Rozdział 8

ŚRODKI ANTYCHOLINOESTERAZOWE

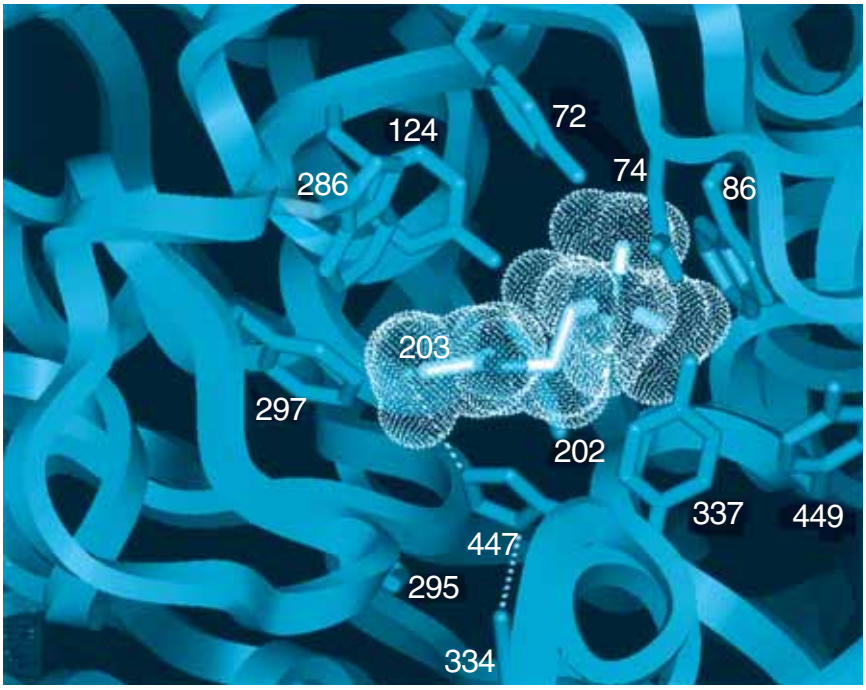
Palmer Taylor
Tłumaczenie: Piotr Sokołowski

W rozdziale 6 omówiono rolę acetylocholinoesterazy (AChE) w przerywaniu działania acetylocholiny (ACh) w połączeniach zakończeń różnych nerwów cholinergicznych z ich narządami efektorowymi lub w obszarach postsynaptycznych. Leki, które hamują AChE [pośrednie związki cholinomimetyczne będące inhibitorami acetylocholinoesterazy – przyp. tłum.], określa się jako *środki antycholinoesterazowe* (anty-ChE). Powodują one nagromadzenie ACh w okolicy zakończeń nerwów cholinergicznych i dlatego mogą potencjalnie wywoływać efekty równoważne nadmiernej stymulacji receptorów cholinergicznych w obrębie ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. W związku z powszechnym występowaniem neuronów cholinergicznych u różnych zwierząt nie może dziwić, że środki anty-ChE [nieodwracalne inhibitory AChE – przyp. tłum.] znalazły szerokie zastosowanie w rolnictwie jako środki owadobójcze (insektycydy) i pestycydy, a także jako potencjalna broń chemiczna – tzw. „gazy bojowe" (*nerve gases*) [w Polsce stosuje się często określenie środki paralityczno-drgawkowe – przyp. tłum.]. Niemniej jednak wiele środków anty-ChE ma szeroki zakres wskazań terapeutycznych; inne, które przenikają przez barierę krew-mózg zostały zaaprobowane do leczenia choroby Alzheimera lub znajdują się na etapie prób klinicznych w tym zakresie.

Przed II wojną światową znano powszechnie jedynie „odwracalne" środki anty-ChE, z których substancją „prototypową" jest *fizostygmina*. Na krótko przed II wojną światową i podczas jej trwania stworzono, głównie dzięki pracom Schradera z I. G. Farbenindustrie, nową klasę wysoce toksycznych substancji chemicznych – związki fosforoorganiczne, początkowo z myślą o zastosowaniu w charakterze rolniczych insektycydów, a później również jako potencjalna broń chemiczna. Stwierdzono, że niezwykle silna toksyczność tych substancji jest związana z wywoływaną przez nie „nieodwracalną" inaktywacją AChE, która powoduje długotrwałe unieczynnienie tego enzymu. Ponieważ działania farmakologiczne obu klas środków anty-ChE są podobne, zostały one omówione w niniejszym rozdziale w ramach jednej grupy. Interakcje tych związków z innymi lekami działającymi w obrębie synaps układu autonomicznego oraz w obrębie złącza nerwowo-mięśniowego opisano w rozdziałach 7 i 9.

