

Sylwester Chyb^{*}

Okołodobowa rytmika aktywności acetylocholinesterazy (AChE) w szyszynce myszy hodowanych w warunkach LD 12:12¹

Streszczenie

Przebadano okołodobowe zmiany aktywności acetylocholinesterazy (AChE, EC 3.1.1.7.) w szyszynce myszy, samców w warunkach oświetlenia LD 12:12.

Stwierdzono występowanie okołodobowej rytmiki aktywności AChE, której okres wynosił 23.07 godzin, a akrofaza przypadała na początek fazy jasnej doby (8.26 h).

Równocześnie badano aktywność motoryczną tych zwierząt hodowanych pojedynczo lub po cztery osobniki w klatce. W obydwu przypadkach miała ona charakter rytmiczny, a stwierdzone różnice dotyczyły: długości okresu rytmu, średniej aktywności motorycznej oraz akrofazy. W grupie zwierząt hodowanych zespołowo okres rytmu był krótszy, średnia aktywność wyższa a akrofaza występowała wcześniej w porównaniu do rytmu motoryki zwierząt hodowanych indywidualnie.

WSTĘP

Acetylocholinesteraza należy do dobrze poznanych enzymów. Jest to glikoproteid, składnik węglowodanowy może osiągać nawet 15% masy cząsteczkowej enzymu. Występuje ona w kilku równowartościowych pod względem enzymologicznym formach mo-

¹Praca wykonana w ramach problemu R.III.14 koordynowanego przez Uniwersytet Jagielloński.

^{*}Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

lekularnych: globularnych i asymetrycznych (Brimijoin, 1983; Massoulie i wsp., 1984; Muller i wsp., 1985; Skau, 1985).

Enzym ten występuje we wszystkich zakończeniach nerwowych cholinergicznych tj. produkujących i uwalniających acetylocholinę jako neurotransmitter. AChE wraz z uczestniczącą w syntezie acetylocholiny cholinacetyltransferazą (CAT, EC 2.3.1.6.) uważana jest za marker włókien cholinergicznych. Jednak wykazano jej występowanie także w układzie adrenergicznym.

Acetylocholinesteraza występuje również w erytrocytach, osoczu, ścianach naczyń krwionośnych i w gruczołach wydzielniczych, np. w śliniankach (Silver, 1974; Beauregard 1980). Jej substratami obok acetylocholiny mogą być acetyl-beta-metylocholina, acetylkarnitylocholina i niektóre estry niecholinowe. AChE uczestniczy także w wywoływaniu zmian przepuszczalności błon komórkowych, głównie dla kationów sodu (Silver, 1974).

Aktywność AChE badano u wielu ssaków, między innymi u psa (Malatova i wsp., 1980; Malatova, 1983), owcy (Nambodiri i wsp., 1985), królika (Brainard i wsp., 1984), szczura (Quay i wsp. 1971) i myszy (Lewandowski, 1983a; Surowiak i Barbacka-Surowiak 1985). W wyniku tych badań wykazano obecność okołodobowej rytmiki aktywności AChE w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), np. w podwzgórzu (Barbacka-Surowiak - praca w druku), które uważa się za nadrzędny ośrodek regulujący rytmikę zwierząt.

W szyszynce stwierdzono dotychczas okołodobową rytmikę zawartości serotoniny (5-HT) i melatoniny (MT) oraz aktywności enzymów biorących udział w syntezie melatoniny: N-acetylotransferazy (NAT) oraz 5-hydroksyindolo-O-metylotransferazy (HIOMT) (Binkley, 1981; Binkley i Bramner, 1981; Hoffman, 1981; Brainard i wsp., 1984, Reiter, 1984; Reppert i wsp., 1984, Tang i wsp., 1985).

Rola szyszynki w regulacji rytmiki okołodobowej jest wciąż przedmiotem dyskusji. Zwłaszcza u ptaków i niższych

kręgowców jej udział w regulacji rytmiki okołodobowej jest niemal niewątpliwy.

Celem niniejszej pracy było wykazanie zmian aktywności AChE w szyszynce myszy hodowanych w warunkach oświetlenia LD 12:12 i stwierdzenie, czy zmiany te wykazują rytmikę okołodobową, a także w jakim stosunku pozostają one do rytmiki lokomotorycznej zwierząt hodowanych pojedynczo i po cztery osobniki w klatce.

