

577.153.9:616-07

AKTIVITA CHOLINESTERÁZ A JEJÍ OVLIVNĚNÍ

Plk. doc. MUDr. Jiří BAJGAR, DrSc.
Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové
(rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

Cholinesterázy patří do skupiny hydroláz, které katalyzují rozklad cholinových esterů na cholin a příslušnou kyselinu. Lze je rozdělit na acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE), které se liší enzymatickými vlastnostmi a fyziologickou funkcí. Rozdíly mezi těmito dvěma enzymy byly demonstrovány v dřívějších sděleních (Koelle, 1963; Bajgar, 1985).

Aktivita cholinesteráz v krvi má zásadní význam pro stanovení diagnózy při otravě inhibitory cholinesteráz, mezi něž patří organofosfáty (OF) a karbamáty (Abou-Donia, 1985; Bajgar, 1985; Bruijn, 1976; Golikov a Rozengart, 1964; Koelle, 1963; Michajlov a Ščerbak, 1983).

Inhibičních studií týkajících se ovlivnění jak AChE, tak BuChE různými látkami in vitro i in vivo je v literatuře popsána celá řada. Jedná se zejména o inhibiční účinek OF a karbamátů (Koelle, 1963; Patočka, 1971; Patočka a Bajgar, 1971; Aldridge, 1969; Abou-Donia, 1985). Řada prací se zabývá reaktivacím účinkem oximů na cholinesterázy inhibované OF (Patočka, 1972 a, b; Sipri, 1976; Patočka a Bielavský, 1972 a, b; Patočka a Bajgar, 1987; Ellin, 1982) nebo účinek jiných typů inhibitorů na tyto enzymy (Heilbron, 1961; Patočka, 1988, 1989; Patočka a spol., 1976 a, b). Ovlivnění aktivity cholinesteráz OF typy inhibitorů je tedy demonstrováno v literatuře ve značné míře, a proto tedy těmto faktorům není v práci věnována větší pozornost. Kromě toho však aktivita cholinesteráz podléhá různým vlivům a její stanovení může být použito pro určení či upřesnění diagnózy i jiných stavů než zmíněné intoxikace (Bajgar, 1985; Brown a spol., 1981; Masopust, 1983; Whittaker, 1980).

Aktivita obou enzymů (AChE i BuChE) je ovlivněna pohlavím - u žen je aktivita AChE i BuChE nižší než u mužů (Bajgar, 1985; Sidell a Kaminskis, 1975; Whittaker, 1980), věkem - do dospělosti aktivita obou enzymů stoupá a po pátém deceniu klesá (Ravazzolo a spol., 1981),

výživou - u nízkoeenergetické diety je aktivita snižena asi o 1/3 (Ryhanen, 1983; Whittaker, 1980) a geneticky (Brown a spol., 1981; Shinohara a Tanaka, 1979). Obě aktivity nejsou jednotné a mají své výkyvy. Je možné říci, že kolísání aktivity AChE v erytrocytech nepodléhá takové variabilitě jako plazmová BuChE. Vzhledem k individuální normě aktivita v průběhu roku kolísá ± 8 až ± 12 % pro AChE a ± 25 % pro BuChE (Bajgar, 1985; Sidell a Kaminskis, 1975).

V klinické biochemii se v současné době více používá stanovení aktivity BuChE v séru nebo plazmě. Snižování indikuje pokles syntézy enzymu nebo pokles počtu produkujících buněk. Stanovení je vhodné pro sledování chronického poškození jater nebo rozsahu akutního difúzního poškození (Brown a spol., 1981; Kutty, 1980; Masopust, 1983; Whittaker, 1980). Aktivita BuChE je dále snižována u neoplazií jater (Kutty, 1980; Masopust, 1983) i při akutním poškození jater organickými rozpouštědly či houbami (Masopust, 1983).

