

*Beata Sobocińska-Rodzoń**

Analiza okołodobowej aktywności esteraz cholinowych w wyniku zablokowania receptorów nikotynowych

Streszczenie

Analizowano okołodobowe zmiany aktywności acetylocholinoesterazy (AChE, EC 3.1.1.7.) w mózgu, mięśniu szkieletowym i mięśniu sercowym oraz cholinoesterazy (ChE, EC 3.1.1.8.) w wątrobie i nerkach myszy w wyniku działania chloru czteroetyloamoniowego (TEA).

Stwierdzono, że jednorazowe dawki blokera nikotynowego wpływają na desynchronizację rytmiki aktywności esteraz cholinowych w badanych narządach myszy, wyrażającą się w obniżeniu średniej aktywności oraz amplitudy rytmu, jak również przesunięciach fazowych rytmu.

Ponadto wykazano większą reaktywność samców myszy na działanie chlorku czteroetyloamoniowego.

Wstęp

Przeprowadzono wiele badań dotyczących okołodobowej aktywności acetylocholinoesterazy (AChE), stanowiącej enzym markerowy układu cholinergicznego (Lehman, Fibiger 1979). Quay i wsp. (1971) badali występowanie rytmiki 24-godzinnej aktywności AChE w różnych okolicach mózgu szczurów hodowanych pojedynczo lub po 2 osobniki w klatce. Autorzy stwierdzili, że tylko u szczurów hodowanych po 2 osobniki wystąpił wyraźny, 24-godzinny rytm aktywności AChE i to tylko w podwzgórzu i mózdz-

* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii WSP w Krakowie.

ku. Wood i Rose (1979) natomiast, badając zmiany aktywności AChE w obszarach kory motorycznej i wzrokowej szczurów hodowanych po 4–8 osobników w klatce i odnosząc je do aktywności motorycznej tych zwierząt, doszli do wniosku, że istnieje ścisła zależność pomiędzy aktywnością AChE w korze motorycznej i ich ogólną motoryczną aktywnością, co uwidacznia się szczególnie wyraźnie w warunkach stałej ciemności (DD).

Okołodobową rytmikę aktywności AChE wykazano również w podwzgórzu i zakręcie obręczy układu limbicznego (Surowiak i Barbacka-Surowiak 1985), w tworze siatkowatym pnia mózgu (Lewandowski 1983), w szyszynce (Chyb 1988, Świątkiewicz 1991) i w przysadce myszy (Czernek, dane nie publikowane).

Earnest i Turek (1985) analizowali rolę acetylocholin (ACh) w świetlnej kontroli rytmów okołodobowych aktywności lokomotorycznej i reprodukcyjnych cykli sezonowych u chomika złocistego, *Mesocricetus auratus*. Stosowali oni m.in. mecamlaminę, będącą cholinergicznym antagonistą receptorów nikotynowych, stwierdzając blokowanie przesunięć fazowych tego rytmu, mających wystąpić pod wpływem pulsów światła. Tym samym wykazali pośrednictwo acetylocholin w efektach przesunięć fazowych okołodobowego zegara ssaków, wywołanych błyskami światła.

Podobnie jak mecamlamina, również i chlorek czteroetyloamoniowy (TEA) stanowi obok heksametonium, kurary i d-tubokuraryny, silny bloker receptorów nikotynowych. Mechanizm jego działania polega na blokowaniu receptorów zwojowych, co uniemożliwia przeniesienie pobudzenia z włókna przedzwojowego na pozazwojowe.

Chlorek czteroetyloamoniowy inhibuje napięciowe i Ca^{2+} – sensytywne kanały K^+ (Henquin 1990, Jubelin i Kannan 1990, Takahashi i Berger 1990, Sims i wsp., 1990, Lin-Shiau i wsp. 1991, Patton i wsp. 1991, Bouskela i Grampp 1992, Anwer i wsp. 1992, Huba i wsp., 1992, Henderson i Dryer 1992, Shafer i Atchison 1992). Neurony traktowane TEA powodują w odpowiedzi depolaryzację membrany, wzmacniając równocześnie krótkotrwałą koncentrację wapnia w cytoplazmie, następującą poprzez napływ wapnia kanałów zależnych napięciowo (Zucker 1981). Wykazano jednak, iż powszechnie używany chlorek czteroetyloamoniowy zawiera ok. 5% zanieczyszczeń trietyloaminy. Związek ten podnosi pH cytoplazmy, redukuje międzykomórkową koncentrację wapnia przez krótkotrwałą depolaryzację membrany wynikającej z napływu jonów Ca^{2+} . Napływ wapnia jest nieefektywny, toteż zdolność komórek do krótkotrwałego buforowania jest redukowana. Efekty większej wewnętrznej transmisji wapnia są całkowicie wła-

ściwe obecnej w TEA słabej bazie trietyloaminy i można im zapobiegać poprzez jej usunięcie. Czysty chemicznie chlorek czteroetyloamoniowy jest zatem jedynie blokerem kanału potasowego i inhibitorem pompy Na^+-K^+ (Bauer i wsp. 1990, Hasunuma i wsp. 1990, Blatt 1992, Carryl i wsp. 1992, Duan i wsp. 1992, Friedman i wsp. 1992, Marijic i wsp. 1992, Matalon i wsp. 1992, Nilius i Wohlrab 1992, Purali i Rydgvist 1992, Welling i wsp. 1992, Witkowski i Micklem 1992).

Przedstawiony przegląd badań rzuca światło na ich ogromną istotność dla poznania wewnętrznych mechanizmów fizjologicznych organizmu, ściśle zsynchronizowanych między sobą i otoczeniem. Równocześnie inspiruje do podjęcia wysiłków w celu wyjaśnienia zmian okołodobowej aktywności acetylocholinoesterazy i cholinoesterazy myszy powstałych w wyniku działania nikotynowego blokera receptorów cholinergiczných, jakim jest chlorek czteroetyloamoniowy.

Material i metody badań

Do badań użyto łącznie 240 osobników (w tym 120 samic i 120 samców) myszy białej (*Mus musculus* L.) szczepu Swiss, pochodzących z chowu wsobnego, o średniej wadze 28g. Zwierzęta hodowano w jednakowych warunkach pod względem oświetlenia LD 12:12 (początek światła godz. 8.00) i żywiono pokarmem standardowym, tj. paszą granulowaną i wodą podawaną *ad libitum*.