MATERIAŁY I METODY

Do badań użyto 91 samców myszy szczepu Swiss (z hodowli "Camur") o średniej masie 20-26 g + 5 od urodzenia hodowanych w warunkach LD 12:12 (faza jasna od godz. 8.00 do 20.00, faza ciemna od godz. 20.00 do 8.00), w izolacji akustycznej, w temperaturze 20°C + 2 i względnej wilgotności powietrza 55% + 5, po cztery osobniki w klatce. Standardowy pokarm granulowany i wodę podawano ad libitum codziennie o godz. 9.

Pomiary aktywności motorycznej indywidualnej i zespołowej wykonywano umieszczając zwierzęta pojedynczo lub po cztery osobniki w klatkach aktometrycznych. Każdy ruch zwierzęcia był rejestrowany przez licznik elektroniczny w postaci impulsu i co godzinę suma impulsów z każdej klatki była rejestrowana na taśmie perforowanej. Wyniki opracowano, przy pomocy komputera MS-3A, dla każdego osobnika indywidualnie z klatek pojedynczych, a następnie je uśredniono. Dla osobników hodowanych w klatkach zespołowych obliczano wartości średnie grupy.

Materiał do badań enzymatycznych pobierano przez dwie doby co 4 godziny począwszy od godziny 8. W fazie ciemnej doby wykonywano zabieg przy słabym świetle czerwonym. Myszy zabijano przez dekapitację. Wypreparowaną szyszynkę umieszczano w 3 ml zimnego buforu fosforanowego o pH 8, a następnie homogenizowano przez 2 min. w mechanicznym homogenizato-

rze szklano-teflonowym. Aktywność AChE oznaczano metodą Ellmana i wsp. (1961). Substratem był jodek acetylotiocholiny. Powstająca w wyniku jego hydrolizy tiocholina reagując z dodanym do homogenatu DTNB (5-tio-2-nitrobenzoesanem) daje żółte zabarwienie, którego intensywność jest wprost proporcjonalna do ilości rozłożonej przez enzym acetylotiocholiny, a więc i do aktywności enzymu zawartego w homogenacie.

Uzyskane dane opracowano zmodyfikowaną metodą kosinorów Halberga (1969) dla prawdopodobieństwa P równego 95%, obliczając wartości średnie M (mesor), amplitudę rytmu (A) i akrofazę rytmu (ϕ) dla okresu dopasowanego τ i arbitralnego $T = 24$ h.

WYNIKI

Z uzyskanych danych wynika, że aktywność acetylocholinesterazy w szyszynce myszy wykazuje statystycznie istotną, okołodobową rytmikę z akrofazą przypadającą na przełom fazy ciemnej i jasnej doby, około godziny 8 (tab. 1, rys. 1).

Aktywność motoryczna tych zwierząt wykazuje również statystycznie istotną rytmikę okołodobową zarówno u zwierząt hodowanych pojedynczo, jak i zespołowo (tab. 1, rys. 1). Pewne różnice wystąpiły w długościach okresu rytmu i pomiędzy ich akrofazami. Akrofaza okołodobowej rytmiki motorycznej zwierząt hodowanych zespołowo wypada w godzinach od 23.30 do 24.50, natomiast u zwierząt hodowanych pojedynczo mieści się między godzinami 1.40 a 2.15. Obie akrofazy poprzedzają jednak akrofazę okołodobowej rytmiki aktywności AChE w szyszynce tych zwierząt (tab. 1, rys. 1).

Występuje również istotna różnica w globalnej aktywności motorycznej pomiędzy zwierzętami hodowanymi pojedynczo i zespołowo. Globalna aktywność motoryczna w drugim z przypadków jest niemal dwukrotnie wyższa od aktywności zwierząt hodowanych pojedynczo (tab. 1, rys. 1). Efektem tej zwiększonej

aktywności zwierząt hodowanych zespołowo jest skrócenie okresu ich rytmiki okołodobowej.