Také při popáleninách, diabetu a proteinurii může být aktivita BuChE snížena (Whittaker, 1980). Zvláštním případem snížení je hereditární nedostatek BuChE nebo přítomnost její atypické varianty: aktivita BuChE je totiž určována čtyřmi alelickými geny - normální E^1 , atypický či dibucain-rezistentní E^a , fluorid-rezistentní E^f a tzv. němý (silent) gen - E^s . Jejich kombinací vznikne deset genotypů, které všechny byly v různém zastoupení zjištěny v lidské populaci (Eckerson a spol., 1983; Owen a Hunter, 1983). Podle těchto kombinací je výsledná aktivita BuChE normální, více či méně snižovaná nebo dokonce nulová, což se za normálního života nemusí manifestovat. Jestliže je však jedinec se sníženou či nulovou aktivitou BuChE podán léčivo, které je tímto enzymem rozkládáno (sukcinylcholin, lokální anestetika s esterovou vazbou), není část léčiva rozložena a dochází k rela-

tivnímu předávkování (Owen a Hunter, 1983; Viby-Mogensen a Hanel, 1978; Whittaker, 1980).

Aktivita BuChE je ovlivněna i radioaktivním zářením, stresem, graviditou, některými neurologickými a psychiatrickými onemocněními, hormonálním působením, zejména v graviditě, a celou řadou léčiv (Bajgar, 1985; Brown a spol., 1981; Ryhanen, 1983; Skopec a spol., 1981).

Zvýšení aktivity BuChE není tak časté a může se vyskytnout hlavně v počáteční fázi intoxikací organickými rozpouštědly včetně alkoholu (je tedy indikována zvýšená syntéza) a u některých vzácnějších onemocnění (Masopust, 1983; Yoshida a Motulski, 1969; Whittaker, 1980). Někdy je popisováno zvýšení aktivity BuChE u duševních onemocnění, zejména ve vztahu k fluorid-rezistentnímu genu E^F_1 (např. u schizofrenie) (Bajgar a Patočka, 1986; Whittaker, 1980). Také při kardiovaskulárních onemocněních má BuChE svůj význam - udává se, že vzrůstem indexu BuChE/LDL-cholesterol se zvyšuje riziko onemocnění (Kutty a spol., 1980; Navrátil a Bajgar, 1987).

U stanovení aktivity AChE praktické využití nedosáhlo takového stupně jako u BuChE. Snížení aktivity erytrocytární AChE je častým jevem u anemických stavů, zejména u perniciózní anémie (Ramachandran a Iyer, 1982; Bhatnagar, 1968).

U vyplenění mladších forem erytrocytů však bývá aktivita AChE na jednotku (buňku) zvýšena vzhledem k jejímu vyššímu obsahu v mladých formách červené krvinky (Bhatnagar, 1968; Giovannini a spol., 1978; Ravazzolo a spol., 1981). Naopak snížení aktivity erytrocytární AChE je typické pro paroxysmální noční hemoglobinurii (Herz a spol., 1979; Rakonczay, 1988; Siriwiitaykorn a Yuthavong, 1979) a zejména pro ABO inkompatibilitu (Herz a spol., 1972 a; Mydlil a spol., 1973) (ne však pro Rh erytroblastózu), kdy je jedním z klinicko-laboratorních vyšetření indikujících exsanguinační transfúzi. Také u autoimunní hemolytické anémie, erytroleukémie a akutní leukémie se pozorují subnormální aktivity erytrocytární AChE (Herz a spol., 1972 a, b). Aktivita AChE v erytrocytech je považována za marker integrity erytrocytární membrány (Halbhuber a spol., 1984).

Zvýšená aktivita AChE v rektálních biopsiích je jedním z diagnostických kritérií pro potvrzení či vyloučení Hirschsprungovy nemoci (megacolon congenitum) (Bajgar a Hak, 1979; Dale a spol., 1979; Rakonczay, 1988). Z tohoto zjištění vyšly i další práce o vrozených defektech trávicí a neurální trubice a ukazuje se, že i zde zvýšená aktivita AChE v plodové vodě potvrzuje diagnózu vývojových vad (Bonham a Atack, 1983; Pilowski a spol., 1982). Pokud se aktivita AChE kombinuje se stanovením α -fetoproteinu, falešně pozitivní výsledky jsou minimální (Milunsky a Sapirstein, 1982). U mírnějších malformací, jako hydrocele nebo fetální lymfangiektázie je také aktivita AChE zvýšena (Holzgreve a spol., 1986; Verp a spol., 1984).