Kontekst historyczny. Fizostygmina, zwana również *ezeryną*, jest alkaloidem otrzymywanym z wysuszonych, dojrzałych nasion bobu kalabarskiego (*Physostigma venenosum*, *Balfour*) [inne nazwy: bobotrutka trująca, bobotrutka jadowita, fasola kalabarska, wyroczyn kalabarski – przyp. tłum.], byliny spotykanej w tropikalnej części Afryki Zachodniej. Bób kalabarski był niegdyś stosowany przez tubylcze plemiona jako „trucizna próby" w procesach o czary. Czysty alkaloid został wyodrębniony przez Jobsta i Hessego w 1864 roku i nazwany fizostygminą. Po raz pierwszy lek ten został wykorzystany terapeutycznie przez Laqueura w 1877 roku do leczenia jaskry, która również obecnie pozostaje jednym ze wskazań do jego stosowania. Interesujące informacje dotyczące historii fizostygminy znajdują się w publikacjach Karczmara (1970) i Holmstedta (2000).

Dzięki badaniom podstawowym przeprowadzonym przez Stedmana i współpracowników, poznano strukturę chemiczną fizostygminy warunkującą jej aktywność, co pozwoliło na rozpoczęcie dalszych systematycznych badań i wyodrębnienie szeregu aromatycznych estrów alkilowych kwasów karbaminowych. *Neostygminę* wprowadzono do lecznictwa w 1931 roku jako środek pobudzający przewód pokarmowy, a później wy-



Ryc. 8-1. ***Jama centrum aktywnego acetylocholinoesterazy ssaków.*** Związaną acetylocholinę przedstawiono w postaci wykropkowanej struktury odzwierciedlającej odpowiednie siły van der Waalsa. Rycina przedstawia strukturę krystaliczną centrum aktywnego mysiej cholinoesterazy, która jest w istocie identyczna z ludzką AChE (Bourne i wsp., 1995). Uwzględniono łańcuchy boczne: a) triady katalitycznej, Glu_{334}, His_{447}, Ser_{203} (wiązania wodorowe przedstawiono za pomocą linii kropkowanych); b) kieszeni acylowej Phe_{295} i Phe_{297}; c) miejsca cholinowego Trp_{86}, Glu_{202} i Tyr_{337} oraz miejsca obwodowego Trp_{286}, Tyr_{72}, Tyr_{124} i Asp_{74}. Tyrozyny 337 i 449 są odsunięte dalej od centrum aktywnego, jednak prawdopodobnie biorą udział w stabilizacji niektórych ligandów. Triada katalityczna, miejsce cholinowe i „kieszeń" acylowa są zlokalizowane u podstawy jamy, natomiast miejsce obwodowe u wejścia do niej. Jama ma głębokość od 18 do 20 Å, a jej podstawa stanowi centrum symetrii w stosunku do podjednostki.