Zwierzęta obu płci podzielono na grupy kontrolne i eksperymentalne, po 10 osobników każda. Mysiom grup eksperymentalnych podawano domięśniowo chlorek czteroetyloamoniowy (TEA) w dawce 5 mg/kg wagi ciała. Jednorazowe iniekcje odbywały się 6 razy na dobę, w stałych odstępach czasowych, tj. o godz.: 4.00, 8.00, 12.00, 16.00, 20.00 i 24.00. Zwierzęta zabijano przez dekapitację po 2 godzinach od momentu podania blokera nikotynowego, tj. o godz.: 6.00, 10.00, 14.00, 18.00, 22.00 i 2.00. Następnie preparowano: mózg, mięsień szkieletowy uda (m. *gracilis*) mięsień sercowy, wątrobę i nerki. Wypreparowane narządy przepłukiwano w roztworze soli fizjologicznej (0,9% rozt. NaCl), po czym odważano po 100 mg mięśnia szkieletowego, mięśnia sercowego, wątroby i nerek oraz ustalano wagę całego mózgu. Tkanki umieszczano w 3 ml schłodzonego buforu fosforanowego o pH 8, a następnie poddawano homogenizowaniu w homogenizatorze teflonowym przez okres 1, 2, 2,5 min. w zależności od rodzaju tkanki.

Z kolei do homogenatów mięśnia szkieletowego, mięśnia sercowego, wątroby i nerek dodawano po 2 ml zimnego buforu fosforanowego o pH 8, w przypadku natomiast mózgu rozcieńczano homogenat do tego stopnia, aby uzyskać proporcję 100 mg tkanki na 5 ml buforu. Otrzymane homogenaty wirowano przez 15 min. przy prędkości 14.000 obr./min. Po odwirowaniu oznaczano w supernatantach mózgu, mięśnia szkieletowego i mięśnia sercowego aktywność acetylocholinoesterazy (AChE, EC 3.1.1.7.) oraz aktywność cholinoesterazy (ChE, EC 3.1.1.8.) w supernatantach wątroby i nerek, kolorymetryczną metodą Ellmana i wsp. (1961).

Substratem był jodek acetylotiocholiny. Powstająca w wyniku jego hydrolizy tiocholina, reagując z dodanym do homogenatu DTNB (5,5-ditiobis-2-nitro-benzoesanem) dawała żółte zabarwienie, którego intensywność była wprost proporcjonalna do ilości rozłożonej przez substrat acetylotiocholiny, a tym samym do aktywności enzymu zawartego w homogenacie.

Pomiaru ekstynkcji dokonywano w czasie 1 min., przy długości fali wynoszącej 412 mμ, po czym obliczano szybkość hydrolizy substratu, korzystając ze wzoru:

$$R = \frac{\Delta A}{1,36 \times 10^{-4}} \times \frac{1}{(400 / 3120) C_0} = 5 \times 74 \times 10^{-4} \frac{\Delta A}{C_0}$$

gdzie: R – szybkość hydrolizy substratu w mol/min./gram tkanki

ΔA – zmiany ekstynkcji/min.

C₀ – pierwotne stężenie tkanki (mg/ml)

Uzyskane wyniki przeliczono na μmol/min./g tkanki, a następnie opracowano statystycznie posługując się analizą wariancji oraz metodą najmniejszych kwadratów Halberga (1969), wyrażoną jako cos badanej funkcji w odniesieniu do wszystkich wyników będących funkcją czasu. Analiza ta pozwala na obliczenie amplitudy zmian (c), akrofazy, czyli wartości maksymalnej badanych zmian (φ), wartości średniej (C₀), częstotliwości kątowej (ω) oraz błędu standardowego (SE). Zaś krzywa sinusoidalna opisana wzorem: E(t) = C₀ + C_{cos} (ω t + φ) charakteryzuje przebieg zmian badanego procesu na skali czasu (Monk, Fort 1981).

Wyniki

Dane dotyczące wpływu jednorazowego podania chlorku czteroetyloamoniowego (TEA) na zmiany okołodobowej aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) w mózgu, mięśni szkieletowym uda i mięśni sercowym oraz cholinoesterazy (ChE) w wątrobie i nerkach myszy zilustrowano graficznie (ryc. 1–10).

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że jednorazowe podanie blokera nikotynowego wpływa desynchronizująco na rytm okołodobowej aktywności obu esteraz cholinowych w badanych narządach myszy.

Procent rytmiki aktywności acetylocholinoesterazy zostaje najwyraźniej obniżony w mięśni sercowym samic (8,07%) i w mózgu samców (21,88%), natomiast cholinoesterazy w wątrobie (49,88% ♀ i 37,92% ♂) zwierząt obu płci.

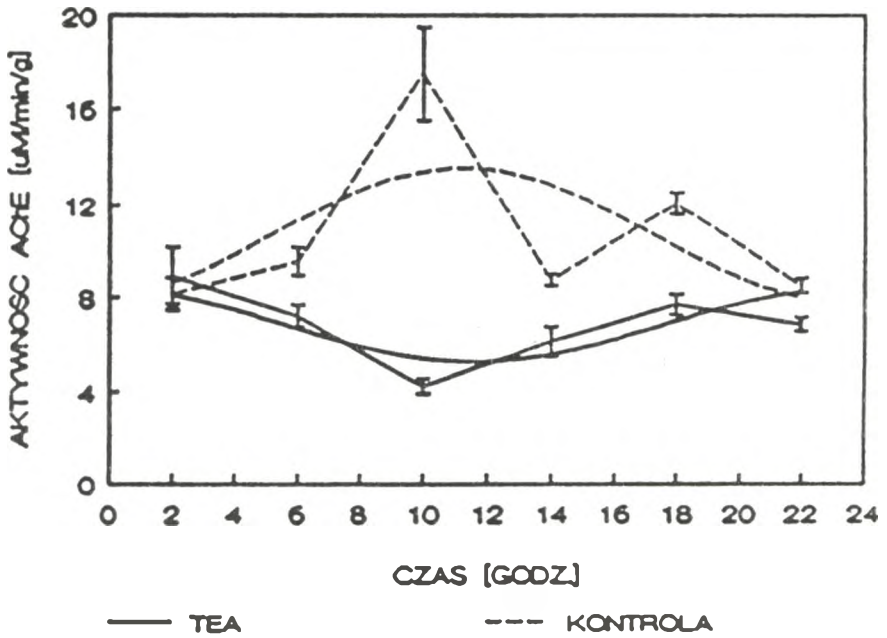
Równocześnie zmianie uległy poszczególne parametry rytmu, tj.: średnia, amplituda i akrofaza, podczas gdy okres z założenia doświadczenia był stały i wynosił 24 godziny.