Aktivita AChE v mozkomíšním moku nebo v erytrocytech může být snížena i u některých endogenních depresí, ne však u depresí neurotického typu (Davis a Goodnick, 1983; Methew a spol., 1982; Perry a spol., 1982). Také u schizofrenie se uvažuje o možném poškození cholinergního nervového systému (Deutsch a Campbell, 1984). Přímá souvislost prozatím prokázána nebyla, avšak

stále se diskutuje o hypotéze o dysbalanci cholinergního a dopaminergního systému (Dilsaver, 1986).

Ovlivnění cholinergního systému je naopak prakticky prokázáno u Alzheimerovy choroby, kde jsou uváděny změny ve smyslu snížení u cholinacetyltransferázy i AChE (Arendt a spol., 1985; Rakonczay, 1988), na rozdíl od BuChE, která je zvýšena (Perry a spol., 1978). Youkin a spol. (1986) demonstrovali snížení i molekulárních forem AChE (G_4), tj. tetramerní formy, o 40 % v mozku u Alzheimerovy nemoci; Hammond a Brimijoin (1988) pozorovali v 7 kortikálních a dvou z 8 subkortikálních struktur mozku snížení aktivity AChE. Tato zjištění byla základem pro terapii, která však u této demence zůstává stále nepříliš efektivní. Použití prekurzorů acetylcholinu (lecithin a cholin) byly prakticky bez efektu (Corkin, 1981); použití reverzibilních inhibitorů cholinesteráz (fyzostigmin) naráží na úzkou hranici mezi terapeutickou a toxickou dávkou (Fusek a Hrdina, 1984).

Určitou perspektivu skýtá 1, 2, 3, 4-tetrahydro-9-aminoakridin (Tacrin), kde bylo dosaženo cca 75% účinnosti (Summers a spol., 1981, 1986); tato látka byla také velmi účinná u intoxikací anticholinergními látkami (Fusek a Hrdina, 1984). Tacrin má anticholinesterázový účinek (Heilbronn, 1961; Rosič a Milošević, 1967; Fusek a Filip, 1987), potencuje svalové relaxační účinek sukcinylcholinu (Albert, 1966) a stimuluje dechové centrum v prodloužené míše (Shaw a Bentley, 1955). Novou látkou, syntetizovanou na našem pracovišti, s velmi dobrými terapeutickými vlastnostmi byl 7-methoxy derivát Tacrinu (MTX) (Bielavský, 1977), který svými antidotními účinky proti intoxikacím anticholinergiky předčil Tacrin (Fusek a Hrdina, 1984). Také tato látka měla anticholinesterázovou aktivitu in vitro (Patočka, 1988); látka se připravuje k zavedení do výbavy ČSA jako antidotum proti anticholinergním halucinogenům (BZ látka) a pro klinickou praxi.

Ovlivnění celkové aktivity AChE i BuChE různými látkami bylo a je předmětem zájmu celé řady výzkumných týmů. Je však nutné podotknout, že AChE, jako řada jiných enzymů, existuje ve více molekulárních formách. Zatímco u BuChE se jedná o izoenzymy lišící se fyzikálně-chemickými vlastnostmi a daných geneticky (Brown a spol., 1981; Whittaker, 1980), u AChE se jedná o molekulární formy vzniklé skládáním subjednotek. Podle nich jsou rozeznávány globulární (G) a asymetrické (A) formy. Globulární formy mohou existovat jako mono-, di- a tetramer (G_1 , G_2 , G_4), zatímco asymetrické s tzv. chvostovitou (tailed) částí molekuly jsou ve formě tetrameru (A_4 , A_8 , A_{12}). Pro praktické potřeby se dále tyto formy mohou dělit na nízkomolekulární a vysokomolekulární, na rozpustné a na membránu vázané a dále podle elektroforetického rozdělení v různých nosičích. Nomenklatura forem však dosud není jednotná (Brimijoin a Rakonczay, 1986; Skau, 1986).