Tabela 1

Zestawienie wartości parametrów: M, A, ϕ dla badanych rytmów w okresie dopasowanym (τ) i arbitralnym (T=24 h)

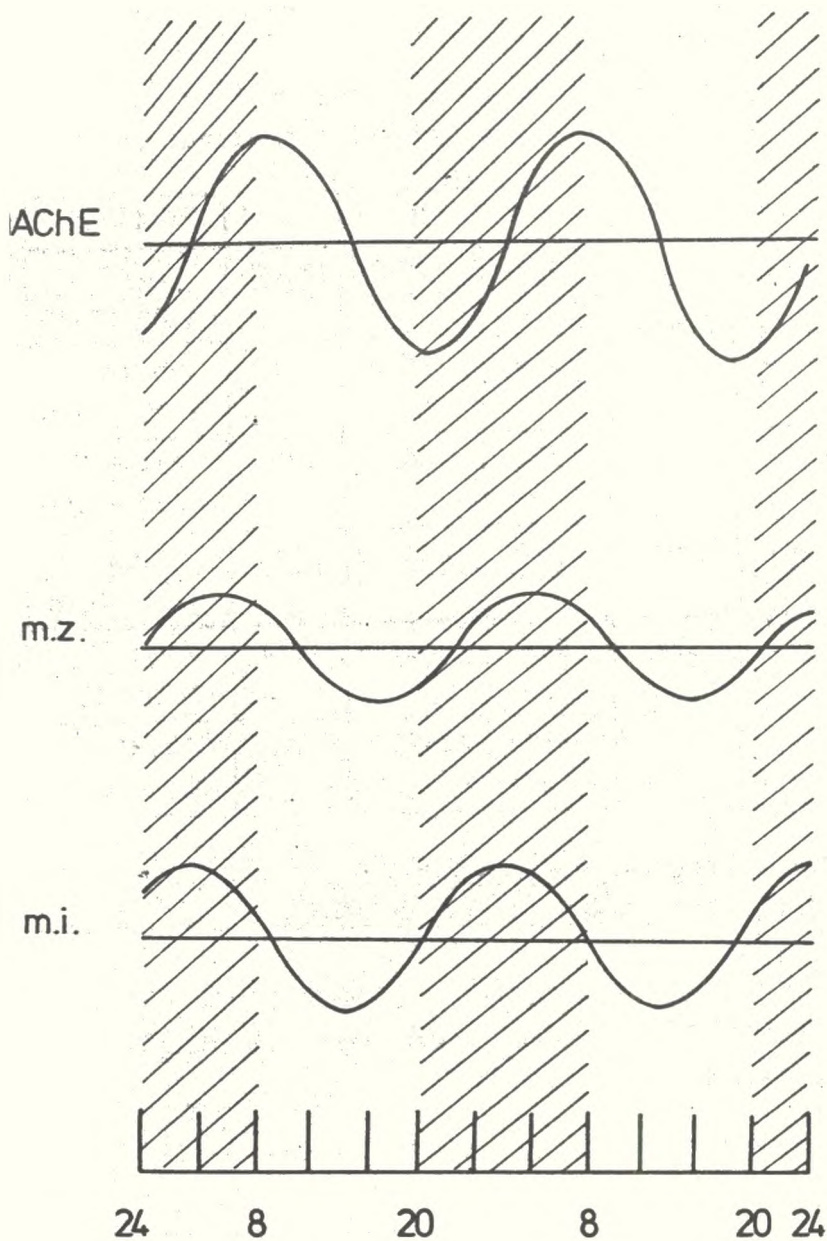
Rytm	N	P	M	A	ϕ	Okres
AChE	91	95%	189.89	28.02	8.26 -4.28 +5.33	=23h07
AChE	91	95%	190.67	28.39	8.39 -4.39 +5.50	T=24h
m.z.	91	95%	4861.9	1384	23.38 -0.00 +0.00	=16h43
m.z.	91	95%	4802.2	773	0.59 -0.00 +0.01	T=24h
m.i.	91	95%	2851.5	814	2.15 -0.05 +0.12	=21h55
m.i.	91	95%	2836.9	729	1.43 -0.00 +0.15	T=24h