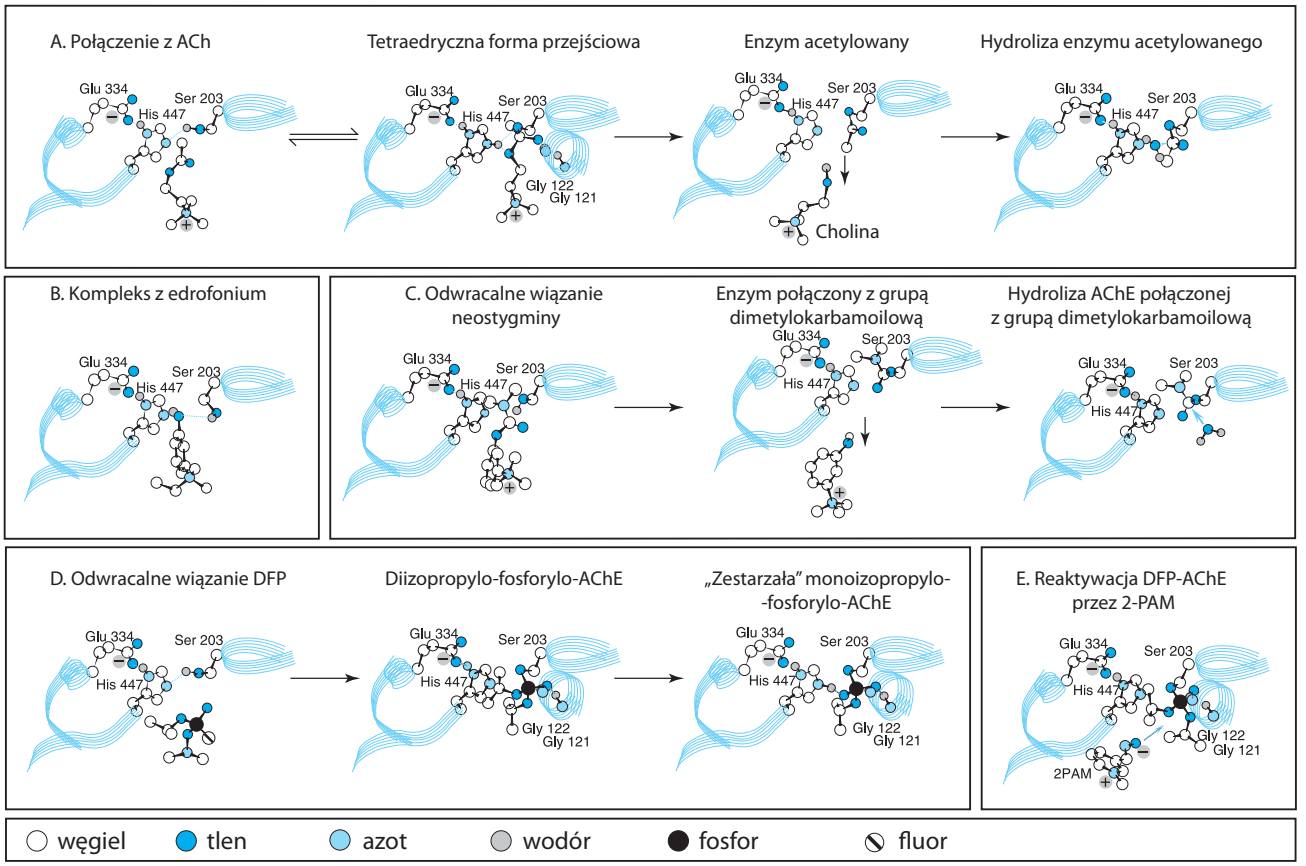
kazano jej skuteczność również w objawowej terapii nużliwości mięśniowej (miastenii).

Warto zauważyć, że pierwszy opis syntezy związku fosforoorganicznego o bardzo silnym działaniu anty-ChE, pirofosforanu tetraetylu (*tetraethyl pyrophosphate* – TEPP), został opublikowany przez Clermonta w 1854 roku. Jeszcze bardziej godny uwagi jest fakt, że badacz ten przeżył, pomimo że zażył środek, i podał w publikacji, jaki jest smak otrzymanego związku, tymczasem kilka kropli tej substancji powinno mieć efekt letalny. Nowoczesne badania związków fosforoorganicznych dotyczące syntezy dimetylowych i dietylowych estrów fluorofosforanowych datują się od publikacji Langego i Kruegera z 1932 roku. Obserwacje autorów, że wdychanie wspomnianych związków wywoływało długotrwałe uczucie dławienia oraz zaburzenia widzenia odegrało znaczącą rolę w nakłonieniu Schradera do zbadania tej klasy związków pod kątem ich aktywności owadobójczej.

Po dokonaniu syntezy około 2000 związków, Schrader zdefiniował cechy strukturalne wymagane do aktywności owadobójczej (i, jak się okazało później, także aktywności anty-ChE) (patrz niżej) (Gallo i Lawryk, 1991). Jeden ze środków pochodzących z tej wczesnej serii – paration (będący estrem kwasu tiofosforowego), stał się później szeroko wykorzystywanym insektycydem. *Malation*, związek obecnie szeroko stosowany, również zawiera wiązanie tiofosforowe występujące w parationie. Przed II wojną światową i podczas jej trwania wysiłki grupy Schradera były skierowane na rozwój środków broni chemicznej. Synteza szeregu związków znacznie bardziej toksycznych od parationu, takich jak sarin, soman i tabun, była utrzymywana w tajemnicy przez rząd niemiecki. Badacze w krajach alianckich również poszli tropem Langego i Kruegera w poszukiwaniu potencjalnych związków toksycznych; szczególnie ester diizopropylowy kwasu fluorofosfonowego (*diisopropyl fluorophosphate* – DFP) zsyntetyzowany przez McCombiego i Saundersa, był badany przez naukowców brytyjskich i amerykańskich.

W latach 50. XX wieku zbadano serię aromatycznych karbaminianów i stwierdzono, że cechują się one wysoce selektywną toksycznością w stosunku do owadów oraz są silnymi środkami blokującymi działanie acetylocholinoesterazy (Ecobichon, 2000).

