SİNİR AJANLARI MARUZİYETİNDE KOLİNESTERAZ ENZİMİNİN TANISAL DEGERİ

Dr. Erdim Sertoğlu

Danisman: Prof.Dr. Levent Kenar

İÇERİK

- Enzim (ler) Hakkında Genel Bilgiler
- Eritrosit-Serum Enzim Farkları
- Ölçüm Teknikleri – Bu ölçümü bizim lab.da nasıl kullanırız ?
- Hastaneye yatış ve taburcudaki rolü
- Klinikle uyumu - Başka olaylarda Tanısal Değeri var mı ? - Yayınlar

ENZİM(LER) HAKKINDA GENEL BİLGİLER

KOLİNESTERAZ

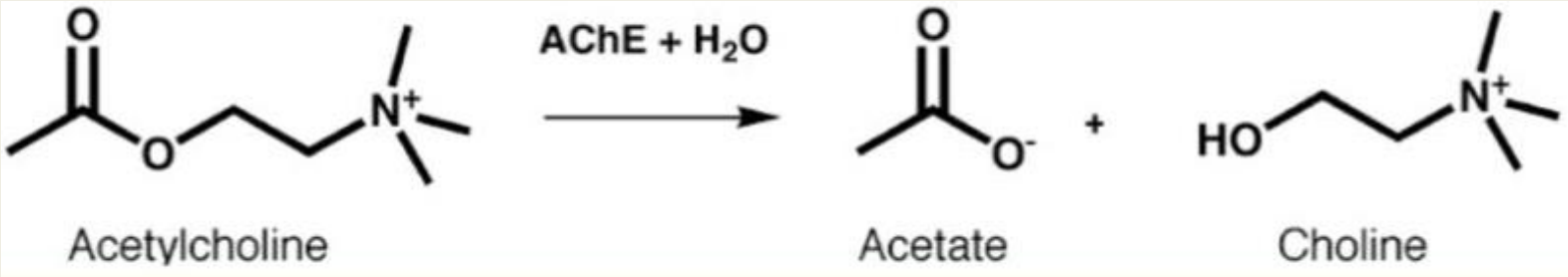
Kolinesterazlar, neredeyse sadece hayvan dokularında bulunan ve **asetilkolinin asetik asit ve koline hidrolizini katalize** eden enzimlerdir.

Bir acyl grubunun çeşitli kolin ve asetilkolin esterlerinden parçalanmasını katalize edebilir.

Cholinesterase is of 2 types:

1. acetylcholinesterase (AchE), or true, specific, E-type cholinesterase (**acetyl**choline **acetylhydrolase**, EC. 3.1.1.7)

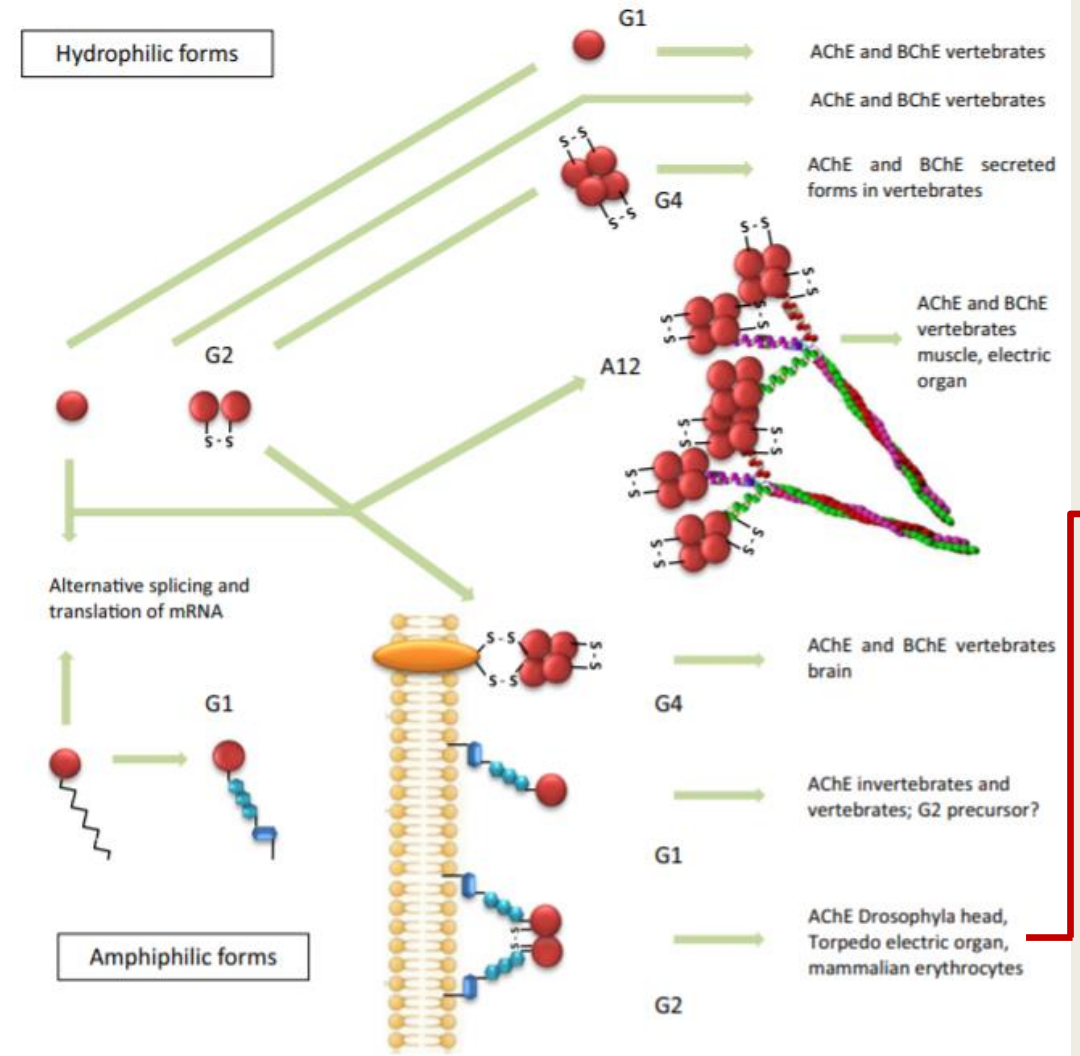
2. cholinesterase or pseudo, nonspecific, s-type cholinesterase (**acyl**choline **acylhydrolase**, EC. 3.1.1.8)