AChE oznacza rytm aktywności AChE w szyszynce,

m.i. (m.z.) oznacza rytmikę motoryki indywidualnej (zespołowej),

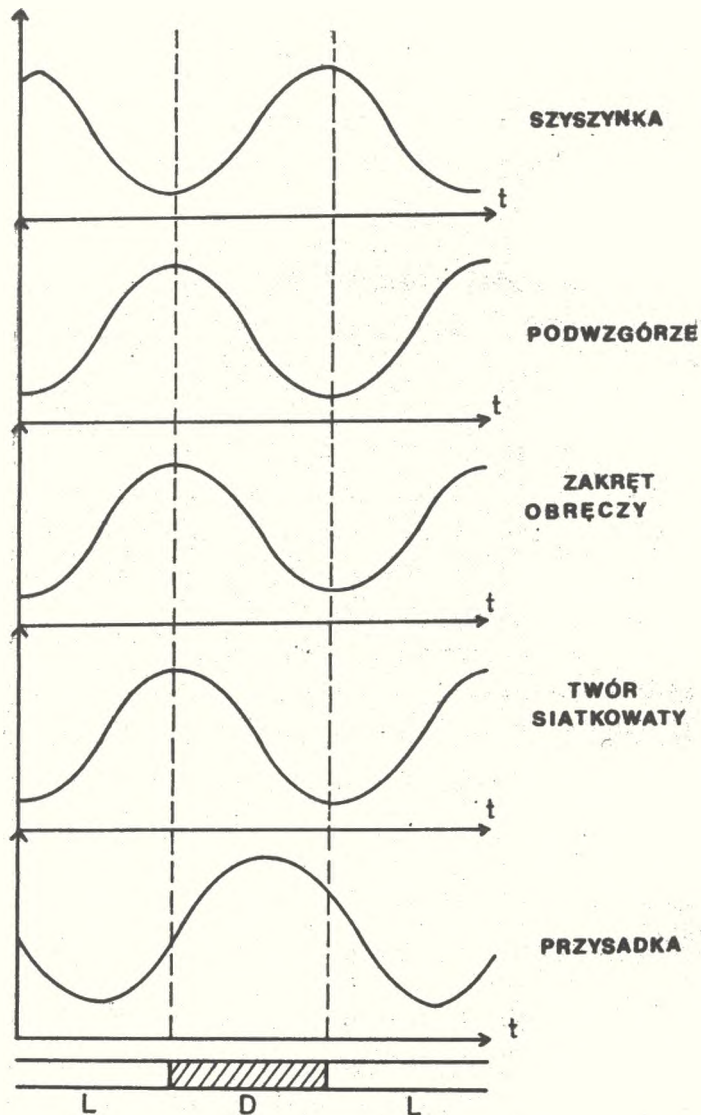
N - liczba zwierząt użytych do badań, P - prawdopodobieństwo. Dla akrofazy (ϕ) podano także wartości odchyień (ujemnych i dodatnich).

Rys. 1. Krzywe sinusoidalne wyrażające okołodobowe rytmiczne zmiany: AChE - aktywności acetylocholinesterazy w szyszynce myszy, m.z. - aktywności motorycznej zwierząt hodowanych po 4 w klatce i m.i. - aktywności motorycznej zwierząt hodowanych pojedynczo. Faza ciemna została zakreślowana.



Rys. 2. Krzywe sinusoidalne wyrażające okołodobową rytmikę aktywności AChE w szyszynce w porównaniu z rytmiką aktywności: 1 - w podwzgórzu - Surowiak i Barbacka-Surowiak, 2 - w układzie limbicznym - Surowiak i Barbacka-Surowiak, 3 - w tworze siatkowatym - Lewandowski, 4 - w przysadce - Czernek (wszystkie dane pochodzą z kwietnia; za zgodą autorów).

AKTYWNOŚĆ AChE



DYSKUSJA

Quay i wsp. (1971) wykazali w podwzgórzu i mózdzku szczurów hodowanych zespołowo okołodobową rytmikę aktywności AChE, zaś w korze motorycznej mózgowia szczurów Wood i Rose (1979). Rytmikę okołodobową aktywności AChE w podwzgórzu i zakręcie obręczy układu limbicznego oraz jej zmienność wykazali Surowiak i Barbacka-Surowiak (1985), a w tworze siatkowatym pnia mózgu tych zwierząt Lewandowski (1983b). Zmiany sezonowe rytmiki okołodobowej AChE w przysadce myszy wykazała Czernek (dane nie opublikowane).

Ponieważ z wyżej wymienionych prac (Surowiak i Barbacka-Surowiak 1985; Lewandowski, 1983b; Czernek) wynika, że w opisanych przez tych autorów okolicach ośrodkowego układu nerwowego rytmika okołodobowa tego enzymu ulega pewnym zmianom w poszczególnych porach roku: zmienia się okres rytmu, jego wartość średnia, amplituda rytmu i akrofaza, dlatego badania nad rytmiką okołodobową AChE w szyszynce przeprowadzono w okresie wiosennym, w kwietniu. W tym okresie, jak podają wyżej cytowani autorzy, rytmika okołodobowa aktywności AChE występuje wyraźnie.

