub wielokrotnym, dootrzewnowym podaniu psychostymulanta lub potraktowaniu silnym stresorem fizycznym lub psychicznym (48). Oba te czynniki prowadzą do nasilonej sekrecji AChE (23, 46,49). Z powyższych obserwacji wynika, że AChE pełni prawdopodobnie rolę neuromodulatora oraz, że rola ta nie jest związana z funkcją katalityczną.

AChE a choroba Alzheimer. Znaczenie AChE w chorobie Alzheimer zostało omówione szczegółowo w pracy przeglądowej przez Talesa (50). Ilość AChE maleje w chorobie Alzheimer. Spadek dotyczy przede wszystkim formy AChE-S, co związane jest głównie ze śmiercią neuronów cholinergiczych. Dlatego też wartość proporcji AChE-R/AChE-S istotnie wzrasta (51). W mózgach chorych na chorobę Alzheimer większość AChE jest zlokalizowana w złogach amyloidu (52), co sugeruje związek pomiędzy złogami i AChE. Sugestię tę potwierdzają wyniki badań doświadczalnych. AChE stymuluje przekształcanie globularnej, rozpuszczalnej formy białka amyloidu w formę fibrylarną, nierozpuszczalną, która stanowi podstawowy składnik złogów (53). AChE okazuje się ponadto białkiem neurotoksycznym. W niedawno przeprowadzonych badaniach na szczurach (16) wykazano, że podanie AChE bezpośrednio do hipokampa powoduje ubytki neuronów w tym obszarze i upośledza procesy pamięciowe. Zdaniem niektórych autorów, jest możliwe, że lokalne zwiększenie stężenia AChE w mózgu pod wpływem szczególnie silnych stresorów fizycznych lub psychicznych (np. zagrażające sytuacje bez wyjścia) może uruchamiać proces zwyrodnieniowy. Według Greenfield i Vaux (10), uszkadzające działanie AChE na neurony może wynikać ze zdolności tego białka do ułatwiania wnikania jonów wapnia do komórek przez kanał wapniowy L (35). Zwiększenie stężenia wapnia może być sygnałem uruchamiającym procesy rozrostowe, lecz również kaskadę zdarzeń kończących się śmiercią. Rodzaj efektu zależy od zdolności komórki

do kontrolowania wewnątrzkomórkowego stężenia tego kationu: gdy jest wysoka, jak w przypadku komórek młodych i komórek zachowujących zdolności rozwojowe przez całe życie, ułatwione wnikanie wapnia stymuluje procesy rozrostowe, lecz gdy jest niska, jak w przypadku komórek dojrzałych i wysoce zróżnicowanych, uruchamia proces destrukcji (10,54). Warto podkreślić, że AChE uwalniana w następstwie stresu i AChE dominująca w chorobie Alzheimer to wariant rozpuszczalny, występujący normalnie w komórkach embrionalnych (55), a więc forma specyficznie zaangażowana w proces rozwojowy. Możliwe, że w chorobie Alzheimer AChE działa tak samo jak w okresie zarodkowym – uruchamia „neoembrionalny” program odnowy (56).

AChE a hematopoeza. W komórkach progenitorowych krwi ekspresja AChE rośnie podczas ustalania ich „toru rozwojowego”. Okazuje się ponadto, że nasilenie syntezy AChE idzie w parze ze wzmożoną produkcją płytek krwi, natomiast zahamowanie syntezy AChE antysensem prowadzi do przejściowego zmniejszenia populacji megakariocytów. Na podstawie powyższych obserwacji uważa się, że AChE jest niezbędna w procesie powstawania i różnicowania komórek progenitorowych krwi oraz, że – być może – czynniki hematopoetyczne (erytropoetyna i trombopoetyna) stymulują ekspresję AChE (23).

Istotnym czynnikiem stymulującym hematopoezę i ekspresję AChE w komórkach progenitorowych krwi jest stres. Syntetyzowany podczas stresu wariant AChE, to AChE-R. Wykazano, że funkcja hematopoetyczna AChE-R związana jest z odszczepialnym 26-amino-kwasowym peptydem (Acetylcholinesterase-R peptide – ARP) zlokalizowanym na C- końcu łańcucha AChE. Obecność tego peptydu pobudza proliferację komórek progenitorowych krwi i wydłuża czas ich życia w kulturze. Zdaniem autorów (57) wzmożona synteza białka AChE-R z w komórkach progenitorowych krwi w warunkach stresu sugeruje, że transkrypt ten jest szybko-reagującym i długotrwałym regulatorem hematopoezy w specyficznych warunkach fizjologicznych.

PAS A NIEENZYMATYCZNE FUNKCJE AChE

Większość zebranych dowodów doświadczalnych wskazuje, że nieenzymatyczne funkcje AChE związane są z PAS. Zablockowanie AChE propidium, związkiem wiążącym się z PAS, osłabia adhezję komórek PC12 do podłoża, natomiast dodanie liganda wiążącego się z centrum aktywnym, np. fizostygminy lub efedronium, nie ma wpływu. Oznacza to, że adhezyjne właściwości AChE są związane



z PAS. Zablockowanie PAS pozbawia AChE również właściwości neurytogennych (38). Kluczowe znaczenie PAS dla neurytogennej roli AChE potwierdzono (36) w badaniach na dopaminergicznym neuronach ślimaka *Aplysia* (36), oraz na embrionalnych neuronach hipokampa (35).