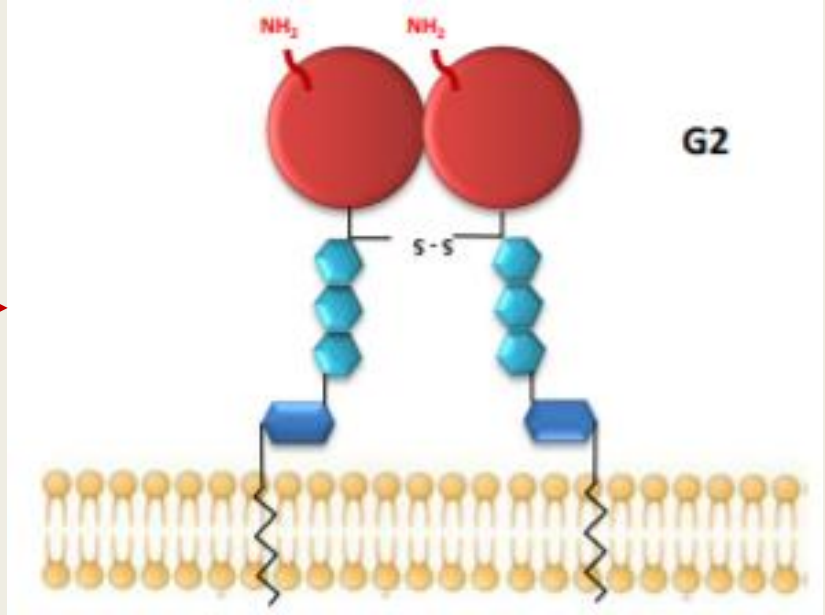
https://www.labpedia.net/cholinesterase-serum/

Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1-3):10-22.

KOLİNESTERAZ



Omurgalılarda bulunan **kolinesteraz formları** (Chatonnet and Lockridge 1989)

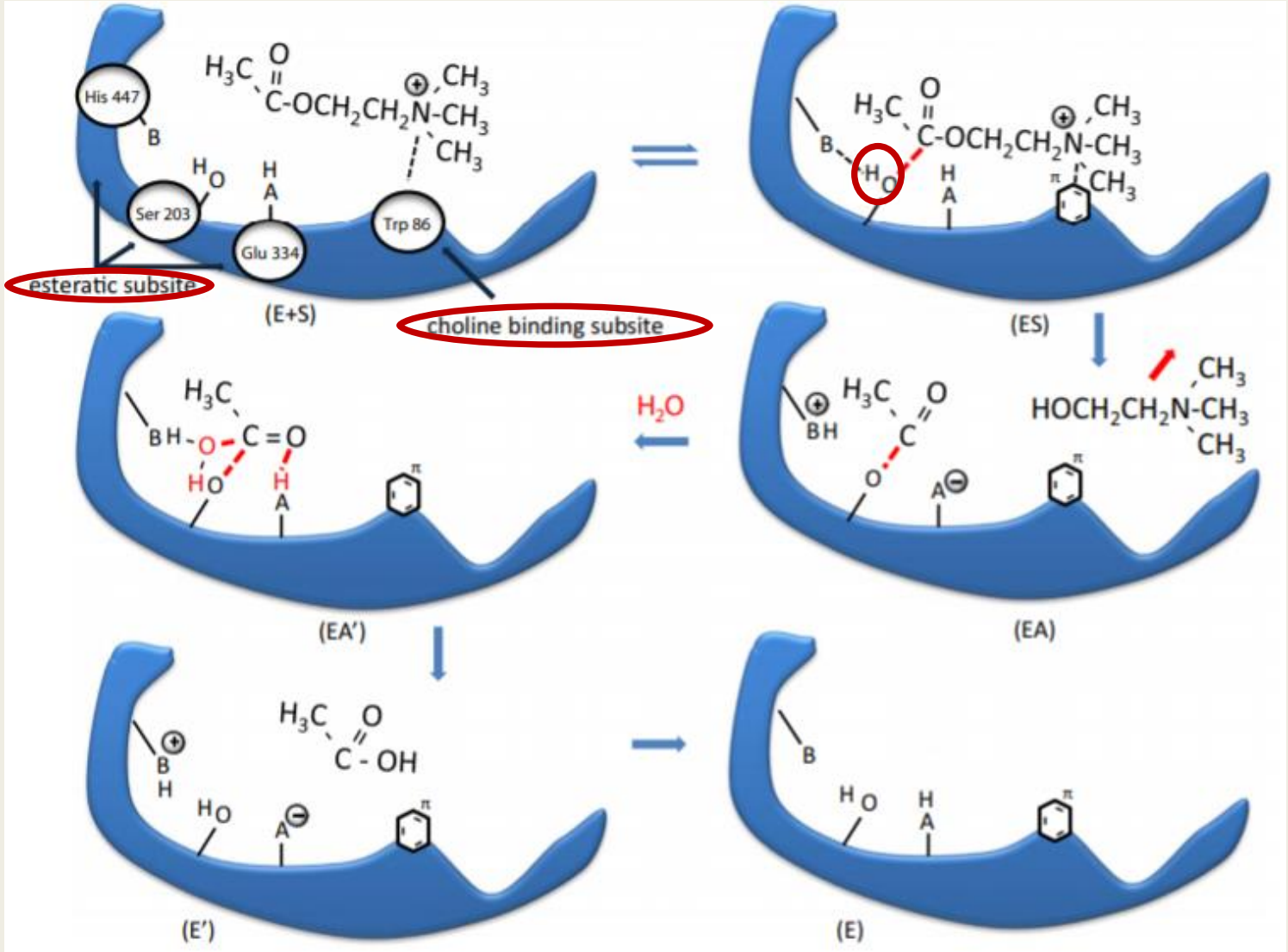


Eritrosit AChE'nin şematik gösterimi

Disülfid bağı ile bağlanmış dimerik yapı ve glikosilfosfatidilinositol anchor'ları yoluyla eritrosit membranına bağlanması (Taylor 1991)

Taylor P (1991) The cholinesterases. J Biol Chem 266:4025–4028.
Chatonnet A, Lockridge O (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochem J 260:625–634.
Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Cabrera, M.P. et al. Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. Environ Sci Pollut Res 25, 18364–18376 (2018).