Przebieg zmian aktywności AChE w okresie okołodobowym różni się jednak, choć w nieznacznym stopniu, od rytmiki tego enzymu w podwzgórzu, układzie limbicznym, tworze siatkowatym pnia mózgu i w szyszynce. Gdy akrofaza aktywności AChE w podwzgórzu, układzie limbicznym i tworze siatkowatym przypada w tej porze roku na przełom fazy jasnej i ciemnej lub na początek fazy ciemnej, to w przysadce występuje ona w godzinach nocnych, a w szyszynce na początku fazy jasnej. Różnice te ilustruje rys. 2.

Szyszynka wykazuje typową aktywność nocną. Świadczą o tym liczne badania dotyczące rytmiki okołodobowej poziomu melatoniny oraz aktywności enzymów biorących udział w jej syntezie: NAT i HIOMT. W rezultacie ich wzmożonej aktywności katalitycznej w fazie ciemnej doby wzmagają się produk-

cja melatoniny, przy jednoczesnym spadku zawartości serotoniny, będącej substratem wyjściowym do jej syntezy (Binkley, 1981; Binkley i Bramner, 1981; Hoffman, 1981; Brainard i wsp., 1984; Reiter, 1984; Reppert i wsp., 1984; Tang i wsp., 1985).

W przypadku wielu gryzoni, a więc i myszy, faza ciemna doby jest okresem wzmożonej aktywności motorycznej, co również potwierdzają wyniki niniejszej pracy w odniesieniu do zwierząt hodowanych zespołowo, jak i pojedynczo. U obydwu grup zwierząt akrofaza rytmu aktywności motorycznej przypadała na środkowe godziny fazy ciemnej poprzedzając o kilka godzin akrofazę rytmu aktywności AChE w szyszynce. Tę korelację rytmiki lokomotorycznej lub motorycznej z aktywnością AChE w pewnych okolicach OUN wykazali także: Wood i Rose (1979) w korze motorycznej szczura, Lewandowski (1983b) w tworze siatkowatym pnia mózgu myszy, Surowiak i Barbacka-Surowiak (1985) w podwzgórzu i układzie limbicznym, Czernek w przysadce myszy (dane nie opublikowane). Rytmika motoryczna tych zwierząt została w tych przypadkach wykorzystana jako odniesienie do wskazań tzw. zegara biologicznego. Jest ona podobnie jak rytmika głębokiej temperatury ciała (Connolly i Lynch, 1981) czy rytmika wrażliwości bólowej (Castellano i wsp., 1985) silnie sprzężona z rytmiką ośrodka sterującego rytmiką biologiczną, tj. zegarem biologicznym.

Rowe i wsp. (1981) określali formy molekularne AChE w komórkach szyszynki i neuronach sympatycznych zwoju szyjnego górnego dwudniowych szczurów w hodowlach komórkowych oddzielnych i wspólnych. Badania ich wykazały, że w hodowlach wspólnych (komórki szyszynki i neurony zwoju szyjnego górnego) aktywność AChE wzrastała z wiekiem kultur. Natomiast w hodowlach indywidualnych komórek szyszynki aktywność tego enzymu z wiekiem hodowli obniżała się, a w hodowlach neuronów zwoju szyjnego górnego praktycznie nie ulegała zmianie. Wcześniejsze badania Rowe i Parra (1980) wykazały, że w takich wspólnych kulturach aktywność cholinacetyltransferazy

(CAT) wzrastała w podobny sposób. Ponieważ jednak aktywność CAT stanowi indeks różnicowania się cholinergicznego w kokulturach neuronów sympatycznych (Johnson i wsp., 1980), wzrost aktywności AChE we wspólnych hodowlach komórkowych najprawdopodobniej odzwierciedla - zdaniem autorów - pewną interakcję pomiędzy cholinergicznymi różnicującymi się neuronami a ich tkanką docelową czyli komórkami szyszynki. Zatem, konkludują autorzy, w ich badaniach neurony sympatyczne są typem komórki, która oddziałuje na komórki szyszynki poprzez aktywność AChE.