Średnia aktywność okołodobowej rytmiki esteraz cholinowych generalnie uległa obniżeniu (wyjątek stanowi mięsień szkieletowy uda i wątroba ♂), przy czym najistotniejsze zmiany zanotowano w mózgu (AChE) myszy obu płci oraz w wątrobie (ChE) samic i nerkach (ChE) samców.

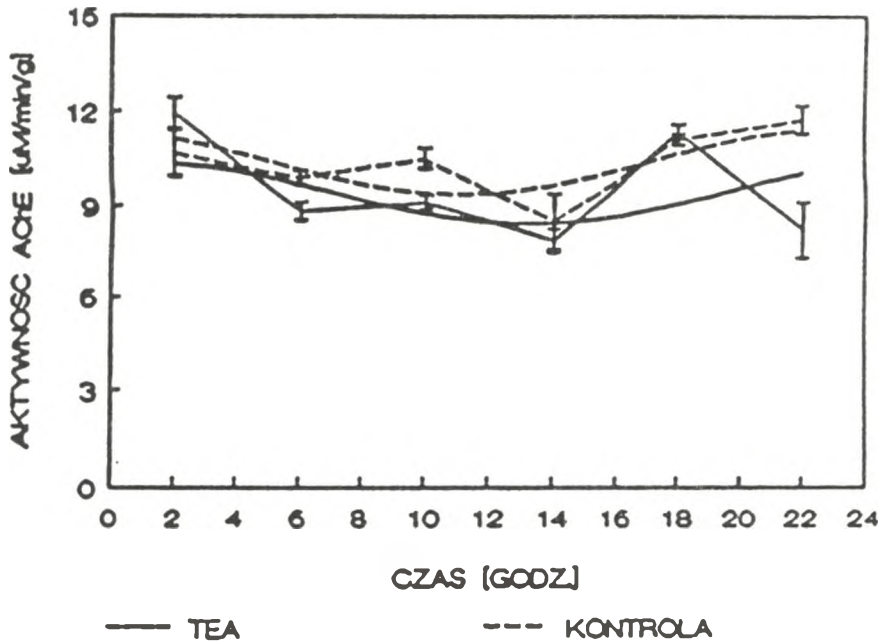
Jednocześnie wykazano spadek amplitudy rytmu we wszystkich badanych narządach myszy, najbardziej znamienne w mózgu i mięśni sercowym samic (AChE) oraz wątrobie (ChE) zwierząt obu płci.

Istotnym różnicowaniem ulega również wartość maksymalna określonego rytmu. Mianowicie we wszystkich narządach ma miejsce przesunięcie fazy rytmu, zaś w mózgu samic jego całkowite odwrócenie, bowiem akrofaza ulega przesunięciu z godz. ok. 11.00 na godz. ok. 23.00.

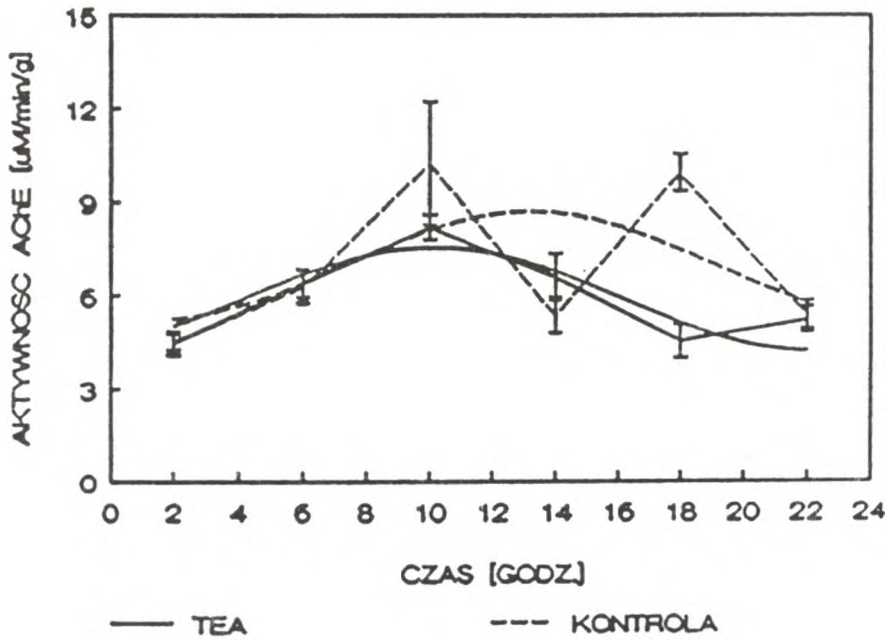
Ponadto stwierdzono różną wrażliwość poszczególnych narządów na działanie chlorku czteroetyloamoniowego w zależności od punktu czasowego rytmu. I tak w przypadku samic najistotniejsze obniżenie poziomu acetylocholinoesterazy przypadło na godz. 10.00 w mózgu i mięśni sercowym oraz na godz. 18.00 w mięśni szkieletowym uda. Również w wątrobie i nerkach godz. 18.00 okazała się najbardziej newralgicznym okresem wpływu TEA na aktywność cholinoesterazy. Natomiast w przypadku samców poziom aktywności AChE uległ największej zmianie o godz. 22.00 w mózgu oraz o godz. 14.00 w mięśni szkieletowym i sercowym, zaś ChE w wątrobie o godz. 2.00, a w nerkach o godz. 22.00.



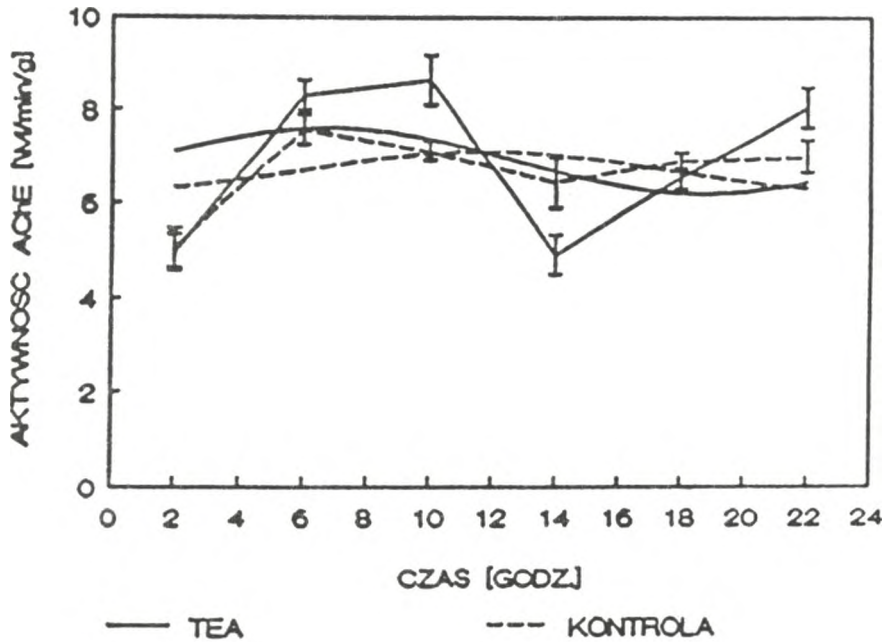
Ryc. 1. Wpływ TEA na zmiany aktywności AChE w mózgu samic myszy