KOLİNESTERAZ



Ach'nin hidrolizinin katalize olduğu AChE aktif gorge geçidinin altındaki etkileşimlerin şematik gösterimi,

- **kolin bağlanma alt grupları (aromatik kalıntılardaki π elektronlarının etkileşimiyle substratın çekimi ve konumlandırılması) ve**
- **Esteratik alt gruplar**(ester bağlarını yıkar)
- (Fukuto 1990)

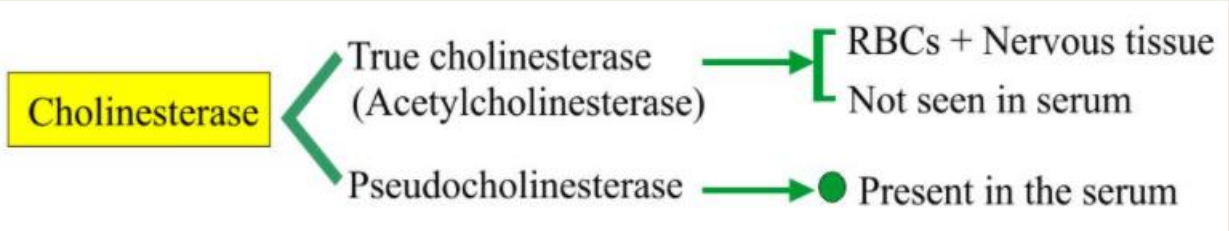
Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Cabrera, M.P. *et al.* Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. *Environ Sci Pollut Res* **25,** 18364–18376 (2018).
Fukuto TR (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ Health Perspect 87:245–254

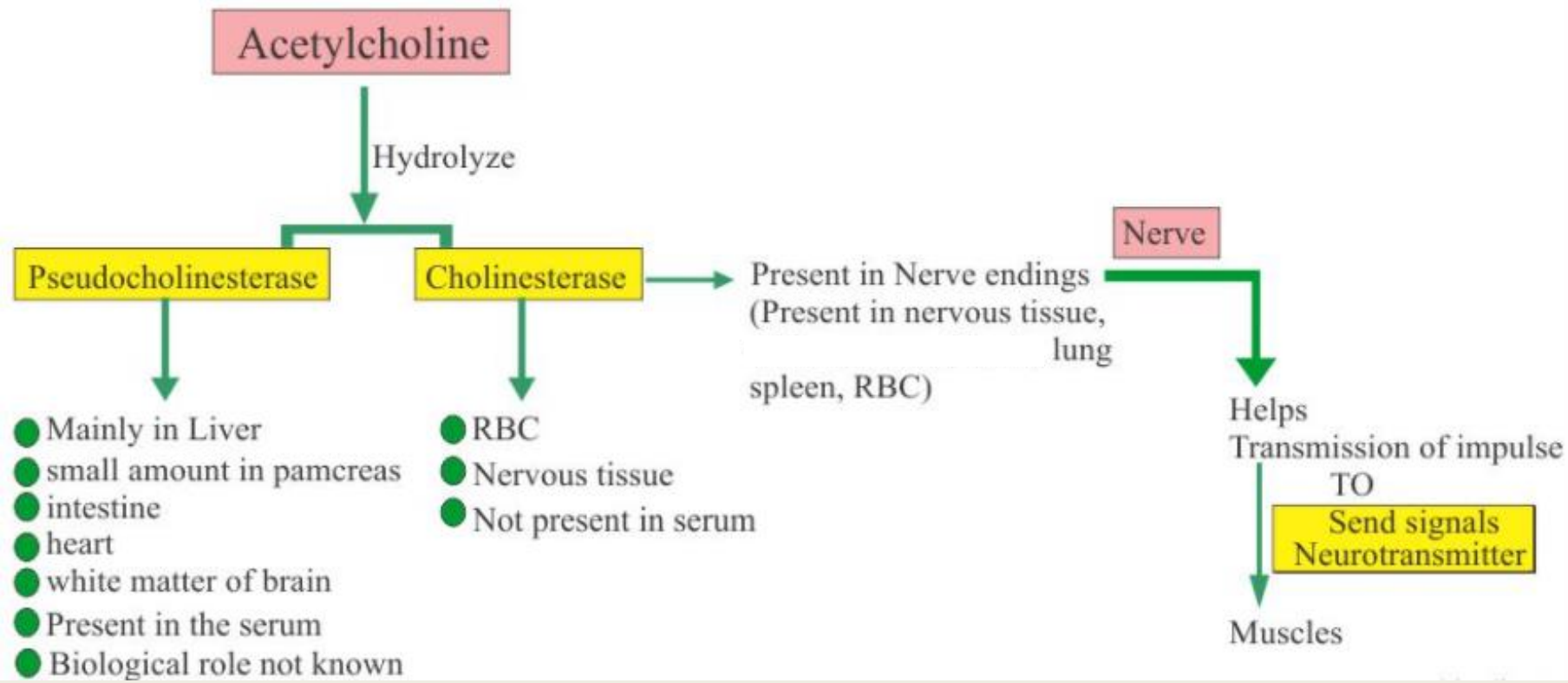
KOLİNESTERAZ

	AChE	Butyrylcholinesterase (BchE) (pseudo)
Dağılım	Sinir dokusunda, kırmızı kan hücrelerinde, akciğer ve dalakta bulunur. Beynin **gri maddesinde** bulunur. RBC lerdeki AchE **RBC kolinesteraz** olarak adlandırılır.	En çok karaciğerde bulunur. Aynı zamanda pankreasta, kalpte, beynin beyaz maddesinde ve serumda da bulunur.
Ach Hidrolizi	Çok hızlı	Yavaş
İnhibisyon	Fizostigmine daha duyarlı	**Organofosfatlara** daha duyarlı
Fonksiyon	Ach aktivitesinin sonlandırılması	Esterlerin hidrolizi

https://www.labpedia.net/cholinesterase-serum/
https://www.slideshare.net/saranyamunivel/cholinergic-and-anticholinesterase-drugs

KOLİNESTERAZ





https://www.labpedia.net/cholinesterase-serum/

KOLİNESTERAZ

- **Kan kolinesterazlarinin inhibisyonuna dayalı pestisit izlemi WHO tarafından uzun zamandır önerilmektedir** (1967, 1984)
  - *Edson (1958), Ellman ve arkadaşalrının (Ellman and Courtney 1961) (adapted by WHO 1984) or erythrocyte AChE according to George and Abernethy (1983) metodunu kullanmak için taze tam kan örnekleri gereklidir.*
  - *Bu metodların dezavantajları;*

(a) Total ChE'leri kullananlarda AChE ve BChE aktiviteleri ayırt edilemez;

(b) Tam lysis ve santrifüj olmadan eritrosit AChE kullananlarda hemoglobinin etkileşimi nedeniyle düşük doğruluk.

(c) Tersine, hemoglobin içermeyen eritrosit AChE'nin ekstraksiyon yöntemlerini mümkün kılar,

(d) numunelerin dondurulması ve taşınması (Dondurulduktan sonra 7 güne kadar stabil olduğu için);

(e) kolorimetrik interferans içermeyen örnekler;

(f) sadece eritrosit AChE'den veri toplanması.