Sposób, w jaki rytmy są synchronizowane z cyklicznie powtarzającą się fazą jasną i ciemną, nie jest jeszcze znany. Binkley i wsp. (1978) są zdania, że polega on na rytmicznej produkcji i uwalnianiu melatoniny. Zwraca się również uwagę na istnienie korelacji między zawartością monoamin (adrenaliny, noradrenaliny i serotoniny) w szyszynce a rytmią aktywności motorycznej, co ma świadczyć o udziale tych substancji w regulacji rytmiki (Cymborowski, 1984). Rola włókien cholinergicznym w szyszynce nie jest jednak dotąd wyjaśniona; być może biorą one udział u gryzoni (myszy, szczura) w przekazywaniu informacji o uwalnianiu melatoniny lub modulowaniu regulującego ten proces układu adrenergicznego.

LITERATURA

1. Beauregard G., Potier M., Roufogalis B.D., 1980, Modulation of erythrocyte acetylcholinesterase by cardiolipin: Effect of subunit coupling revealed by irradiation inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1290-1295.
2. Binkley S.A., Riebmán J.B., Rielly K.B., 1978, The Pineal Gland: A biological clock in vitro. *Science* 202, 1198-1201.
3. Binkley S.A., Bramner M., 1981, Development of daily cycles in the pineal gland. w: *Melatonin Rhythm Generating System*, Int. Symp. Bethesda Md. U.S.A., pp. 124-131.

4. Brainard G., Matthews S., Steger R., Reiter R., Asch R., 1984, Day/Night Variations of Melatonin, 5-Hydroxyindole, Acetic Acid, Serotonin, Serotonin NAT, Tryptophan, Norepinephrine and Dopamine in the Rabbit Pineal Gland. *Life Sci.* 35, 1615-1622.
5. Brimijoin S., 1983, Molecular Forms of Acetylcholinesterase in Brain, Nerve and Muscle. *Nature, Localization and Dynamics. Progr. Neurobiol.* 21, 291-322.
6. Castellano C., Puglisi-Allegra S., Renzi P., Oliverio A., 1985, Genetic Differences in Daily Rhythms of Pain Sensitivity in Mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 23, 91-92.
7. Connolly M.S., Lynch C.B., 1981, Circadian Variation of Strain Differences in Body Temperature and Activity in Mice. *Physiol. Behav.* 27, 1045-1049.
8. Cymborowski B., 1984, *Zegary biologiczne*. PWN, Warszawa.
9. Ellman G.L., Courtney K.D., Anders V., Featherstone R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
10. Halberg F., 1969, Resolving power of electronic computers in chronopathology - an analogy to microscopy. *Scientia* 101, 412-419.
11. Hoffman K., 1981, Photoperiodic function of the mammalian pineal gland, w: A. Oksche and P. Pevet, *The Pineal Gland: Photobiology-Biochronometry-Endocrinology*, Elsevier North Holland Biomedical Press, 123-138.
12. Johnson M.I., Ross C.D., Meyers M., Spitznagel E.L. and Bunge R.P., 1980, Morphological and biochemical studies on the development of cholinergic properties in cultured sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* 84, 680-691.
13. Lewandowski M., 1983a, Circadian changes of acetylcholinesterase activity in the reticular formation of the mouse brain under the influence of different light conditions with reference to locomotor activity. *Folia Biol. (Kraków)* 31, 53-64.

14. Lewandowski M., 1983b, Seasonal differences in circadian acetylcholinesterase activity in the brain stem reticular formation of the mouse. *Folia Biol. (Kraków)* 31, 373-379.
15. Malatova Z., Nicka A., Marsala J., 1980, Acetylcholinesterase activity and its molecular forms in selected regions of dogs nervous system. *Physiol. Bohemoslov.* 29, 415-422.
16. Malatova Z., 1983, Distribution of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the nervous system of the dog. *Physiol. Bohemoslov.* 32, 129-134.
17. Massoulie J., Bon S., Lazar M., Grassi J., Marsh D., Meflan K., Toutout J.P., Vallette F. and Vigny M., 1984, The polymorphism of cholinesterase, w: Cholinesterases, Walter de Gruyter Co. Berlin, N.Y. 73-79.
18. Muller F., Dumez Y., Massoulie J., 1985, Molecular Forms and Solubility of Acetylcholinesterase During the Embryonic Development of Rat and Human Brain. *Brain Res.* 331, 295-302.
19. Nambodiri M.A.A., Sudgen P., Klein D.C., Tamarkin L., Mefford I.N., 1985, Serum Melatonin and Pineal Indoleamine Metabolism in a Species with a Small Day/Night NAT Rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B, 731-736.
20. Quay W.B., Bennett E.L., Morimoto H., Marie H., 1971, Evidence for the absence of 24-hour rhythm in cholinesterase activities of brain regions. *Comp. Gen. Pharmacol.* 2, 402-410.
21. Reiter R.J., Hurlbut E.C., Esquifinio A., Champney T.H., Steger R.W., 1984, Changes in Serotonin Levels, N-Acetyltransferase Activity, Hydroxyindole-O-Methyltransferase Activity and Melatonin Levels in the Pineal Gland of the Richardson's Ground Squirrel in Relation to the Light-Dark Cycle. *Neuroendocrinology* 39, 356-360.
22. Reppert S.M., Coleman R.J., Heath H.W., Swedlow J.R., 1984, Pineal N-acetyltransferase Activity in 10-day old