Z PAS związana jest również zdolność AChE do aktywacji powstawania złogów amyloidu. Wykazano, że skutek ten nie zależy ani od rozmieszczenia podjednostek w enzymie, ani od stanu centrum katalitycznego. Nie występuje jednak po zablockowaniu PAS przez propidium lub po zastąpieniu AChE przez BuChE – enzymem hydrolizującym ACh lecz pozbawiony PAS (50).

Również neuromodulacyjna funkcja AChE wydaje się związana z PAS. AChE indukuje LTP nawet po zablockowaniu somanem, natomiast pozbawiona PAS BuChE nie indukuje LTP (18).

W chwili obecnej brak danych na temat znaczenia miejsca PAS w funkcji hematopoetycznej.

PAS A KATALITYCZNA FUNKCJA AChE

Jak już wspomniano, PAS uczestniczy również w kontroli funkcji katalitycznej AChE, a naturalnym endogennym ligandem PAS jest acetylocholina. Branduardi i wsp. (58) przypuszczają, że podstawowa rola jednej z reszt aminokwasowych PAS w rozkładzie ACh polega na zakotwiczeniu substratu w anionowym miejscu enzymu i nadaniu położenia ułatwiającego jego wniknięcie do miejsca katalitycznego. W ten sposób PAS ułatwiałby funkcję katalityczną AChE. Rzeczywiście, katalityczna aktywność AChE jest ułatwana, lecz tylko przy niskich stężeniach ACh (28). Wysokie stężenia ACh hamują aktywność katalityczną AChE (30). Taki charakter interakcji sugeruje wysoką efektywność rozkładu przy niskiej podaży substratu, co wydaje się niekorzystne z fizjologicznego punktu widzenia. Jednak ACh uwalniana jest z pęcherzyków synaptycznych porcjami, dzięki czemu nawet przy generalnie niskiej podaży chwilowe lokalne stężenia mogą być wystarczająco wysokie do unieczynnienia AChE. Zdaniem niektórych badaczy może to mieć korzystny wpływ na przekąźnictwo synaptyczne (27). Nie sposób jednak nie zauważyć, że hamowanie AChE jest najbardziej prawdopodobne w warunkach nadmiernej podaży ACh, tzn. w sytuacji, w której pożądanym byłby wzrost aktywności katalitycznej AChE.

PESTYCYDY FOSFOROORGANICZNE A NIEKATALITYCZNE FUNKCJE AChE

We wspomnianych powyżej badaniach podanie bloków centrum aktywnego, w tym również fosforoorganicznych inhibitorów AChE (soman, DFP), nie miało

wpływu na związane z PAS morfogenetyczne/adhezyjne czy neuromodulacyjne właściwości AChE, ani też jej zdolność do stymulacji powstawania złogów amyloidu. Oznacza to, że zablockowanie centrum katalitycznego nie wpływa na funkcje niekatalityczne AChE. Jednak wnioski ten jest słuszny tylko w odniesieniu do relacji międzycząsteczkowych. Okazuje się bowiem, że jednym z efektów narażenia może być, i zapewne w większości przypadków jest, zwiększenie poziomu produkcji białka AChE, co musi oznaczać, że związane z nim funkcje będą nasilone lub ułatwione.

Ponad dziesięć lat temu Chiappa i wsp. (59) zaobserwowali, że po czterech tygodniach traktowania szczurów chlorpyrifosem aktywność enzymatyczna mózgowej AChE była obniżona o ponad 80%, lecz ilość białka AChE wzrosła o ponad 50%. Wcześniej podobne obserwacje poczynili również inni autorzy (60,61), jednak dopiero obserwacje Chiappy i wsp. dostarczyły mocnych dowodów potwierdzających stymulację produkcji AChE przez PFO. W kilka lat później Kaufer i wsp. (8,62) stwierdzili wzmożoną ekspresję c-Fos i AChE mRNA w skrawkach hipokampa myszy, potraktowanych różnymi inhibitorami AChE (ZFO lub karbaminiany). Identyczne efekty autorzy zaobserwowali *in vivo* po dootrzewnowym podaniu inhibitorów AChE a także po zastosowaniu stresora niechemicznego (wymuszone pływanie) z tym, że efektywność stresora niechemicznego była znacznie mniejsza niż efektywność inhibitorów AChE.

Według Kaufer i wsp. (8,62) sygnałem uruchamiającym kaskadę zdarzeń prowadzących do nadprodukcji AChE jest nadczynność receptorów cholinergicznym, spowodowana przejściowym nadmiarem neurotransmitera. Pośredniczy w tym procesie wapń, wnikający do komórki podczas pobudzenia. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia uruchamia maszynię genetyczną, prowadząc do wzmożonej produkcji AChE, zablockowania syntezy ChAT i transportera pęcherzykowego ACh (62). Według Nitscha i wsp. (63) aktywność receptorów muskarynowych zwiększa ekspresję genu *Egr-1*, którego białkowy produkt stymuluje ekspresję genu *ACHE* i produkcję AChE mRNA. Oba powyższych propozycji nie potwierdzają obserwacje Donga i wsp. (39). W doświadczeniach na kulturach embrionalnych neuronów hipokampa autorzy ci uzyskali rezultaty, z których wynika, że czynnikiem uruchamiającym wzmożoną produkcję AChE jest zablockowanie PAS. W doświadczeniach tych PAS blokowano egzogennym ligandem (BW284c51). Warto jednak przypomnieć, że naturalnym endogennym ligandem PAS jest ACh. Możli-



liwe, że w sytuacji nadmiaru ACh, która mogła mieć miejsce zarówno w doświadczeniach Kaufer i wsp. (8, 62) jak i Nitscha i wsp. (63), związaną z ACh jest wystarczająco długotrwałe by uruchomić proces prowadzący do wzmożonej syntezy AChE.