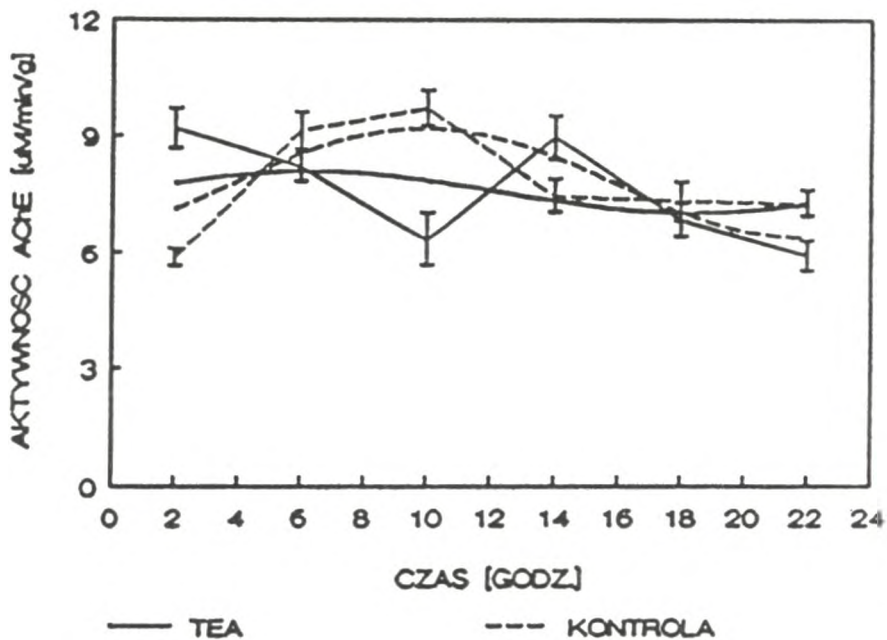
Ryc. 2. Wpływ TEA na zmiany aktywności AChE w mózgu samców myszy



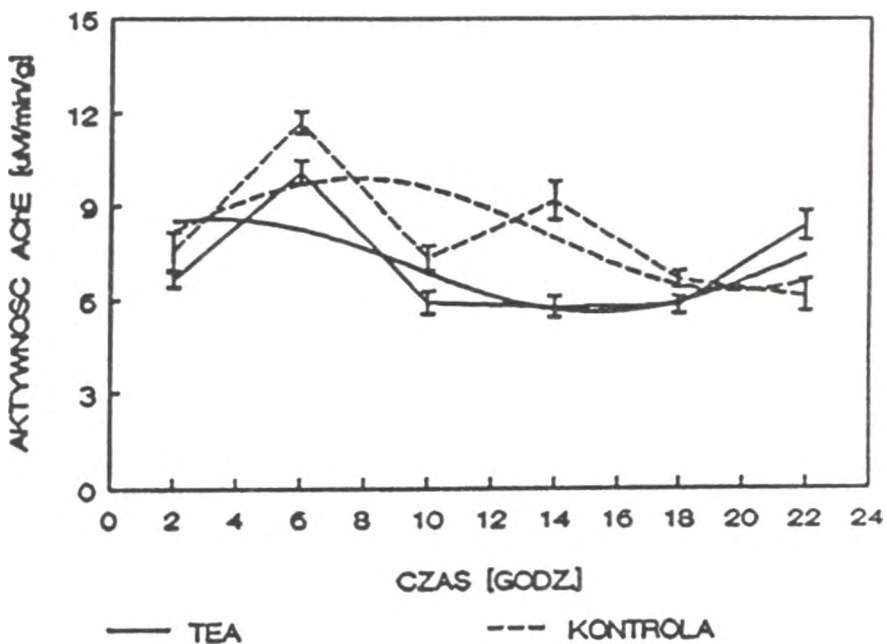
Ryc. 3. Wpływ TEA na zmiany aktywności AChE w m. szkieletowym samic myszy



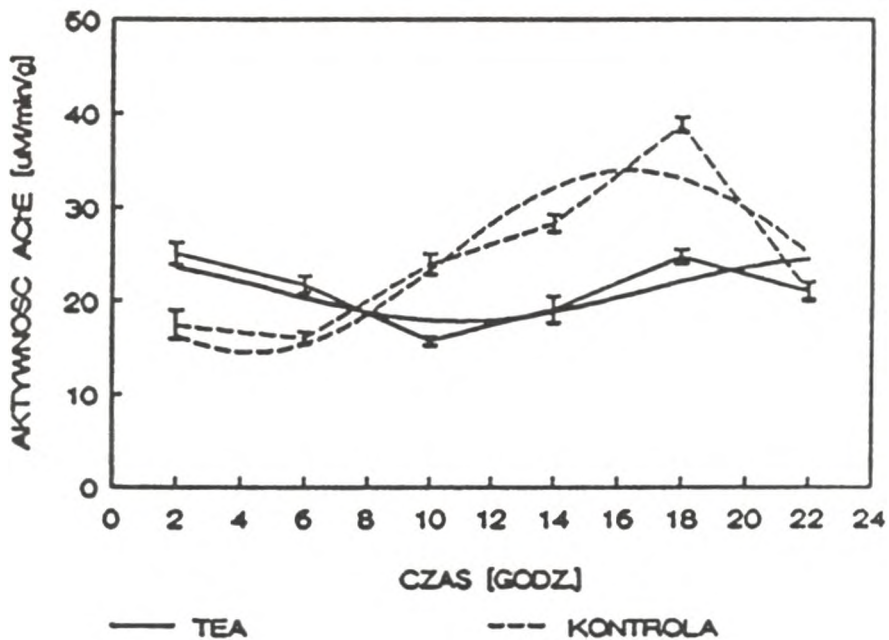
Ryc. 4. Wpływ TEA na zmiany aktywności AChE w m. szkieletowym samców myszy