WHO (1967) World Health Organization. Expert committee on the safe use of pesticides in public health. Technical Report Series 356, Geneva
WHO (1984) World Health Organization. Spectrophotometric kit for measuring cholinesterase activity. WHO/VBC/84.888, Geneva
Edson EF (1958) Blood tests for users of OP insecticides. World Crops 10:49–518
Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88–95
George PM, Abernethy MH (1983) Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. Clin Chem 29:365–368

ONEMİ

MILITARY MEDICINE, 00, 0/0:1, 2019

Review of Biomarkers and Analytical Methods for Organophosphate Pesticides and Applicability to Nerve Agents

Jennifer Therkorn, PhD, MPH, BS; David G. Drewry III, MS, BS*; Olivia Tiburzi, BS*; Mekbib Astatke, PhD, BS*; Charles Young, PhD, BS*; Kaitlin Rainwater-Lovett, PhD, MPH, BS**

REVIEW – PubMed verilerine göre çalışma Aralık 13, 2016 da gerçekleştirilmiştir.

OP pestisit maruziyetinin biyobelirteçlerine ilişkin toplam 1.044 çalışma tanımlanmış, bunların 75'i dahil etme ve hariç tutma kriterlerini karşılamaktadır.

Bu çalışmalarda 99 ana bilgisayar tabanlı biyobelirteç, 28 metabolit, 12 pestisit ve 4 adducts olmak üzere 143 farklı analit / numune matriks kombinasyonunu tanımlanmıştır.

En sık bildirilen biyobelirteçler , **dialkil fosfat üriner metabolitleri (22 çalışma), kan asetilkolinesteraz ve plazma butirilkolinesterazdır (her biri 26 çalışma).**

Vandekar M. Minimizing Occupational Exposure to Pesticides: Cholinesterase Determination and Organophosphorus Poisoning. In: Gunther FA, Gunther JD (eds). Residue Reviews. Springer, New York, NY, 1980.
Marrs TC: Organophosphate poisoning. Pharmacol Ther 1993; 58(1): 51–66.
Haigh JR, Lefkowitz LJ, Capacio BR, Doctor BP, Gordon RK: Advantages of the WRAIR whole blood cholinesterase assay: comparative analysis to the micro-Ellman, test-mate ChETM, and Michel (1pH) assays. Chem-Biol Interact 2008; 175(1): 417–20.

ONEMI

MILITARY MEDICINE, 00, 0/0:1, 2019

Review of Biomarkers and Analytical Methods for Organophosphate Pesticides and Applicability to Nerve Agents

Jennifer Therkorn, PhD, MPH, BS; David G. Drewry III, MS, BS*; Olivia Tiburzi, BS*; Mekbib Astatke, PhD, BS*; Charles Young, PhD, BS*; Kaitlin Rainwater-Lovett, PhD, MPH, BS**

Çıkarım - **OP zehirlenmesinden şüpheleniliyorsa, tanı amaçlı en yaygın yaklaşım eritrosit AChE veya plazma BuChE aktivitesinin ölçülmesidir**.

AChE ve / veya BuChE'yi değerlendiren 37 çalışma arasında; **31 çalışmada (31/37,% 84) Ellman yöntemi veya Ellman yönteminin modifiye bir versiyonu ile spektrofotometrik tekniklerin kullanıldığını bildirilmiştir.**

Vandekar M. Minimizing Occupational Exposure to Pesticides: Cholinesterase Determination and Organophosphorus Poisoning. In: Gunther FA, Gunther JD (eds). Residue Reviews. Springer, New York, NY, 1980.
Marrs TC: Organophosphate poisoning. Pharmacol Ther 1993; 58(1): 51–66.
Haigh JR, Lefkowitz LJ, Capacio BR, Doctor BP, Gordon RK: Advantages of the WRAIR whole blood cholinesterase assay: comparative analysis to the micro-Ellman, test-mate ChETM, and Michel (1pH) assays. Chem-Biol Interact 2008; 175(1): 417–20.
Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7(2): 88–95.

YINE DE …

MILITARY MEDICINE, 00, 0/0:1, 2019

Review of Biomarkers and Analytical Methods for Organophosphate Pesticides and Applicability to Nerve Agents

Jennifer Therkorn, PhD, MPH, BS; David G. Drewry III, MS, BS*; Olivia Tiburzi, BS*; Mekbib Astatke, PhD, BS*; Charles Young, PhD, BS*; Kaitlin Rainwater-Lovett, PhD, MPH, BS**

OP maruziyetini değerlendirmek için kolinesteraz aktivitesine güvenmenin önemli dezavantajları da vardır.

1- ChE aktivitesinde popülasyon duzeyinde farklılıklar - genetik etkiler ve cesitli sağlık koşulları nedeniyle.

2- Pestisitlere maruziyete ek olarak, ağır metaller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi diğer çevre kirleticilerine maruz kalmanın da AChE seviyelerini etkileyebileceğine dair bazı kanıtlar vardır.

3- Genel değerlendirme AChE seviyelerindeki bir değişiklik için güvenilir saptamanın alt sınırının ~% 20 olduğu seklindedir; yani, başlangıca göre% 20'den daha az olan değişiklikler OP maruziyeti için güvenilir göstergeler olmayabilir.

Vandekar M. Minimizing Occupational Exposure to Pesticides: Cholinesterase Determination and Organophosphorus Poisoning. In: Gunther FA, Gunther JD (eds). Residue Reviews. Springer, New York, NY, 1980.
Wessels D, Barr DB, Mendola P: Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. Environ Health Perspect 2003; 111(16): 1939–46.
Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T: Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. BioMed Res Int 2013; 2013: 8.
Lessenger J, Reease B: Rational use of cholinesterase activity testing in pesticide poisoning. J Am Board Family Practice 1999; 12(4): 307–14.
Hayes W. Pesticides Studied in Man. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1982.