W kontroli poziomu ekspresji genu *ACHE* uczestniczą również glikokortykoidy. Wzrost aktywności układu cholinergicznego idzie w parze z aktywacją osi HPA i zwiększeniem poziomu glikokortykoidów. Gen *ACHE* zawiera fragment wiążący receptor glikokortykoidowy (glucocorticoid receptor element – GRE) (64). Dodanie kortykosteronu do medium nasila ekspresję AChE w komórkach PC12 (65). Identyczny efekt wywołuje kortyzol w komórkach progenitorowych krwi (66). Warunki, w jakich stwierdzono powyższe efekty wykluczają udział receptorów cholinergicznym. Otrzymane rezultaty można traktować jako dowody istotnego udziału glikokortykoidów w kontroli transkrypcji genu *ACHE* i ekspresji AChE mRNA.

NASTĘPSTWA WZMOŻONEJ EKSPRESJI AChE

Z zebranych powyżej informacji wynika, że stan, w jakim znajduje się organizm – przynajmniej przez pewien czas – po narażeniu na PFO charakteryzuje się upośledzeniem procesów zależnych od funkcji katalitycznej AChE i nasileniem procesów związanych z funkcjami niekatalitycznymi wskutek nadprodukcji białka AChE. Z upośledzeniem funkcji katalitycznej niewątpliwie są związane ostre zaburzenia przekaźnictwa przez synapsy cholinergiczne, manifestujące się znanym zespołem objawów: nikotynowych, muskarynowych i ośrodkowych. Możliwe zdrowotne skutki nadprodukcji AChE w chwili obecnej są jedynie przedmiotem spekulacji.

Warianty AChE, które mogą powstawać w wyniku posttranskrypcyjnej obróbki pierwotnego transkryptu AChE mRNA, nie są równoważne pod względem funkcjonalnym (11). W badaniach, w których wykryto istotny wzrost ilości białka AChE po narażeniu na chlorpyrifos (59), nie próbowano ustalić jakiego wariantu wzrost ten dotyczy. Z badań Kaufer i wsp. (8,62), a także innych autorów (65,67), wynika, że zarówno w przypadku inhibitorów AChE, jak też stresorów fizycznych, narażenie skutkuje zwiększeniem poziomu syntezy monomerycznego, rozpuszczalnego wariantu AChE-R. Ilość AChE-R po stresie wzrasta w ciągu kilku minut i pozostaje podwyższona przez wiele tygodni (65). Oznacza to, że skutki nadprodukcji AChE po narażeniu są określane przez właściwości i fizjologiczne znaczenie AChE-R.

Skutki narażenia na PFO w okresie rozwoju układu nerwowego. Generalnie, wyniki badań wskazują na istotne znaczenie obu wariantów (AChE-S i AChE-R) w procesie rozwoju układu nerwowego (40). Oznacza to, że działające w tym okresie czynniki, zdolne oddziaływać na poziom AChE, mogą wpływać na rozwój mózgu a tym samym określać jego stan czynnościowy w późniejszych okresach życia. Z rezultatów przedstawionych niedawno przez Aluigi i wsp. (68) wynika, że wystawienie rozwijającego się zarodka kury na PFO skutkuje zwiększoną ekspresją AChE. Jest to prawdopodobnie AChE-R jako, że ta właśnie forma dominuje w okresie rozwoju embrionalnego (11). U szczura zablokowanie syntezy AChE-R w tym okresie nasila proliferację komórek progenitorowych (40), z czego należałoby wnosić, że bezpośrednio lub pośrednio AChE-R hamuje proliferację. Narażenie na PFO wpływa szkodliwie na rozwój embrionalny. Przejawia się to, m.in., zmniejszeniem ilości DNA (ref. w 69), co sugeruje zahamowanie proliferacji. W chwili obecnej brak jednak bezpośrednich dowodów na to, że ten efekt lub inne szkodliwe następstwa narażenia na PFO w okresie rozwoju embrionalnego są wynikiem nadmiaru AChE.

AChE a PTSD. Zdaniem Kaufer i wsp. (8,62), a także innych autorów (26) wzmożona ekspresja AChE-R (po urazie lub zatruciu ZFO) początkowo działa ochronnie; przywraca równowagę w układzie cholinergicznym dzięki szybkiemu usuwaniu nadmiaru ACh. Gdy jednak utrzymuje się przez dłuższy czas, wówczas sprzyja rozwojowi różnych patologii czynnościowych.