- rats. A paradigm for studying the developing circadian system. *Endocrinology* 115, 918-925.
23. Rowe V., Fernandez H., Duell M., Parr J., Battie C., 1981, Molecular Forms of Acetylcholinesterase in Pineal Gland and Sympathetic Neuronal Cultures. *J. Neurochem.* 37, 861-866.
 24. Rowe V., Parr J., 1980, Pineal cells enhance choline acetyltransferase activity in sympathetic neurons. *J. Neurobiol.* 2, 547-556.
 25. Silver A., 1974, *The Biology of Cholinesterase*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam-Oxford.
 26. Skau K.A., 1985, Acetylcholinesterase Molecular Forms in Serum and Erythrocytes of Laboratory Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 80C, 207-210.
 27. Surowiak J., Barbacka-Surowiak G., 1985, Sezonnyje izmieniija sutocznoj ritmiki aktiwnosti acetylcholinesterazy w gyrus cinguli limbiczeskoj systemy i w gipotalamuisie myszej w usłowiach ST 12:12. *Probl. Chronobiol. Chronopatol. Chronofarmakol. Chronomed.* Ufa, I. 18-19.
 28. Tang F., Hadjiconstantinou M., Pang S.F., 1985, Aging and diurnal rhythms of pineal serotonin, 5-hydroxyindoloacetic acid, norepinephrine, dopamine and serum melatonin in the male rat. *Neuroendocrinology* 40, 160-164.
 29. Wood N., Rose S.P.R., 1979, Changes in Acetylcholinesterase with Light Exposure, Time of Day and Motor Activity in the Rat. *Behav. Neural. Biol.* 25, 379-389.

Sylwester Chyb

CIRCADIAN RHYTHM OF ACETYLCHOLINESTERASE (AChE) ACTIVITY
IN THE PINEAL GLAND OF THE MOUSE REARED IN LD 12:12

Summary

Circadian changes in acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7.) activity in the male mouse reared in LD 12:12 were studied.

The material was collected every 4 hours. AChE activity was assessed according to Ellman's method (Ellman et al., 1961) and expressed in μmol of the hydrolysed acetylthiocholine (ATCh) per minute per 1 g of the studied tissue.

A circadian rhythm of AChE activity with the period 23.07 hrs and acrophase at the beginning of the light phase was found. Simultaneously motor activity of animals (separately single or four in a cage) was recorded. In both cases rhythmicity of this phenomenon was revealed with differences concerned with period, median and acrophase of the rhythm. In the former case (single animal in a cage) period was shorter, median higher and acrophase occurred earlier in comparison with the latter case (four individuals in a cage).

Силвестер, Хыб

ОКОЛОСУТОЧНАЯ РИТМИКА АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРОЗА /AChE/
В ЭПИФИЗЕ МЫШИ, ВЫРАЩЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ЛД 12:12

Резюме

Исследованы околосуточные изменения активности ацетилхолинестероза /AChE, EC 3.1.7./ в эпифизе мыши, самцов, в условиях освещения ЛД 12:12. Материал для исследований брался каждые 4 часа в течение двух суток. Активность энзима определялась методом Элмана и др. /1961/, выражая ее в μmol гидролизованного субстрата в течение одной минуты на грамм свежей ткани.

Определено появление околосуточной ритмики активности AChE, период которой равнялся 23.07 часа, а акрофаза приходилась на начало суточной ясной фазы /8.26^h/.