YINE DE …

MILITARY MEDICINE, 00, 0/0:1, 2019

Review of Biomarkers and Analytical Methods for Organophosphate Pesticides and Applicability to Nerve Agents

Jennifer Therkorn, PhD, MPH, BS; David G. Drewry III, MS, BS*; Olivia Tiburzi, BS*; Mekbib Astatke, PhD, BS*; Charles Young, PhD, BS*; Kaitlin Rainwater-Lovett, PhD, MPH, BS**

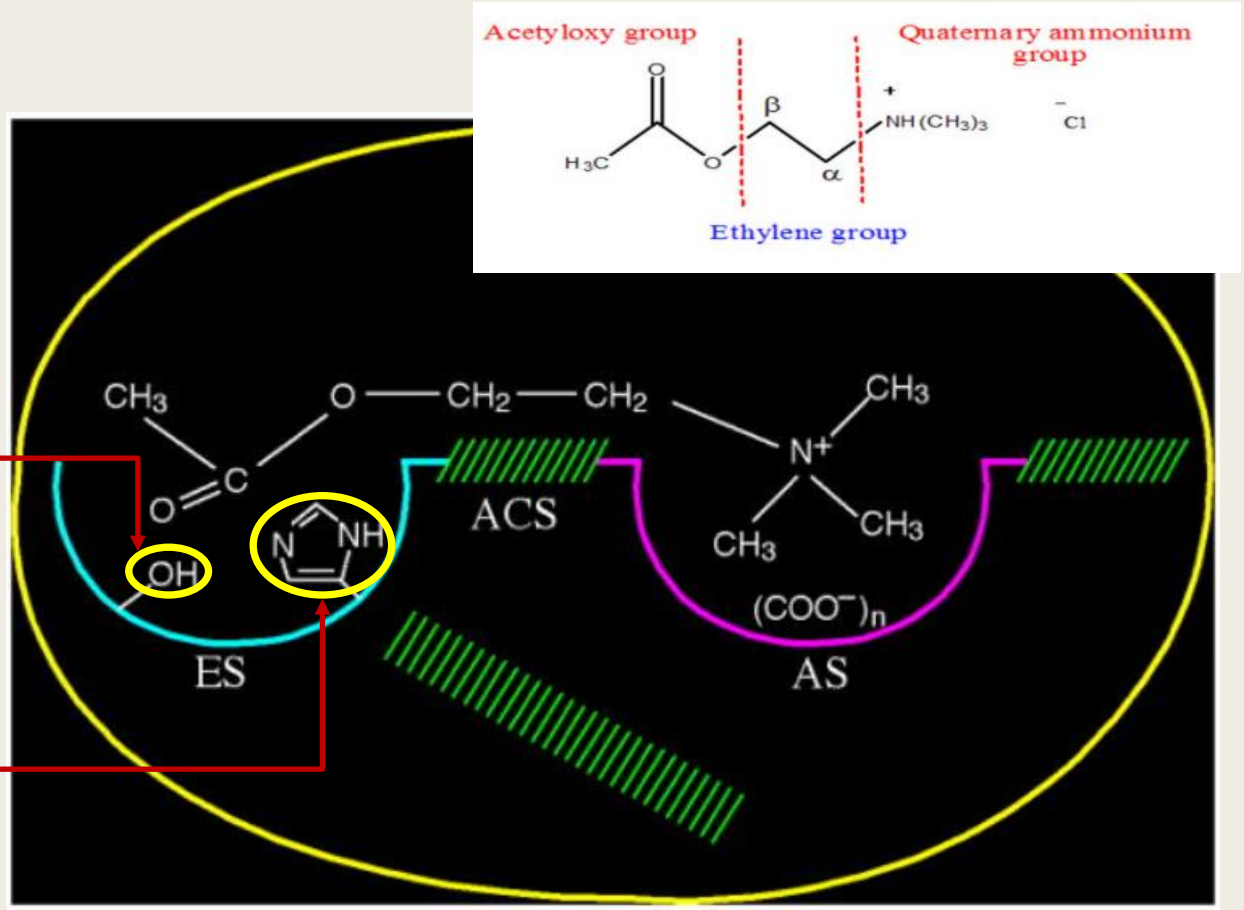
- Bu nedenle, **kolinesteraz aktivitesi düşük düzeylerdeki OP maruziyetlerini izlemek için büyük olasılıkla pratik değildir (?)**, bu da popülasyonun **farkli duzeylerdeki maruziyetler**inde çok sayıda numunenin taranmasını imkansız hale getirir.
- OP sinir ajanları, OP pestisitlerden daha yüksek toksisiteye sahip oldukları için, AChE seviyelerinde önemli bir değişikliği indüklemek için gereken sinir ajanı miktarı önemli ölçüde daha düşüktür.
- Ancak 1995'teki Tokyo metrosu sarin saldırısı sırasında sinir ajanlarının kullanımı, sağlık çalışanlarına **ikincil maruziyetler** gibi yaygın düşük seviyeli maruziyetlere neden olmustur.
- Kolinesteraz aktivitesi, belirli bir OP sinir ajanı eşiğini aşan maruziyete sahip bireylerin tanımlanmasında faydalı olabilir, ancak AChE ve BuChE aktivitelerindeki değişiklikleri gözlemlenen klinik semptomlarla ilişkilendirecek esikler belirlenmis değildir ve **AChE ve BuChE seviyelerinin gözlemlenen hasta semptomları ile ilişkisini ortaya koyan daha fazla araştırma yapılması gereklidir**.

Moshiri M, Darchini-Maragheh E, Balali-Mood M: Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents. Daru: J Fac Pharm, Tehran Univ Med Sci 2012; 20(1): 81–1.
Okumura S, Okumura T, Ishimatsu S, Miura K, Maekawa H, Naito T: Clinical review: Tokyo - protecting the health care worker during a chemical mass casualty event: an important issue of continuing relevance. Crit Care 2005; 9(4): 397–400.

KOLİNESTERAZ – BAĞLANMA BÖLGELERI

AchE, substrat için 2 bitişik bağlanma bölgesine sahiptir.

- 1. bölge "**anyoniktir**" ve asetilkolinin katyonik dörtlü (quaternary) nitrojenini bağlar.
- Diğer bölge "**esteratic**", bir **serin** residue ve enzim reaksiyonu sırasında salınan protonu kabul eden başka bir nükleofilik grup (bir histidin residuenun **imidazolü**)
- NETICEDE; Anyonik bölge, substratın nitrojenini çekerken, esteratik bölgedeki karbonil grubunun elektrofilik karbonu, serin



ES, esteratik bölge; AS, anyonik substrat bağlama bölgesi; ACS, aromatik katyon bağlanma bölgesi; PAS, periferik anyonik bağlanma bölgesi. Taranmış alanlar, varsayılan hidrofobik bağlanma bölgelerini temsil eder.
ACh'nin katalitik merkezin esteratik ve anyonik bölgelerini kapsadığı gösterilmiştir. His ve Ser'in imidazol ve hidroksil yan zincirleri, esteratik bölgede gösterilmektedir. Anyonik bölge içinde, (COO−) n, 6-9 varsayılan negatif yükü temsil eder.