Pomocí řady separačních technik bylo v mozkové tkáni různých druhů dokázáno 2 až 6 molekulárních forem AChE. Vijayan a Brownson (1974) pozorovali po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu 3 formy v extraktu kryšího mozku s Tritonem X 100; Scrivinasan a spol. (1976) detekovali s tímž detergentem v synaptosomech a mikrosomech kryšího mozku 4 formy; Oderfeld-Nowak a Škangiel-Kramská (1976) ukázali 2 formy v hipokampu potkana, stejně tak jako Rieger a Vigny (1976) v celém

mozku potkana; v témže materiálu Wenthold a spol. (1974) detekovali pomocí gelové filtrace 4 formy.

Aktivita molekulárních forem těchto enzymů je ovlivňována mnoha dalšími faktory. Jak formy AChE, tak BuChE jsou většinou inhibovány některými látkami ne typu OF či NPL (Bajgar a Patočka, 1977; Bignami a spol., 1975; Brownson a spol., 1977; Vernadakis a Clark, 1979); jejich ovlivnění bylo demonstrováno i pomocí hormonálních faktorů (Bajgar a spol. 1972; Hrdina a spol., 1975; Tuček a spol., 1976). Aktivitu cholinesteráz ovlivňuje výživa (Adlard a Dobbing, 1971; Patel a spol., 1978), vnější prostředí (Bignami a spol., 1975; Brownson a spol., 1977) a další faktory (Bajgar a Pařízek, 1973; Bignami a spol., 1975; Hüther a spol., 1978; Oderfeld-Nowak a Skangiel-Kramska, 1976; Tuček a spol., 1976; Vigny a spol., 1976).

Jak vyplývá z vývojové studie Giacobiniho (1978), cholinergní synapse při vývoji procházejí několika stadii - fáze inervace, neurotransmise, receptogeneze a dokončení vývoje. Při všech těchto stadiích mohou vývoj cholinergního přenosu nervového vzruchu ovlivňovat katecholaminy (Bhargava a spol., 1978; Kadlec a Mašek, 1978; Paton a Vizi, 1969).

Nepřímým bylo ovlivnění molekulárních forem AChE katecholaminy prokázáno u spontánně hypertenzních krys (Bajgar a spol., 1979 a). Z dalších faktorů je to izolace částí nervového systému, která vede k nerovnoměrnému poklesu jednotlivých forem AChE v mozku, např. po deafferentaci (Bajgar a Pařízek, 1973) či lézích částí CNS (Oderfeld-Nowak a Skangiel-Kramska, 1976). Cílené léze částí mozku s následným sledováním změn aktivity AChE jsou častým modelem pro průkaz cholinergních projekcí v CNS, jak bylo např. demonstrováno pro septum, kde existují dvě oddělené cholinergní projekce z mediálních a dorzálních septálních jader do hipokampu a dalších částí mozku (Herink a spol., 1975; Bajgar a spol., 1977); je však nutné podotknout, že změny aktivity AChE nejsou tak specifickým markerem cholinergních projekcí, jako jsou změny aktivity ChAc (cholinacetyltransferáza). Podobným způsobem byla prokázána i modulace cholinergního přenosu nervového vzruchu v septu leucin⁵-enkefalinem (Herink a spol., 1981; Bajgar a spol., 1985).

Také denervace svalů vede ke změnám spektra hydroláz obecně (Barron a spol., 1968).

Ve svalové tkáni byla AChE pozorována většinou v oblastech neuromuskulárních plotének. Svaly s multifokální distribucí plotének, jako je anterior latissimus dorsi (ALD, pomalý sval) a s unifokální lokalizací plotének, jako je posterior latissimus dorsi (PLD, rychlý sval) byly demonstrovány zejména u kuřat (Ginsborg, 1960; Linkhart a Wilson, 1975; Vigny a spol., 1976). U těchto dvou typů svalů byly molekulární formy AChE velmi podobné. Byly zde demonstrovány tři formy, které se lišily svými sedimentačními koeficienty (Vigny a spol., 1976). Forma s vysokou molekulární vahou pak po denervaci mizela jak u pomalých, tak u rychlých svalů (Vigny a spol., 1976). Na druhé straně však Linkhart a Wilson (1975) popsali rozdíly v obsahu molekulárních forem AChE ALD a PLD u kuřete. Pozorovali tři formy AChE u normálního ALD, avšak jen jednu formu u normálního PLD.