Przypuszcza się, że postresowa nadprodukcja AChE-R jest co najmniej współodpowiedzialna za rozwój stanu określanego mianem zespołu stresu pourazowego (Post-Traumatic Stress Disorder – PTSD). PTSD charakteryzuje się m.in. wysokim poziomem lęku oraz uporczywym wyłanianiem się z pamięci żywych wspomnień doznanych urazów. Zaburzenia te przypisywane są zmianom czynnościowym (sensytyzacji) w układzie limbicznym (70). W kilku badaniach na zwierzętach doświadczalnych (myszach) potwierdzono, że wystawienie na działanie silnego stresora podwyższa długotrwałe poziom lęku i ułatwia nabywanie warunkowych reakcji obronnych. Wykazano, że stan ten idzie w parze ze wzrostem pobudliwości hipokampa oraz ułatwieniem rozwoju LTP w tym obszarze (65,67,71). Efekty te można było zablokować podaniem antysensu AChE-R mRNA lub je wywołać podając bezpośrednio do hipokampa C-terminalny peptyd AChE-R (67). Obserwacje te wskazują na możliwość związku przyczynowego pomiędzy nadprodukcją AChE-R a nasileniem reak-



cji lękowej i wzrostem pobudliwości hipokampa oraz prawdopodobnie innych obszarów limbicznych, otrzymujących projekcję cholinergiczną. Potwierdzają tym samym przypuszczenie o istotnym znaczeniu postresowej nadprodukcji AChE w rozwoju PTSD.

W cytowanych wyżej badaniach narażenie na stresor fizyczny (np. wymuszone pływanie lub unieruchomienie) lub inhibitor AChE (DFP lub fizostygmina) miało zwykle charakter ostry. Wspomniane wcześniej obserwacje Chiappy i wsp. (59) sugerują, że nasilona produkcja AChE może zachodzić również w warunkach powtarzanego, niskopoziomowego narażenia na PFO znajdujące się w powszechnym użyciu. O możliwych behawioralnych skutkach długotrwałej nadprodukcji AChE-R można wnioskować na podstawie badań na zwierzętach transgenicznym (72). Zachowanie zwierząt z nadprodukcją AChE-R wykazuje szereg nieprawidłowości, które można zmniejszyć podając inhibitor AChE lub antysensowy nukleotyd blokujący ekspresję AChE-R mRNA (72). Charakter tych nieprawidłowości sugeruje upośledzenie zapamiętywania, zwłaszcza w relacjach socjalnych.

Zarówno u ludzi jak i zwierząt powtarzane, niskopoziomowe narażenie na PFO może skutkować zmianami w zachowaniu (4,73). Jeżeli przyczyną tych zmian jest nadprodukcja AChE-R, zablokowanie syntezy tego wariantu powinno zapobiegać ich wystąpieniu. Badania, które mogłyby wyjaśnić to zagadnienie nie zostały jednak dotychczas przeprowadzone.

AChE a choroby zwyrodnieniowe układu nerwowego. W niedawno opublikowanej pracy Greenfield i Vaux (10) przedstawili hipotezę, według której nadekspresja AChE, spowodowana jakimkolwiek urazem fizycznym lub chemicznym, może sprzyjać rozwojowi choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, a także innych chorób zwyrodnieniowych OUN. Zdaniem tych autorów AChE, zwłaszcza jej monomeryczna forma, jest czynnikiem stymulującym zmiany plastyczne (w tym neurytogenezę i synaptogenezę) poprzez wspomaganie wnikania jonów wapnia. Działanie to jest korzystne we wczesnej fazie rozwoju układu nerwowego, lecz może być uszkodzające w mózgu dojrzałym. W przypadku neuronów układów niespecyficznych, które zachowują zdolność do zmian rozrostowych do końca życia, nadmiar AChE skutkuje nadmiernym, wynaturzonym, rozrostem wypustek. W przypadku dojrzałych neuronów układów specyficznych (serial systems neurons), których zdolność do sekwestracji wapnia ulega – w toku dojrzewania i różnicowania – drastycznemu zmniejszeniu, zwiększenie stężenia wapnia wewnątrzkomórkowe-

go może uruchamiać mechanizm destrukcji komórki. Jak na razie istnieją doniesienia wskazujące na istnienie związku pomiędzy narażeniem na pestycydy fosforoorganiczne a chorobą Parkinsona (74). Dowodów na istnienie związku PFO z chorobą Alzheimera brak.

AChE a reaktywność na psychostymulanty. Bezpośrednie podanie AChE do części zbitej istoty czarnej może inicjować proces prowadzący do długotrwałego wzrostu reaktywności behawioralnej szczura na psychostymulant – amfetaminę (AMPH). Wzrost ten jest związany z ułatwionym uwalnianiem dopaminy (46, 47). Podobny skutek – nadwrażliwość behawioralną na AMPH – wywołuje jednorazowe lub wielokrotne obwodowe podanie AMPH (48) lub potraktowanie zwierzęcia stresem niechemicznym (75). Zarówno AMPH, jak też stresory niechemiczne powodują wzmożone uwalnianie AChE w istocie czarnej i zapewne w innych strukturach dopaminergicznych co – w świetle wspomnianych wyżej obserwacji – pozwala podejrzewać, że AChE może pośredniczyć w rozwoju indukowanej stresem nadwrażliwości behawioralnej na AMPH. W chwili obecnej w dostępnym piśmiennictwie brak danych na temat uwalniania i/lub syntezy AChE w strukturach dopaminergicznych po narażeniu na PFO. Wiadomo natomiast, z obserwacji dokonanych w naszym laboratorium, że nawet jednorazowe potraktowanie szczura PFO powoduje długotrwałą zmianę jego wrażliwości behawioralnej na AMPH. Jednak wzrost wrażliwości (lub większa podatność na uwrażliwienie psychostymulantem) następował tylko po niskich dawkach PFO. Po dawkach wysokich obserwowano spadek (76). Pozostaje zatem do ustalenia na ile powyższe efekty mogły być związane ze wzmożoną ekspresją AChE po narażeniu.