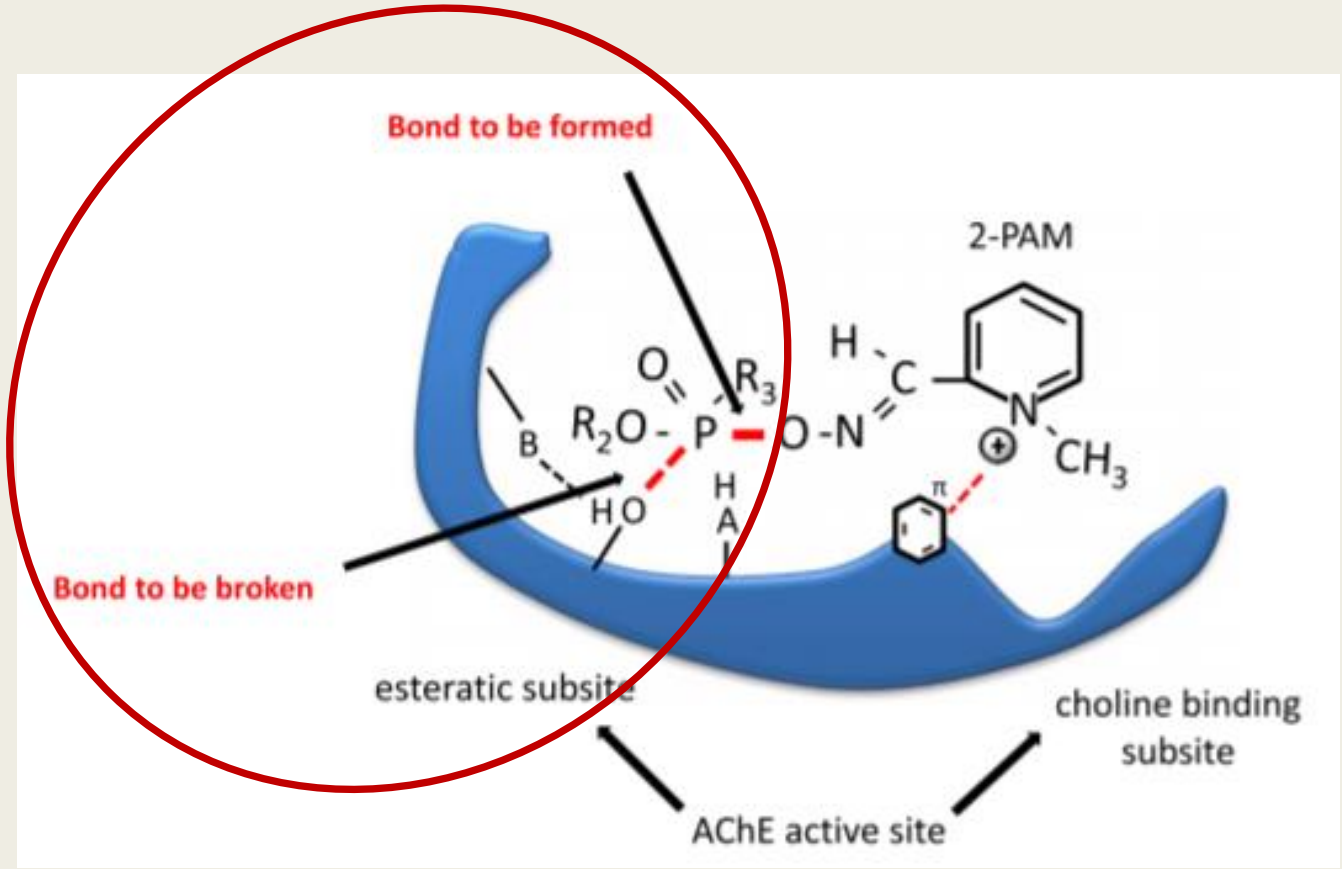
Herz F, Kaplan E. A review: human erythrocyte acetylcholinesterase. Pediatr Res. 1973 Apr;7(4):204-14.
Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1-3):10-22.

KOLİNESTERAZ – BAĞLANMA BÖLGELERI - REAKTIVASYON

- **Anyonik bölge**de bağlanan maddeler (basit kuaterner bileşikler), substratın bağlanmasını önledikleri için **tersinir AchEaz inhibitörleridir (orn.; Prostigmin).** Bu tür bir inhibisyon yavaşça geri döndürülebilir.
- Diizopropilfosfofloridat gibi maddeler, **esteratik bölge**nin serin kalıntısı ile stabil diizopropilfosfat esterleri oluşturur ve bu da irreversibl inhibe edilmiş AchE ile sonuçlanır. **Bu tür bir inhibisyon, insecticides ve sinir gazlarını karakterize eder.**
- 2-piridin aldoxime methiodide (**2-PAM**) gibi intramoleküler mesafede güçlü bir katyonik gruba sahip bileşikler, **diizopropilfosfat grubunu esteratik bölgeden hızla uzaklaştırarak enzim aktivitesini geri getirir.**
- 2-PAM, diizopropilfosfofloridat zehirlenmesi için bir panzehir olarak başarıyla kullanılmıştır.

Herz F, Kaplan E. A review: human erythrocyte acetylcholinesterase. Pediatr Res. 1973 Apr;7(4):204-14.

Organofosfat, enzim üzerindeki **serin hidroksil grubunu fosforile ederek AChE'yi inaktive eder.**



Fosfoester bağı üzerindeki Oksim (2-pralidoksim) enziminin AChE ile organofosforlu pestisitin katalitik bölge boşluğunun altındaki aktivitesinin etkisi.