Struktura acetylocholinoesterazy. AChE występuje w dwóch podstawowych klasach form molekularnych: w postaci prostych homomerycznych oligomerów podjednostek katalitycznych (tj. monomerów, dimerów i tetramerów) oraz w postaci heteromerycznych połączeń podjednostek katalitycznych ze strukturalnymi (Massoulié, 2000; Taylor i wsp., 2000). Obecność form homomerycznych stwierdza się w postaciach rozpuszczalnych w obrębie komórki, przypuszczalnie są one przeznaczone do wyeksportowania na zewnątrz komórki lub do związania z zewnętrzną błoną komórkową, na ogół za pośrednictwem przyłączonego glikofosfolipidu. Jedna z form heteromerycznych, której obecność stwierdza się głównie w synapsach neuronalnych, stanowi tetramer podjednostek katalitycznych połączo-



Ryc. 8-2. ***Poszczególne etapy hydrolizy acetylocholiny przez acetylocholinoesterazę oraz procesy hamowania i reaktywacji enzymu.*** Uwidoczniono jedynie trzy reszty triady katalitycznej pokazane wcześniej na rycinie 8-1. Połączenia i reakcje obejmują: ***A.*** Reakcję katalityczną [hydrolizy – przyp. tłum.] acetylocholiny (ACh): wiązanie ACh, tworzenie tetraedrycznego stanu przejściowego, utworzenie enzymu acetylowanego z uwolnieniem choliny, gwałtowną hydrolizę enzymu acetylowanego z odtworzeniem stanu pierwotnego. ***B.*** Odwracalne wiązanie edrofonium i hamowanie przezeń enzymu. ***C.*** Reakcję neostygminy z AChE i spowodowane nią hamowanie enzymu: odwracalne wiązanie neostygminy, tworzenie pochodnej dimetylokarbamoilowej enzymu, wolną hydrolizę pochodnej dimetylokarbamoilowej enzymu. ***D.*** Reakcję fluorofosforanu diizopropylu (DFP) i hamowanie AChE: odwracalne wiązanie DFP, tworzenie pochodnej diizopropylofosforylowej enzymu, tworzenie „zestarzałej" pochodnej monoizopropylofosforylowej enzymu. Hydroliza pochodnej diizopropylowej enzymu przebiega bardzo powoli i nie została ukazana. Zestarzała pochodna monoizopropylofosforylowa jest faktycznie oporna na hydrolizę i reaktywację. Tetraedryczny stan przejściowy podczas hydrolizy ACh przypomina połączenia tworzone przez tetraedryczne inhibitory fosforanowe i odpowiada za siłę ich działania. Atomy wodoru wiązań amidowych z Gly 121 i 122 powodują stabilizację atomów tlenu grup karbonylowej i fosforylowej. ***E.*** Reaktywację pochodnej diizopropylofosforylowej enzymu przez pralidoksym (2-PAM). Dokonywany przez 2-PAM atak na atom fosforu enzymu fosforylowanego prowadzi do utworzenia fosfo-oksymu, z jednoczesną regeneracją aktywnego enzymu. Poszczególne etapy reakcji fosforylacji i reakcji z oksymem zostały poznane dzięki badaniom z wykorzystaniem spektrometrii masowej (Jennings i wsp., 2004).

nych wiązaniami dwusiarczkowymi z podjednostką o masie cząsteczkowej 20 000 daltonów, połączoną z lipidem. Podobnie jak forma przyłączona do fosfolipidu, jest ona stwierdzana w obrębie zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Inna forma heteromeryczna składa się z tetramerów podjednostek katalitycznych, połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi z każdą z trzech nici kolagenopodobnej jednostki strukturalnej. Ta forma molekularna, której masa cząsteczkowa dochodzi do 10^6 daltonów jest związana z błoną podstawną w obrębie połączeń [synaptycznych – przyp. tłum.] mięśni szkieletowych.

Klonowanie molekularne ujawniło, że acetylocholinoesterazy kręgowców (AChEs) są kodowane przez pojedynczy gen (Schumacher i wsp., 1986; Taylor i wsp., 2000). Fragment genu kodujący centrum katalityczne pozostaje niezmienny, dlatego można oczekiwać, że poszczególne odmiany AChE będą wykazywać identyczną specyficzność w zakresie substratów i inhibitorów. Natomiast liczne produkty genu powstające w wyniku odmiennej obróbki mRNA różnią się jedynie budową końca karboksylowego. Oddzielny gen, lecz spokrewniony strukturalnie, koduje butyrylocholinoesterazę, która jest syntetyzowana w wątrobie, a wykrywana głównie w osoczu (Lockridge i wsp., 1987). Cholinoesterazy wyznaczają nadrodzinę białek, których wzorcem strukturalnym jest złożenie α,β hydrolazy (Cygler i wsp., 1993). Rodzina ta obejmuje wiele esteraz, innych hydrolaz, których obecności nie stwierdzono w układzie nerwowym oraz, co stanowi niespodziankę, także białka pozbawione ak-