AChE-R a patofizjologia miastonii. U pacjentów z rozpoznaną miastenią (miastenia gravis) a także w zwierzęcych modelach miastonii (experimental autoimmune miastenia gravis) poziom AChE-R w osoczu jest nienormalnie wysoki. Podanie antysensowego oligonukleotydu, który selektywnie obniża poziom AChE-R, istotnie poprawia stan czynnościowy mięśni (oceniany na podstawie elektromiogramów), a także przeżywalność chorych zwierząt (77). W mięśniach myszy transgenicznym z nadekspresją AChE-R, a także myszy normalnych, którym podano DFP, stwierdza się nieprawidłowy, nadmierny rozrost neurytów, proliferację złączy nerwowo-mięśniowych i zwyrodniałe włókna mięśniowe. Zmianom tym można było zapobiec poprzez zahamowanie syntezy AChE-R (78,79). Powyższe obserwacje sugerują, że wysoki poziom AChE-R może promować rozwój upośledzeń czynno-



ściowych w mięśniach szkieletowych być może wskutek indukcji zmian morfologicznych w złączach nerwowo-mięśniowych.

AChE-R i hematopoeza. Istnieje sporo danych z których wynika, że AChE-R, a dokładniej odszczepialny peptyd C-końca (ARP), jest istotnym elementem hematologicznej reakcji stresowej. AChE-R pobudza proliferację i różnicowanie komórek progenitorowych krwi (57,66).

UWAGI KOŃCOWE

Nie ma obecnie wątpliwości co do tego, że oprócz funkcji enzymatycznej – katalizowania hydrolitycznego rozkładu acetylocholiny – AChE pełni również funkcje nieenzymatyczne i fakt ten winien być uwzględniany szerzej niż dotychczas w opracowaniach dotyczących PFO. Z przedstawionych powyżej informacji wynika, że narażenie na PFO może wpływać nie tylko na katalityczne właściwości AChE, lecz również na funkcje katalityczne tego białka. Wpływ ten nie polega jednakże na modyfikacji struktury AChE, uniemożliwiającej hydrolizę ACh lecz na pobudzeniu syntezy AChE. Dzięki temu może rozwijać się stan charakteryzujący się upośledzeniem funkcji katalitycznej AChE (związanie PFO z centrum katalitycznym jest trwałe) lecz nasileniem funkcji niekatalitycznej (wskutek zwiększenia ilości białka AChE). Skutki upośledzenia funkcji katalitycznej (przynajmniej ostre) są znane od dawna. Skutki spowodowanej narażeniem na PFO (lub innym stresorem) nadprodukcji białka AChE są dopiero poznawane. W zestawieniu z całkiem sporą liczbą doniesień dokumentujących fakt stymulacji syntezy AChE przez narażenie na PFO (i inne stresory), liczba opublikowanych raportów z badań poświęconych ustaleniu związku pomiędzy wzmożoną syntezą AChE i innymi skutkami narażenia, zwłaszcza behawioralnymi, jest bardzo mała i zakres zdobytej dotychczas wiedzy niewielki. Należy oczekiwać, że przyszłe badania znacznie ten zakres rozszerzą. Kilka obszarów zasługuje na szczególną uwagę.

Po pierwsze, pożądane byłoby poszerzenie wiedzy na temat szkodliwości okołoporodowego narażenia na PFO, a zwłaszcza ustalenie, czy istnieje korelacja pomiędzy powodowaną narażeniem zmianą tempa syntezy AChE, a morfologicznymi i czynnościowymi następstwami takiego narażenia. Morfogenne działanie AChE każe podejrzewać, że szkodliwość czynników wpływających na poziom syntezy tego białka będzie zaznaczała się szczególnie we wczesnych fazach rozwojowych organizmu. Mając to na uwadze, niektórzy badacze postu-

lują, aby każdy PFO traktować jako potencjalny teratogen tak długo dopóki brak teratogenności nie zostanie udowodniony i potwierdzony wynikami odpowiednich badań (33,37).

Po drugie, należałoby uzyskać niebudzące wątpliwości potwierdzenie stymulującego wpływu narażenia na PFO, zwłaszcza powtarzanego narażenia na niskie dawki modelującego narażenie zawodowe i środowiskowe, na poziom syntezy AChE. Na konieczność takich badań zwracała uwagę w roku 1999 Kaufer i wsp. (8,62). Do chwili obecnej nie zostały one jednak przeprowadzone.