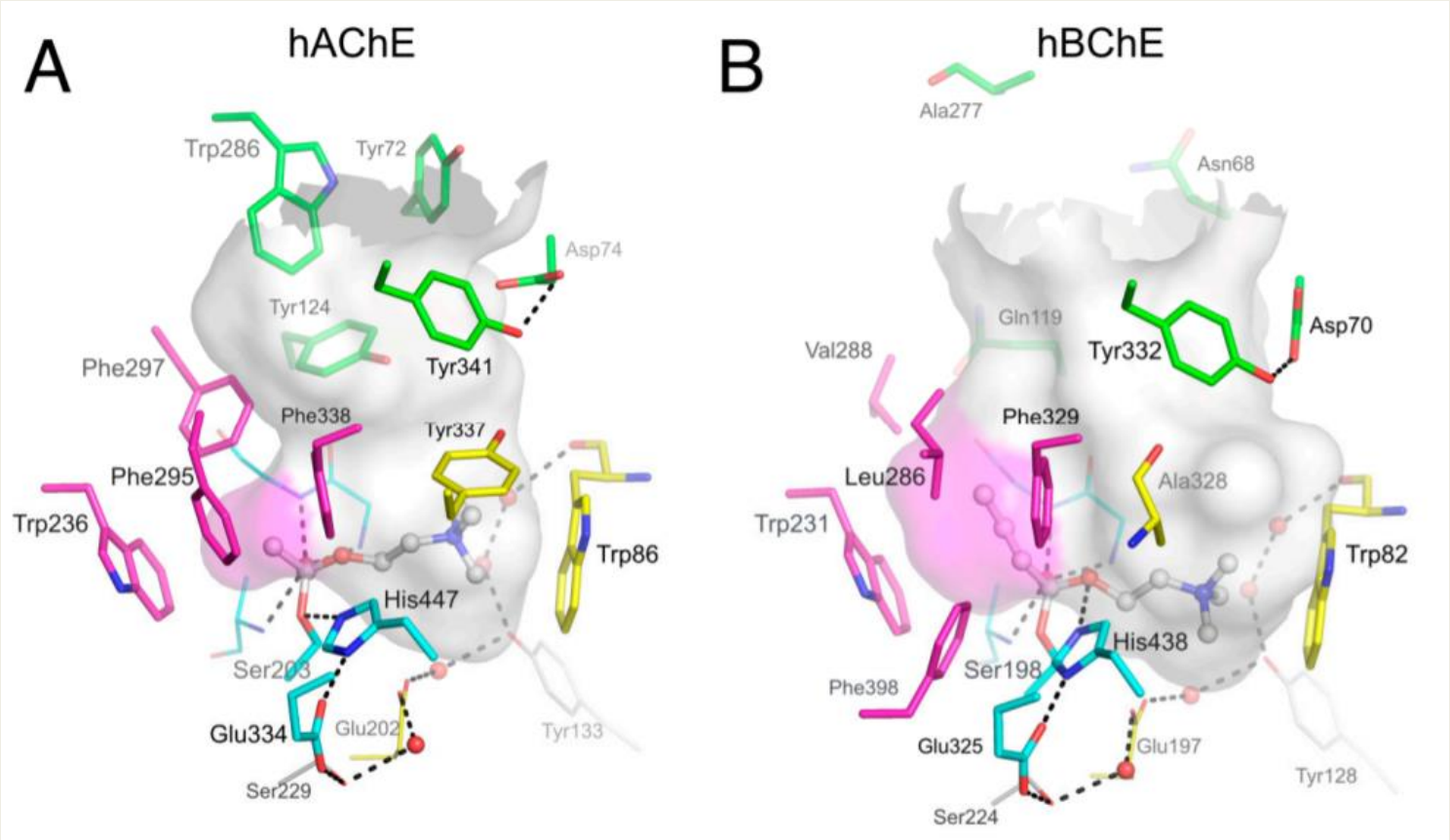
Adapted from ATSDR (2007)

Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Cabrera, M.P. *et al.* Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. *Environ Sci Pollut Res* **25,** 18364–18376 (2018).
ATSDR (2007) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Case studies in Environmental Medicine cholinesterase inhibitors: including pesticides and chemical warfare nerve agents. Course WB1102. Available at: http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.html. Atlanta, 153 pp

Bir substrat molekülünün [Asetilkolin (ACh) veya butirilkolinin (BCh)] acylation geçiş durumu modellenmistir.

İnsan AChE ve insan BChE'nin aktif bolgeleri.

- **The gorge** - moleküler yüzey (yarı-transparan gri) and magenta (morumsu-kırmızı) açil-bağlama kesesi.
- Katalatik triad (Çubuklarda) ve oksianyon kalıntılarında (çizgiler) cyan daki A-bölgeleri (yeşilimsi-mavi).
- magenta içindeki tüm açil-baglama keseleri(morumsu-kırmızı).



- A-bölgelerindeki kolin-bağlama keselerinin kilit aromatik kalıntıları sarı
- P-bölgesi kalıntıkları rim of the gorge da bulunur(yeşil)
- Yapısal su molekülleri kırmızı kürelerle gösterilmektedir.
- A-bölgesindeki hidrojen bağları kesik çizgilerle gösterilmektedir.

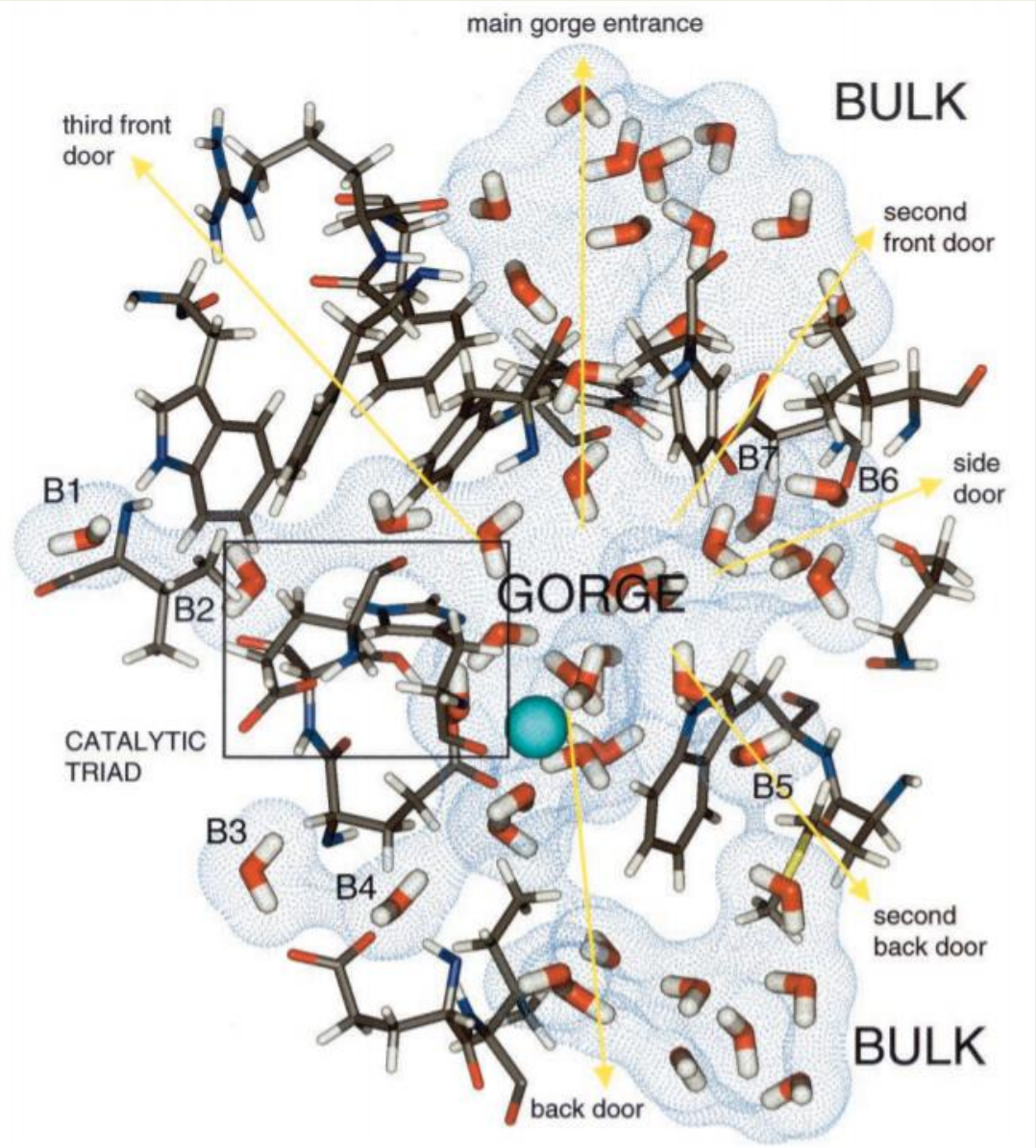
Rosenberry TL, Brazzolotto X, Macdonald IR, Wandhammer M, Trovaslet-Leroy M, Darvesh S, Nachon F. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. Molecules. 2017 Nov 29;22(12):2098.