Lokalizace molekulárních forem AChE u oblastí kryšího svalu obsahujících nebo neobsahujících neuro-

muskulární ploténky byla rozdílná (Rieger a Vigny, 1976). Také u jiných druhů, např. u myši, byly demonstrovány rozdílné molekulární formy AChE u jednotlivých svalů (Adamson, 1977).

Bajgar a spol. (1979 b) sledovali změny aktivity hydroláz a obsah bílkovin u kuřecích svalů - ALD a PLD - během pre- a postnatálního vývoje. Obsah bílkovin v obou svaích vzrůstal, AChE ale klesala u PLD. Všechny sledované hodnoty se blížily k rovnovážnému stavu asi za tři týdny vývoje ex ovo. Elektroforetická separace studovaných vzorků demonstrovala tři molekulární formy AChE přítomné v obou svaích (ALD, PLD) dospělých jedinců. Dvě molekulární formy v ALD stoupaly pomalu, jedna forma rychle. Aktivita molekulárních forem AChE v PLD se během vývoje snižovala různou rychlostí pro jednotlivé formy.

V přehledném referátu Skau (1986) jsou výsledky o změnách molekulárních forem AChE shrnuty. Z přehledu vyplývá, že do té doby, než bude nomenklatura molekulárních forem standardizována, by měly být separované formy ještě dál charakterizovány pomocí fyzikálně-chemických či enzymatických vlastností. Zásadní otázkou však zůstává (Aldridge, 1975; Brimijoin a Rakonczay, 1986; Rakonczay 1988, Skau, 1986), zda jsou tyto formy přítomny v organismu i za fyziologických podmínek a nejedná se o artefakta vzniklá při zpracování (homogenizace, centrifugace, dělení) tkáně. I když tato otázka byla zčásti vyřešena (Bajgar, 1979), zůstává stále ještě mnoho problémů nejasných.

Z teoretického hlediska bude třeba dalšího studia k objasnění struktury aktivních míst v molekule AChE i BuChE, zejména míst alosterických, a hledání dalších možných inhibitorů či aktivátorů těchto enzymů. Dalším problémem bude purifikace obou enzymů (zejména AChE z mozkové tkáně) do krystalické formy a další studium (zejména imunologické) molekulárních forem; bude třeba objasnit detailněji syntézu enzymu a faktory, které ji ovlivňují. Tyto výsledky budou mít i praktický dopad v klinice, protože pomohou objasnit fyziologickou funkci BuChE v plazmě nebo AChE v erytrocytech, přispějí k poznatkům o ovlivnění cholinergního přenosu nervového vzruchu, k bližšímu poznání jeho spojení a vztahů s dalšími mediátorovými systémy a tímto způsobem přispějí i k bližšímu poznání patogeneze, např. psychiatrických či jiných onemocnění.

V této souvislosti se pak dá uvažovat i o řízené regulaci jednotlivých molekulárních forem, popř. o jejich selektivním ovlivnění k účelům terapeutickým či výzkumným. To vše skýtá reálnou naději, že v budoucnu bude možné stavy spojené se změnou cholinergního nervového systému, včetně intoxikací, ještě efektivněji terapeuticky zvládat.

Souhrn

V práci jsou shrnuty současné poznatky o cholinesterázách: acetylcholinesteráza (AChE) se účastní cholinergního přenosu nervového vzruchu, funkce butyrylcholinesterázy (BuChE) je prozatím ne zcela objasněna. Je diskutováno o geneticky determinovaném významu BuChE, její diagnostické důležitosti při onemocněních zejména jater. Stanovení AChE má

význam zejména při vrozeném megakolon, vývojových vadách neurální trubice a ABO inkompatibilitách. Existuje celá řada faktorů ovlivňujících aktivitu obou enzymů (deafferentace, ozáření, léčiva aj.), včetně jejich molekulárních forem, a předpokládá se, že význam jejich stanovení pro kliniku v budoucnosti bude vzrůstat.

Pro velký rozsah (105 citací) není vytištěn seznam použité literatury. Literární citace jsou k dispozici u autora článku a v redakci VZL.

Klíčová slova: Acetylcholinesteráza; Butyrylcholinesteráza; Ovlivnění aktivity; Patologické vlivy; Inhibitory.