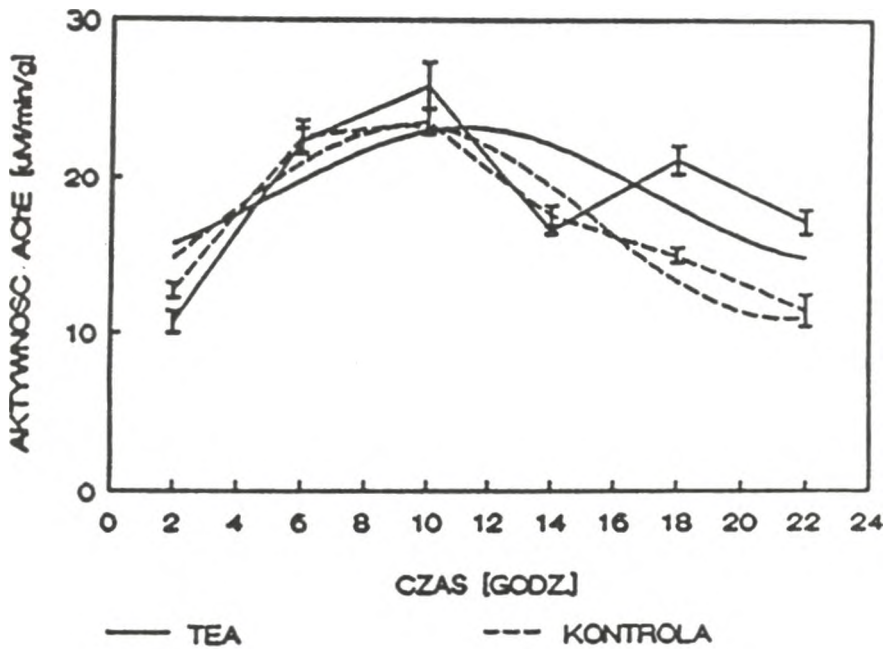
Ryc. 5. Wpływ TEA na zmiany aktywności AChE w m. sercowym samic myszy



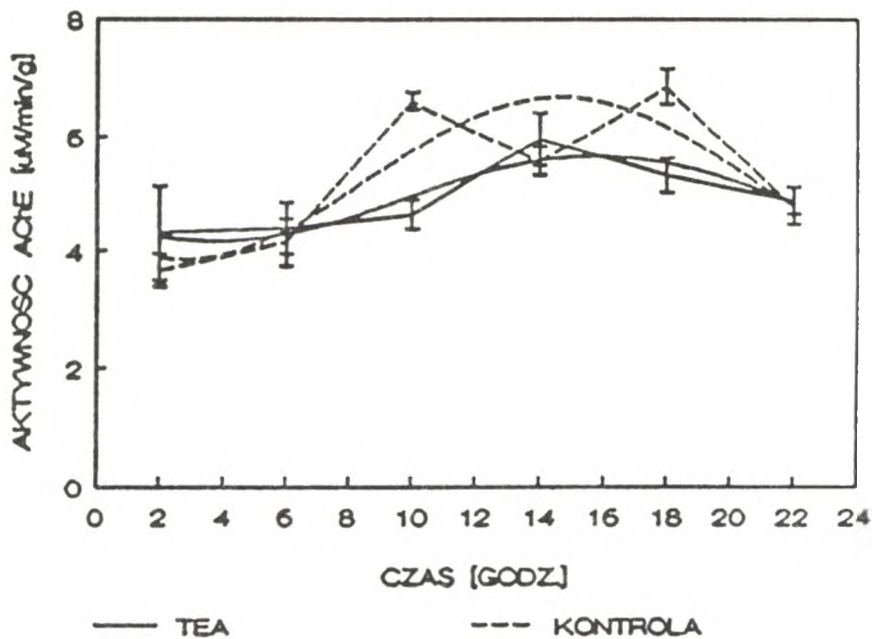
Ryc. 6. Wpływ TEA na zmiany aktywności AChE w m. sercowym samców myszy



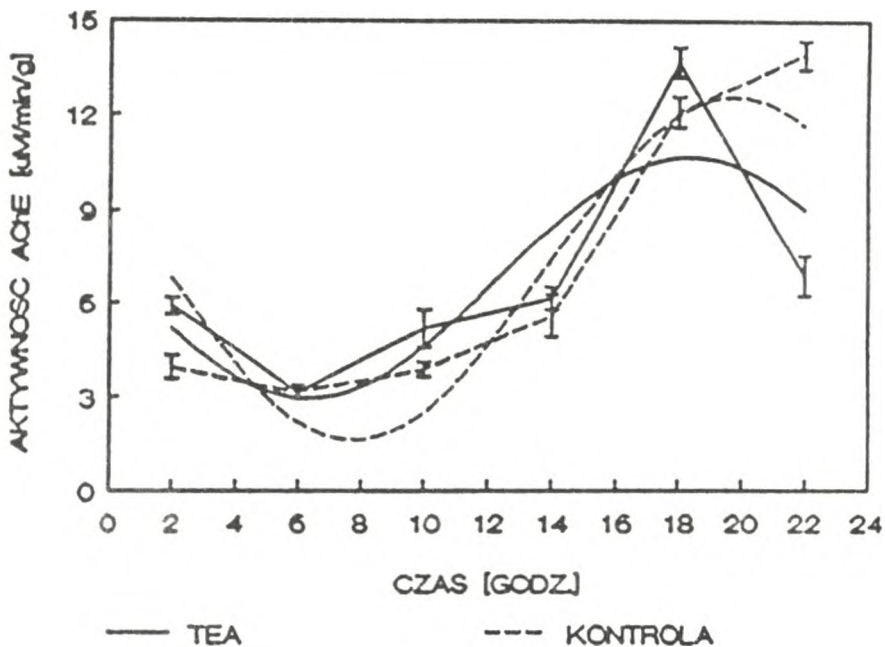
Ryc. 7. Wpływ TEA na zmiany aktywności ChE w wątrobie samic myszy



Ryc. 8. Wpływ TEA na zmiany aktywności AChE w wątrobie samców myszy



Ryc. 9. Wpływ TEA na zmiany aktywności ChE w nerce samic myszy



Ryc. 10. Wpływ TEA na zmiany aktywności ChE w nerce samców myszy

Równocześnie wykazano, że procentowa aktywność acetylocholinoesterazy w efekcie działania chlorku czteroetyloamoniowego jest najniższa w mózgu samic (24,2%) oraz mięśniu sercowym samców (63,2%), zaś aktywność cholinoesterazy w wątrobie samic (63,8%) i w nerkach samców (49,3%).