Po trzecie, konieczne jest zbadanie zależności pomiędzy behawioralnymi skutkami narażenia na PFO a stężeniem AChE w wybranych obszarach mózgu po narażeniu. Szczególną uwagę należałoby zwrócić na wrażliwość na psychostymulanty i podatność na uwrażliwienie psychostymulantem. Długotrwałe zmiany wrażliwości behawioralnej na amfetaminę po iniekcji AChE do struktur dopaminergicznych z jednej strony i zwiększenie syntezy AChE po narażeniu na PFO z drugiej sugerują, że narażenie takie może skutkować zmianą wrażliwości na psychostymulanty i tym samym określać podatność organizmu na uzależnienie.

Po czwarte, za sprawę niezwykle ważną należy uznać ustalenie czy i w jaki sposób narażenie PFO wpływa na proces neurogenezy oraz czy wpływ ten jest konsekwencją zmiany poziomu syntezy AChE. Wiadomo, że w pewnych obszarach mózgu komórki nerwowe powstają nawet w późnym okresie życia, aktywność fizyczna i umysłowa pobudza natomiast stres hamuje tę późną neurogenezę (41,42, 80,81). PFO, a także inne inhibitory AChE, są bardzo skutecznymi stresorami. Pozwala to podejrzewać, że narażenie na PFO tłumi neurogenezę oraz, że egzekutorem tego efektu może być AChE. Należy podkreślić, że zahamowanie neurogenezy w hipokampie postrzegane jest ostatnio jako przyczyna rozwoju stanów depresyjnych, tj. stanów, które stanowią również część symptomatologii OPICN (82).

Po piąte wreszcie, podobieństwo skutków PFO i stresorów fizycznych oraz mechanizmów ich powstawania (26,62) stwarza ogromne możliwości interakcji. Szczególnie interesujące są sytuacje, w których narażenie na stresor fizyczny (lub psychiczny) poprzedza narażenie na PFO i odwrotnie. Długotrwały charakter indukowanych stresorem zmian sugeruje, że skutki narażenia na PFO następującego po upływie wielu dni czy tygodni od wystawienia na działania stresora fizycznego czy psychicznego, mogą się różnić od przewidywanych. Potwierdzają to wyniki badań rozpoczętych niedawno w naszym laboratorium. Dowodzą one, że awersywne doznania



mogą istotnie wpływać na behawioralne i biochemiczne skutki PFO podanego kilka tygodni później (83). Byłoby wskazane ustalić, czy i w jakim stopniu efekty tego rodzaju – które zapewne są powszechne w życiu codziennym – są związane ze zmianami stężenia AChE.

Jak widać z powyższego, dostrzeżenie w PFO nie tylko „inhibitorów AChE”, lecz również potencjalnych induktorów syntezy AChE, zaś w AChE nie tylko destruktora acetylocholiny, lecz również aktywnego uczestnika procesów morfogenetycznych i neuromodulatora otwiera nowe i interesujące perspektywy badawcze.

PODZIĘKOWANIA

Autor serdecznie dziękuje Pani Docent Jolancie Groma-
dzińskiej i Panu Profesorowi Janowi Stetkiewiczowi za
przeczytanie manuskryptu i krytyczne uwagi.

PIŚMIENNICTWO

- Walker B., Nidiry J.: Current concepts: Organophosphate toxicity. *Inhalation Toxicol.*, 2002;14:975–990
- Ecobichon D.J.: Pesticide use in developing countries. *Toxicology*, 2001;160:27–33
- Feldman R.G.: Organophosphorus compounds. W: Feldman R.G. [red.]. *Occupational and Environmental Neurotoxicology*. Lippincott-Raven, Philadelphia – New York, 1999, ss. 421–441
- Abou-Donia M.B.: Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Arch. Environ. Health*, 2003;58:484–497
- Senanayake N., Karalliedde L.: Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 1987;316:761–763
- John M., Oommen A., Zachariah A.: Muscle injury in organophosphorous poisoning and its role in the development of intermediate syndrome. *Neurotoxicology*, 2003;24:43–53
- Kaufer D., Soreq H.: Tracking cholinergic pathways from psychological and chemical stressors to variable neurodeterioration paradigms. *Curr. Opin. Neurol.*, 1999;12:739–743
- Kaufer D., Friedman A., Seidman S., Soreq H.: Anticholinesterases induce multigenic transcriptional feedback response suppressing cholinergic transmission. *Chem. Biol. Interact.*, 1999;119–120:349–360
- Mesulam M.M., Geula C.: Acetylcholinesterase-rich neurons of the human cerebral cortex: cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distribution. *J. Comp. Neurol.*, 1991;306:193–220
- Greenfield S., Vaux D.J.: Commentary: Parkinson's disease, Alzheimer's disease and motor neurone disease: identifying a common mechanism. *Neuroscience*, 2002;113:485–492
- Grisaru D., Sternfeld M., Amiram E., Glick D., Soreq H.: Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.*, 1999;264:672–686
- Greenfield S.: Critique: Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 1996;28:485–490
- Soreq H., Seidman S.: Acetylcholinesterase: New roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001;2:294–302
- Silman I., Sussman J.L.: Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2005;5(3):293–302
- Munoz F.J., Aldunate R., Inestrosa N.C.: Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase. *Neuroreport*, 1999;10:3621–3625
- Chacon M.A., Reyes A.E., Inestrosa N.C.: Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *J. Neurochem.*, 2003;87:195–208
- Gralewicz S.: Possible consequences of AChE inhibition in organophosphate poisoning. A new approach to an old problem. *Med. Pr.*, 1997;48(4):469–472
- Appleyard M.E.: Acetylcholinesterase induces long-term potentiation in CA1 pyramidal cells by a mechanism dependent on metabotropic glutamate receptors. *Neurosci. Lett.*, 1995;190:25–28
- Small D.H., Michaelson S., Sberna G.: Non-classical actions of cholinesterases: Role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 1996;28:453–486
- Massoulie J.: The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 2002; 11:130–143
- Massoulie J., Bon S., Perrier N., Falasca C.: The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem. Biol. Interact.*, 2005;157–158:3–14
- Massoulie J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N. i wsp.: Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J. Physiology (Paris)*, 1998;92:183–190
- Pick M., Flores-Flores C., Soreq H.: From brain to blood: Alternative splicing evidence for the cholinergic basis of the mammalian stress response. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004;1018:85–98
- Sussman J.L., Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldman A., Toker L., i wsp.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991;253(5022):872–879
- Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Segall Y., i wsp.: Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J. Biol. Chem.*, 1993;268:17083–17095
- Szegletes T., Mallender W.D., Thomas P.J., Rosenberry T.L.: Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry*, 1999; 38:122–133
- Radic Z., Reiner E., Taylor P.: Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol. Pharmacol.*, 1991;39:98–104
- Marcel V., Gagnoux-Palacios L., Pertuy C., Masson P., Fournier D.: Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochem. J.*, 1998;329:329–334
- Shafferman A., Velan B., Ordentlich A., Kronman C., Grosfeld H., Leitner M. i wsp.: Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J.*, 1992;11:3561–3568



30. Stojan J., Brochier L., Alies C., Colletier J.P., Fournier I.: Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentration of the substrate. *Eur. J. Biochem.*, 2004; 271:1364–1371
31. Marchot P.: The fasciculin-acetylcholinesterase interaction. *J. Soc. Biol.*, 1999; 193:505–508
32. Marchot P., Khelif A., Ji Y.H., Mansuelle P., Bougis P.E.: Binding of 125I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase. The complex still binds diisopropyl fluorophosphate. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268:12458–12467
33. Brimijoin S., Koenigsberger C.: Cholinesterases in neural development: new findings and toxicological implications. *Environ. Health Perspectives*, 1999; 107(Suppl.1):59–69
34. Olivera S., Rodriguez-Ithurralde D., Henleya J.M.: Acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation, and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2003; 23:96–106
35. Day T., Greenfield S.: A noncholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones *in vitro*: molecular mechanisms. *Neuroscience*, 2002; 111:649–656
36. Srivatsan M., Peretz B.: Acetylcholinesterase promotes regeneration of neurites in cultured adult neurons of aplysia. *Neuroscience*, 1997; 77:921–931
37. Bigbee J.W., Sharma K.V., Gupta J.J., Dupree J.L.: Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ. Health Perspectives*, 1999; 107(Supl. 1):81–87
38. Johnson G., Moore S.W.: The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1999; 258:758–762
39. Dong H., Xiang Y.Y., Farchi N., Ju W., Wu Y., Chen L., i wsp.: Excessive expression of acetylcholinesterase impairs glutamatergic synaptogenesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 2004; 24:8950–8960
40. Dori A., Cohen J., Silverman W.F., Pollack Y., Soreq H.: Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cerebral Cortex*, 2005; 15:420–430
41. Altman J., Bayer S.A.: Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal period. *J. Comp. Neurol.*, 1990; 301:365–381
42. Gould E., McEwen B.S., Tanapat P., Galea I.A.M., Fuchs E.: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.*, 1997; 17:2492–2498
43. Harman A., Meyer P., Ahmat A.: Neurogenesis in the hippocampus of an adult marsupial. *Brain Behav. Evol.*, 2003; 62:1–12
44. Holmes C., Jones S.A., Budd T.C., Greenfield S.A.: Non-cholinergic, trophic action of recombinant acetylcholinesterase on mid-brain dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.*, 1997; 49:207–18
45. Appleyard M.E., Vercher J., Greenfield S.A.: Release of acetylcholinesterase from the guinea-pig cerebellum *in vivo*. *Neuroscience*, 1988; 25:133–138
46. Heiland B., Greenfield S.A.: Rat locomotion and release of acetylcholinesterase. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1999; 62:81–7
47. Hawkins C.A., Greenfield S.A.: Non-cholinergic action of exogenous acetylcholinesterase in the rat substantia nigra. II. Long-term interactions with dopamine metabolism. *Behav. Brain Res.*, 1992; 48:159–63
48. Vanderschuren L.J., Kalivas P.W.: Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000; 151:99–120
49. Dally J.J., Schaefer M., Greenfield S.A.: The spontaneous release of acetylcholinesterase in rat substantia nigra is altered by local changes in extracellular levels of dopamine. *Neurochem. Int.*, 1996; 29:629–35
50. Talesa V.N.: Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.*, 2001; 122:1961–1969
51. Fishman E.B., Siek G.C., MacCallum R.D., Bird E.D., Volicer L., Marquis J.K.: Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.*, 1986; 19:246–252
52. Geula C., Mesulam M.: Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 1989; 498:185–189
53. Inestrosa N.C., Alvarez A., Perez C.A., Moreno R.D., Vicente M., Linker C. i wsp.: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 1996; 16:881–891
54. Carafoli E.: The ambivalent nature of the calcium signal. *J. Endocrinol. Invest.*, 2004; 27:134–136
55. Arendt T.: Alzheimer's disease as disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience*, 2001; 102:723–765
56. Laver P.G.: Nonclassical roles of cholinesterases in the embryonic brain and possible links to Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 1995; 9:29–36
57. Deutch V.R., Pick M., Perry Ch., Grisaru D., Hemo Y., Golan-Hadari D. i wsp.: The stress associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34⁺ hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Experim. Hematology*, 2002; 30:1153–1164
58. Branduardi D., Gervasio F.L., Cavalli A., Recanatini M., Parinello M.: The role of the peripheral anionic site and cation- π interactions in the ligand penetration of the human AChE gorge. *Am. Chem. Soc.*, 2005; 127:9147–9155
59. Chiappa S., Padilla S., Koenigsberger C., Moser V., Brimijoin S.: Slow accumulation of acetylcholinesterase in rat brain during enzyme inhibition by repeated dosing with chlorpyrifos. *Biochem. Pharmacol.*, 1995; 49:955–963
60. Wilson B.W., Nieberg P.S.: Recovery of acetylcholinesterase forms in quail muscle cultures after intoxication with diisopropylfluorophosphate. *Biochem. Pharmacol.*, 1983; 32:911–918
61. Cisson C.M., Wilson B.W.: Recovery of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle treated with paraoxon. *Biochem. Pharmacol.*, 1977; 26:1955–1960
62. Kaufer D., Friedman A., Seidman S., Soreq H.: Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression, *Nature*, 1998; 393:373–377