Dyskusja

Przeprowadzona analiza uzyskanych wyników wykazała, że jednorazowe dawki chlorku czteroetyloamoniowego wywołują istotne zmiany w przebiegu okołodobowego rytmu aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) w mózgu, mięśniu szkieletowym uda i mięśniu sercowym oraz rytmiki aktywności cholinoesterazy (ChE) w wątrobie i nerkach myszy w stosunku do warunków fizjologicznych.

Zmiany te wyrażają się w generalnym obniżeniu aktywności esteraz cholinowych w ciągu doby, co świadczy o zmianie natężenia procesów biochemicznych zachodzących w badanych narządach.

Podawany chlorek czteroetyloamoniowy jest czwartorzędową solą amoniową, która wiążąc się z receptorami białkowymi synaps nerwowych w zwojach autonomicznych blokuje je, nie pozwalając na dołączenie się do nich acetylocholinoesterazy z zakończeń nerwowych przedzwojowych i współzawodniczy z nią o miejsce w swoistym receptorze. Jak donosi Paton (1951) ten „blok przez współzawodnictwo” oznacza, iż czynność acetylocholinoesterazy w zwoju jest uniemożliwiona przez środek, który sam przez się nie jest czynny. Wykazano, że drażnienie nerwów przedzwojowych powoduje normalne wydzielanie się acetylocholinoesterazy w zwojach, lecz hormon ten nie może pobudzać komórek nerwowych zwojów (Supniewski 1966, Kubikowski, Kostowski 1979). TEA będąc lekiem ganglioplegicznym silniej oddziałuje na zwoje współczulne niż na przywspółczulne. Jego działanie jest długotrwałe, gdyż powoli rozpada się on w ustroju. Konsekwencją tego jest utrudnienie wydalania soli sodowych i potasowych z moczem, bowiem związanie ACh przez receptor powoduje zmianę przepuszczalności błony postsynaptycznej dla jonów Na^+ i K^+ (Skangiel-Kramska 1989).

W wyniku zahamowania czynności esteraz cholinowych w organizmie nagromadza się endogenna acetylocholinoesteraza, której przedłużony czas działania zmienia normalną regulację neurohormonalną.

Znajduje to swoje odbicie w zaburzeniach prawidłowej czynności wielu narządów i układów. O przebiegu zatrucia decydują zwłaszcza zmiany w ukła-

dach krążenia i oddechowym, ponieważ oba te układy pośredniczą w usuwaniu metabolitów oraz dostarczaniu substancji odżywczych i tlenu dla ciągle zmieniających się potrzeb ustroju.

Zaburzenie relacji między acetylocholiną a acetylocholinoesterazą powoduje wzmożone napięcie układu przywspółczulnego (Giermaziak 1989). Acetylocholina nasilając m.in. czynność ruchową mięśni, zwalnia jednocześnie procesy glikolizy, a w warunkach niedotlenienia zatrzymuje je na etapie przemian beztlenowych, co upośledza również odbudowę potencjałów czynnościowych (Patyra 1976).

Równocześnie Michejda (1985) sugeruje, iż kanał sodowy receptora nikotynowego może być regulowany egzogenną fosforylacją przez ATP wydzielany w czasie neurotransmisji wraz z acetylocholiną. Zaś chlorek czteroeetyloamoniowy jest odpowiedzialny za skrócenie okresowego wyrzutu K^+ w rytmie okołodobowym (Kondo 1990).

Tego typu mechanizmom odpowiadają uzyskane gwałtowne spadki dobowej aktywności acetylocholinoesterazy w mózgu myszy w wyniku podania TEA, związane z zaburzeniami procesu glikolizy. Dla organizmu niezwykle ważna jest bowiem stałość poziomu glukozy i to nie tylko dla całego metabolizmu, lecz przede wszystkim dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego, którego działanie odbywa się kosztem energii zdobywanej wyłącznie z rozpadu glukozy.

Obniżenie dobowej aktywności acetylocholinoesterazy w mózgu myszy dowodzi jednocześnie możliwości przechodzenia blokerów nikotynowych poprzez barierę krew-mózg. W ten sposób TEA dociera do nerwów i aksonów jąder nadskrzyżowaniowych (SCN – stanowiących obok jąder brzuszno-przyśrodkowych-VMH centralny oscylator zegara biologicznego ssaków, Moore-Ede i wsp. 1982), wzmacniając działanie acetylocholino, odgrywając doniosłą rolę w mechanizmie generacji rytmów (Gross i wsp. 1983).

Wykazano ponadto (Pojda 1975), że światło zwiększa aktywność acetylocholinoesterazy, jednocześnie uwalniając acetylocholinę z siatkówki co związane jest z okołodobową aktywnością lokomotoryczną zwierząt. Podkreśla się bowiem mniejszą zawartość AChE w mózgu w okresie aktywności lokomotorycznej i zwiększoną w czasie snu.

Znalazło to swoje potwierdzenie w prowadzonych badaniach dotyczących okołodobowych zmian rytmiki aktywności enzymu. Badania chronobiologiczne przeprowadzone na ssakach wykazały, że w mózgu tych zwierząt poziom neurotransmiterów, jak również aktywność enzymów ich syntezy i hydrolizy wykazują zmiany o charakterze rytmów okołodobowych

(Naber i wsp. 1981, Wirz-Justice 1987). Okołodobowe rytmy aktywności ACh i AChE w mózgu ssaków wykazują ponadto regionalne różnice w swoim przebiegu.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w warunkach oświetlenia LD 12:12 akrofaza aktywności AChE w mózgu samców myszy przypada na godz. ok. 23.00 w okresie fazy ciemnej, u samic natomiast w okresie fazy jasnej na godz. ok. 11.00.

Rezultaty te odbiegają od uzyskanych oznaczeń aktywności enzymu w szyszynce samców myszy, gdzie akrofaza rytmu przypada na środek fazy ciemnej (Chyb 1988, Świątkiewicz 1991), jak również w pniu mózgu (Lewandowski 1983) w podwzgórzu i zakręcie obręczy (Surowiak, Barbaccka-Surowiak 1985), w których akrofaza aktywności AChE przypada na przełom fazy jasnej i ciemnej lub początek fazy ciemnej.

Różnice te łączą się przypuszczalnie z samą procedurą prowadzonych badań. Oznaczenia bowiem aktywności enzymu dokonywano w homogenacie mózgu, co wpłynęło na uśrednienie wyniku, stanowiącego wypadkową aktywności AChE w poszczególnych strukturach mózgu.

W pozostałych analizowanych narządach myszy nie zaobserwowano większych różnic płciowych w okresie występowania akrofazy aktywności rytmu. I tak w mięśniach szkieletowym i sercowym oraz w wątrobie samców przypada ona na początek fazy jasnej, a w wątrobie samic i nerkach zwierząt na jej koniec.

W porównaniu z rytmem aktywności esteraz cholinowych myszy hodowanych w warunkach fizjologicznych, podanie blokera receptorów nikotynowych układu cholinergicznego powoduje znaczne przesunięcie fazy tego rytmu, obniżenie jego amplitudy i wartości średniej.

Według niektórych autorów (Civen, Leeb 1980) inhibicja acetylocholinesterazy może wpływać także na sterydogenezę w wyniku zwiększonego uwalniania ACTH, co tłumaczyć może w pewnym stopniu różnice poziomu aktywności enzymu wywołane działaniem chlorku czteroetyloamoniowego u samic i samców myszy.

Różnice w działaniu TEA na poszczególne tkanki wynikają natomiast z ilości i gęstości miejsc receptorowych w badanych narządach. Wykazano bowiem, iż w ośrodkowym układzie nerwowym gęstość cholinergicznym receptorów nikotynowych jest w zasadzie zgodna z rozmieszczeniem zakończeń cholinergicznym, zaś w obrębie płytki końcowej wynosi ok. 3×10^7 na $1 \mu\text{m}^3$ błony komórkowej. Równocześnie stwierdzono, że liczba receptorów jest zmienna w ciągu doby i wówczas gdy wzrasta bądź maleje, efektywność

blokady cholinergicznej jest także wzmożona bądź osłabiona (Pan Si-Yuan 1992).

Z powyższych rozważań można wnosić o desynchronizującym działaniu chlorku czteroetyloamoniowego na okołodobową aktywność esteraz cholinowych myszy.

Zwraca także uwagę zróżnicowane działanie blokera nikotynowego na poszczególne narządy myszy w różnych punktach czasowych doby oraz wyższa reaktywność samców pozostających pod wpływem TEA.

Literatura

- Anwer K., Toro L., Oberti C., Stefani E., Sanborn B.M., 1992, *Ca* (2^+)-activated *K*⁺ channels in pregnant rat myometrium: modulation by a beta-adrenergic agent, *Am. J. Physiol.*, 263/5 Pt 1/C 1049–1056.
- Bauer C.K., Meyerhof W., Schwarz J.R., 1990, *An inward-rectifying K⁺ current in clonal rat pituitary cells and modulation by thyrotrophinreleasing hormone*, *J. Physiol., Lond.*, 429:169–189.
- Blatt M.R., 1992, *K⁺ channels of stomatal guard cells. Characteristic of the inward rectifier and its control by pH*, *J. Gen. Physiol.*, 99(4) 615–644.
- Bouskela E., Grampp W., 1992, *Spontaneous vasomotion in hamster cheek pouch arterioles in varying experimental conditions*, *Am. J. Physiol.*, 262 (2 pt 2): H 478–485.
- Carryl O.R., Gallardo-Carpentier A., Carpentier R.G., 1992, *Effects of nicotine and ethanol on rat atrial membrane potentials*, *Alcohol*. 9(2): 87–92.
- Chyb S., 1988, *Okołodobowa rytmika aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) w szyszynce myszy hodowanych w warunkach LD 12:12*, w: *Prace Fizjologiczne I*, *Rocz. Nauk.-Dydakt. WSP w Krakowie*, z. 118, 81–94.
- Civen M., Leeb J., 1980, *Effects of low level administration of dichlorvos on adrenocorticotrophic hormone secretion, adrenal cholesteryl ester and steroid metabolism*, *Biochem. Pharmacol.*, 29, 635.
- Duan D.Y., Fermini B., Nattel S., 1992, *Sustained outward current observed after I (tol) inactivation in rabbit atrial myocytes is a novel Cl⁻ current*, *Am. J. Physiol.*, 263/6 Pt 2/H 1967–1971.
- Earnest D.J., Turek F.W., 1985, *Neurochemical basis for the photic control of circadian rhythms and seasonal reproductive cycles: Role for acetylcholine*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4277–4281.

- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr.V., Featherstone R.M., 1961, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88–95.
- Friedman A., Arens J., Heinemann U., Gutnick M.J., 1992, *Slow depolarizing afterpotentials in neocortical neurons are sodium and calcium dependent*, *Neurosci. Lett.*, 135(1): 13–17.
- Giermaziak H., 1989, *Zmiany narządowe u królików i szczurów w przebiegu za-trucia związkami fosforotioalifatycznym*, *Med. Pracy*, XL, 2: 69–79.
- Groos G., Mason R., Mejer J., 1983, *Electrical and pharmacological properties of the suprachiasmatic nuclei*, *Fed. Proc.*, 42: 2790–2795.
- Hasunuma K., Rodman D.M., O'Brien R.F., Mc Murtry I.F., 1990, *Endothelin 1 causes pulmonary vasodilation in rats*, *Am. J. Physiol.*, 259/1 Pt 2:H 48–54.
- Henderson D., Dryer S.E., 1992, *Voltage-and Ca(2⁺)-activated ionic currents in acutely dissociated cells of the chick pineal gland*, *Brain Res.*, 572(1–2): 182–189.
- Henqun J.C., 1990, *Role of voltage-and Ca²⁺(+)-dependent K⁺ channels in the control of glucose- induced electrical activity in pancreatic B-cells*, *Pflugers-Arch.*, 416(5): 568–572.
- Huba R., Schneider H., Hofmann H.D., 1992, *Voltage-gated currents of putative GABAergic amacrine cells in primary cultures and retinal slice preparations*, *Brain Res.*, 577(1): 10–18.
- Jubelin B.C., Kannan M.S., 1990, *Neurons from neonatal hypertensive rats exhibit abnormal membrane properties in vitro*, *Am. J. Physiol.*, 259 (3 Pt 1):C 389–396.
- Kondo T., 1990, *Shortening of the period of the circadian rhythm by a K⁺ channel bloker, tetraethylammonium, in the duckweed *Lerana gibbo* 3*, *J. Biol. Rhythms.*, 5(3): 187–194.
- Kubikowski P., Kostowski W., 1979, *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*, PZWL, Warszawa.
- Lehman J., Fibiger H.C., 1979, *Acetylcholinesterase and the cholinergic neurons*, *Life Sci.*, 25: 1939–1947.
- Lewandowski M., 1983, *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.
- Lewandowski M., 1983, *Seasonal differences in circadian acetylcholinesterase activity in the brain stem reticular formation of the mouse*, *Folia Biol. (Kraków)*, 31: 373–379.