63. Nitch R.M., Rossner S., Albrecht C., Mayhaus M., Enderich J., Schliebs R. i wsp.: Muscarinic acetylcholine receptors activate the acetylcholinesterase gene promoter. *J. Physiol. (Paris)*, 1998;92:257–264
64. Shapira M., Tur-Kaspa I., Bosgraaf L., Livni N., Grant A.D., Grisaru D. i wsp.: A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. *Hum. Mol. Genet.*, 2000;9:1273–1281
65. Meshorer E., Toiber D., Zurel D., Sahly I., Amir Dori A., Cagnano E. i wsp.: Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *J. Biol. Chem.*, 2004;279:29740–29751
66. Grisaru D., Deutsch V., Shapira M., Pick M., Sternfeld M., Melamed-Book N. i wsp.: ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant has hematopoietic growth promoting activities. *Mol. Med.*, 2001;7:93–105
67. Nijholt I., Farchi N., Kye M., Sklan E.H., Shoham S., Verbeure B. i wsp.: Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Mol. Psychiatry*, 2004;9:174–183
68. Aluigi M.G., Angelini C., Falugi C., Fossa R., Genever P., Gallus L. i wsp.: Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem. Biol. Interact.*, 2005;157–158:305–316
69. Slotkin T.A.: Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: A personal view from an academic perspective. *Neurotoxicology*, 2004;25:631–640
70. Zdankiewicz-Ścigała E., Przybylska M.: Trauma: Proces i Diagnoza. W: Jurkowlaniec Z. [red.], Mechanizmy psychoneurofizjologiczne. Wydawnictwo Instytutu Psychologii PAN, Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej, Warszawa 2002
71. Birikh K., Sklan E., Shoham S., Soreq H.: Interaction of "Readthrough" acetylcholinesterase with RACK1 PKC β II correlates with intensified fear induced conflict behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003;100:283–288
72. Cohen O., Erb C., Ginzberg D., Pollak Y., Seidman S., Shoham S. i wsp.: Neuronal overexpression of "readthrough" acetylcholinesterase is associated with antisense-suppressible behavioral impairments. *Mol. Psychiatry*, 2002;7:874–885
73. Ray D.E., Richards P.G.: The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol. Lett.*, 2001;120:343–351
74. Kamel F., Hoppion J.: Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ. Health. Perspect.*, 2004;112:950–958
75. Antelman S.M., Eichler A.J., Black C.A., Kocan D.: Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science* 1980;207:329–331
76. Gralewicz S., Lutz P., Tomas T.: Behavioural responsiveness to amphetamine or scopolamine following repeated exposure to chlorphenirphos in rats. *Act Neurobiol. Exp. (Wars)*, 2002;62:75–83
77. Brenner T., Hamra-Amitay Y., Evron T., Boneva N., Seidman S., Soreq H.: The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis. *FASEB J.*, 2003;17:214–222
78. Farchi N., Soreq H., Hochner B.: Chronic acetylcholinesterase overexpression induces multilevelled aberrations in mouse neuromuscular physiology. *J. Physiol.*, 2003;546:165–173
79. Lev-Lehman E., Evron T., Broide R.S., Meshorer E., Ariel I., Seidman S. i wsp.: Synaptogenesis and myopathy under acetylcholinesterase overexpression. *J. Mol. Neurosci.*, 2000;14:93–105
80. van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 2002;415:1030–1034
81. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A. i wsp.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*, 1998;4:1313–1317
82. Kempermann G., Kronenberg G.: Depressed new neurons-adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol. Psychiatry*, 2003; 54:499–503
83. Gralewicz S., Lutz P., Kur B.: Pretreatment with footshock alters some effects of subsequent organophosphate exposure. *Neurotoxicology*, 2005;26:159–171