- Lin-Schiau S.Y., Day S.Y., Fu W.M., 1991, *Use of ion channel blockers in studying the regulation of skeletal muscle contractions.*, *Naunyn-Schmiedebergs-Arch-Pharmacol.*, 344(6): 691–697.
- Marijick J., Buljubasic H., Coughlan M.G., Kampine J.P., Bosnjak Z.J., 1992, *Effect of K⁺ channel blockade with tetraethylammonium on anesthetic-induced relaxation in canine cerebral and coronary arteries.* *Anesthesiology*, 77(5): 948–955.
- Matalon S., Kirk K.L., Bubien J.K., Oh J., Hu P., Yue G., Shoemaker R., Cragoe E.J., 1992, *Immunocytochemical and functional characterization of Na⁺ conductance in adult alveolar pneumocytes*, *Am. J. Physiol.*, 262 (5 Pt 1):C 1228–1238.
- Michejda J., 1985, *Szczególne procesy komórkowe*, w: *Podstawy cytofizjologii*, red. Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoń J., PWN, Warszawa.
- Monk T.H., Fort A., 1981, „Cosina”: *cosine curve fitting program suitable for small computers*, *J. Chronobiologie*, vol. 8, No 4, 193–206.
- Moore-Ede M.C., Sulzman F.M., Fuller C.A., 1982, *The clock that time us*, Harvard University Press.
- Naber D., Wirz-Justice A., Kafka M.S., 1981, *Circadian rhythm in rat brain opiate receptor*, *Neurosc. Lett.*, 21: 45–50.
- Nilius B., Wohlrab W., 1992, *Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells*, *J. Physiol. Lond.*, 445: 537–48?.
- Pan Si-Yuan, 1992, *Circadian effects of scopolamine on memory, exploratory behavior, and muscarinic receptors in mouse brain*, *Acta Pharmacologica Sinica*, 13(4): 323–326.
- Paton W.D.M., 1951, *The paralysis of autonomic ganglia with special reference to the therapeutic effects of ganglion-blocking drugs*, *Brit. med. J.*, I, 773–778.
- Patton L., Ship J., Wellner R., 1991, *N-/-6-aminohexyl/-5-chloro-1-naphtalenesulfonamide (W7) stimulation of K⁺ transport in a human salivary epithelial cell line*, *Biochem. Pharmacol.*, 42(5): 1039–1044.
- Patyra S., 1976, *Wpływ pestycydów fosforoorganicznych na układ sercowo-naczyniowy i oddechowy u zwierząt*, *Med. Wet.*, XXXII, 10: 612–614.
- Pojda S.M., 1975, *Zawartość acetylocholiny i aktywność acetylocholinoesterazy w siatkówce szczurów z hiperlipemią doświadczalną*, *Klin. Oczna*, 45: 1273–1276.
- Purali N., Rydgvist B., 1992, *Block of potassium outward currents in the crayfish stretch receptor neurons by 4-aminopyridine, tetraethylammonium chloride and some other chemical substances*, *Acta Physiol. Scand.*, 146(1): 67–77.

- Quay W.B., Bennett E.L., Morimoto H., Herbert M., 1971, *Evidence for the absence of 24-hour rhythms in cholinesterase activities of brain regions*, Comp. Gen. Pharm., 2: 402–410.
- Shafer T.J., Atchison W.D., 1992, *Effects of methylmercury on perineurial Na and Ca (2⁺)-dependent potentials at neuromuscular junctions of the mouse*, Brain Res., 595(2): 215–219.
- Sims S.M., Vivaudou M.B., Hillenmeier C., Biancani P., Walsh J.V.Jr., Singer J.J., 1990, *Membrane currents and cholinergic regulation of K⁺ current in esophageal smooth muscle cells*, Am. J. Physiol., 258 (5 Pt 1): G 794–802.
- Skangiel-Kramska J., 1989, *Budowa cholinergicznego receptora nikotynowego (AChR)*, w: *Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*, red. Przewłocka B., PAN, Inst. Farmakol. w Krakowie, Ossolineum.
- Supniewski J., 1966, *Farmakologia*, PZWL, Warszawa.
- Surowiak J., Barbacka-Surowiak G., 1985, *Sezonnyje izmienienija sutocznoj ritmiki aktiwnosti acetylochoinesterazy w gyrus cinguli limbiczeskoj sistemy i w gipotalamusie myszej w usłowiach ST 12:12*, Probl. Chronobiol. Chronopatol. Chronofarmacol. Chronomed., Ufa, I, 18–19.
- Świątkiewicz G., 1991, *Wpływ stałej ciemności przerywanej 15-minutowym okresem światła na okolodobową rytmikę aktywności acetylocholinoesterazy w szyzynie myszy oraz na rytmikę aktywności lokomotorycznej*, w: *Prace Fizjologiczne II*, Roczn. Nauk.-Dydakt., WSP w Krakowie, z. 140: 157–178.
- Takahasi T., Berger A.J., 1990, *Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin*, J. Physiol. Lond., 423: 63–76.
- Welling A., Felbel J., Peper K., Hofmann F., 1992, *Hormonal regulation of calcium current in freshly isolated airway smooth muscle cells*, Am. J. Physiol., 262 (3 Pt 1):L 351–359.
- Wirz-Justice A., 1987, *Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors*, Progress in Neurobiology, 29: 219–259.
- Witkowski J.M., Micklem H.S., 1992, *Transmembrane electrical potential of lymphocytes in ageing mice. Flow cytometric analysis of mitogen-stimulated cells*, Mech. Ageing. Dev., 62(2): 167–179.
- 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: 79–89.
- Zucker R.S., 1981, *Tetraethylammonium contains as impurity which alkalizes cytoplasm and reduce calcium buffering in neurons*, Brain Res., 208: 473–478.

Analysis Entire Day of Cholinesterase Activity as a Result of Blocking Nicotine Receptors

Summary

Changes were analyzed throughout the day in the activity of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7.) in the brain, skeletal muscles and heart muscles and of cholinesterase (ChE, EC 3.1.1.8.) in the liver and kidneys of mice as a result of tetraethylammonium chloride (TEA) activity.

Single doses of nicotine blocker were found to influence the desynchronization of the rhythmicity of cholinesterase activity in the examined organs of mice, expressed by reduction in average activity and rhythm amplitude, as well as phase shifting of the rhythm.

Furthermore, a greater reactivity to tetraethylammonium chloride was found in male mice.