GORGE GİRİŞLERİNİN LOKASYONU

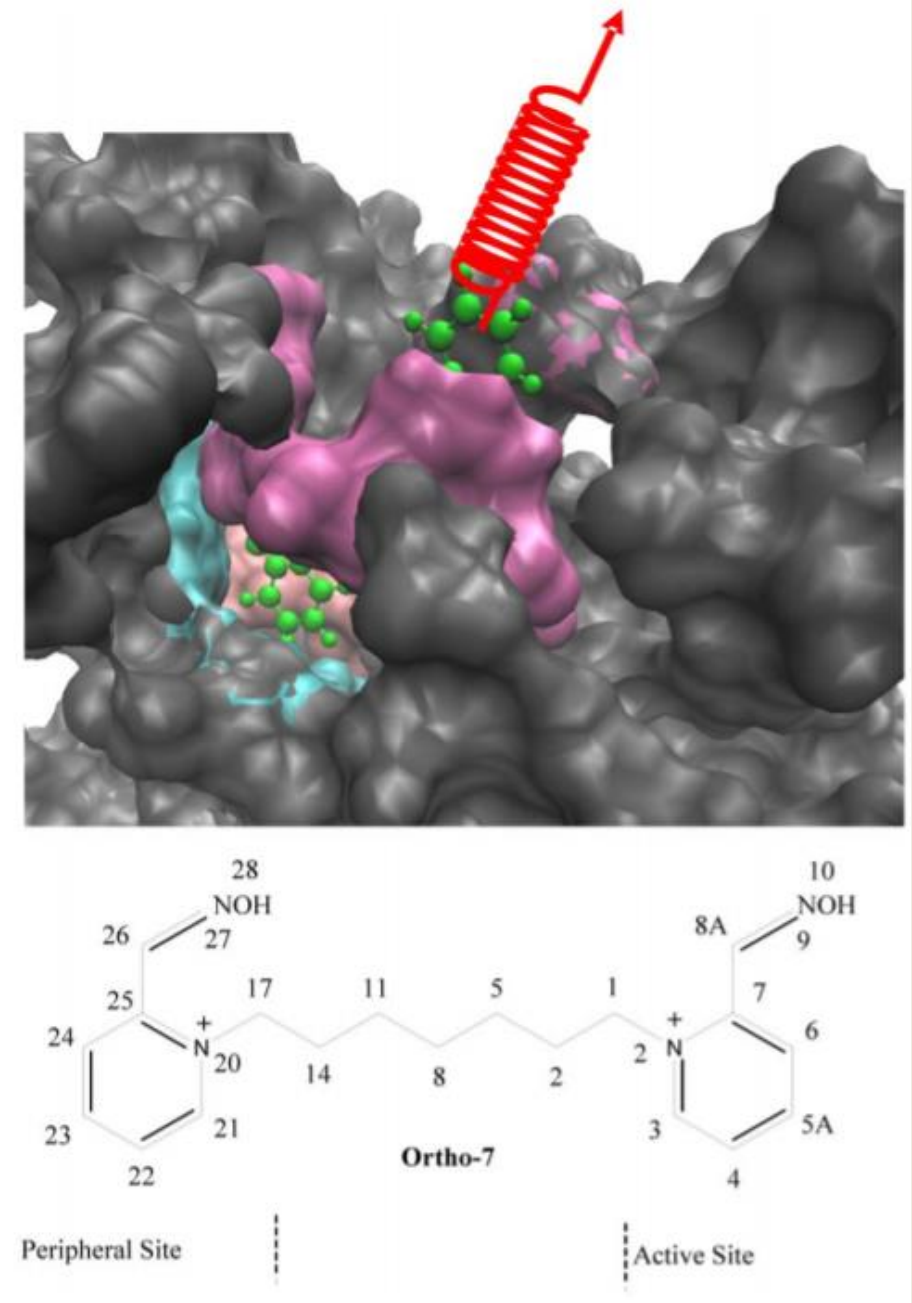
12 den itibaren saat yönünde ana geçit girişi, ikinci ön kapı, yan kapı, ikinci arka kapı, arka kapı ve üçüncü ön kapıdır.

Su molekülleri V şeklindedir ve mavi küre sodyum iyonudur.

B1 – B7 olarak işaretlenmiş yedi su molekülü ve çoğu zaman protein de içine gömülü halde bulunmaktadır.



Henchman RH, Tai K, Shen T, McCammon JA. Properties of water molecules in the active site gorge of acetylcholinesterase from computer simulation. Biophys J. 2002 May;82(5):2671-82.



ORTHO-7 (OXIME İLACI) NIN ASETİLKOLİNESTERAZ İLE KONJUGE OLAN TABUN GORGENUN AKTİF BÖLGESİNİN TRANSLOKASYON ENERJİTİĞİ

(Mus musculus)mAChE

Katalitik triad ve anyonik alt bölge sırasıyla pembe ve mavi rankle gösterilirken,

periferik anyonik bölge (PAS) bölgesi leylak rengi (soluk mor) ile gösterilir.

İlaç molekülü Ortho-7, protein gorge dan harmonik bir yay ile çekilir.

Ortho-7 (oxime drug)un kimyasal şekli [1,7-heptylene-bis-N,N'-2-pyridiniumaldoxime].

İki piridinyum halkasından biri (aktif piridinyum) aktif triad bölgesine, diğeri (periferik piridinyum) AChE enziminin PAS bölgesine doğru yönlenmiştir.

Sinha V, Ganguly B, Bandyopadhyay T. Energetics of Ortho-7 (oxime drug) translocation through the active-site gorge of tabun conjugated acetylcholinesterase. PLoS One. 2012;7(7):e40188

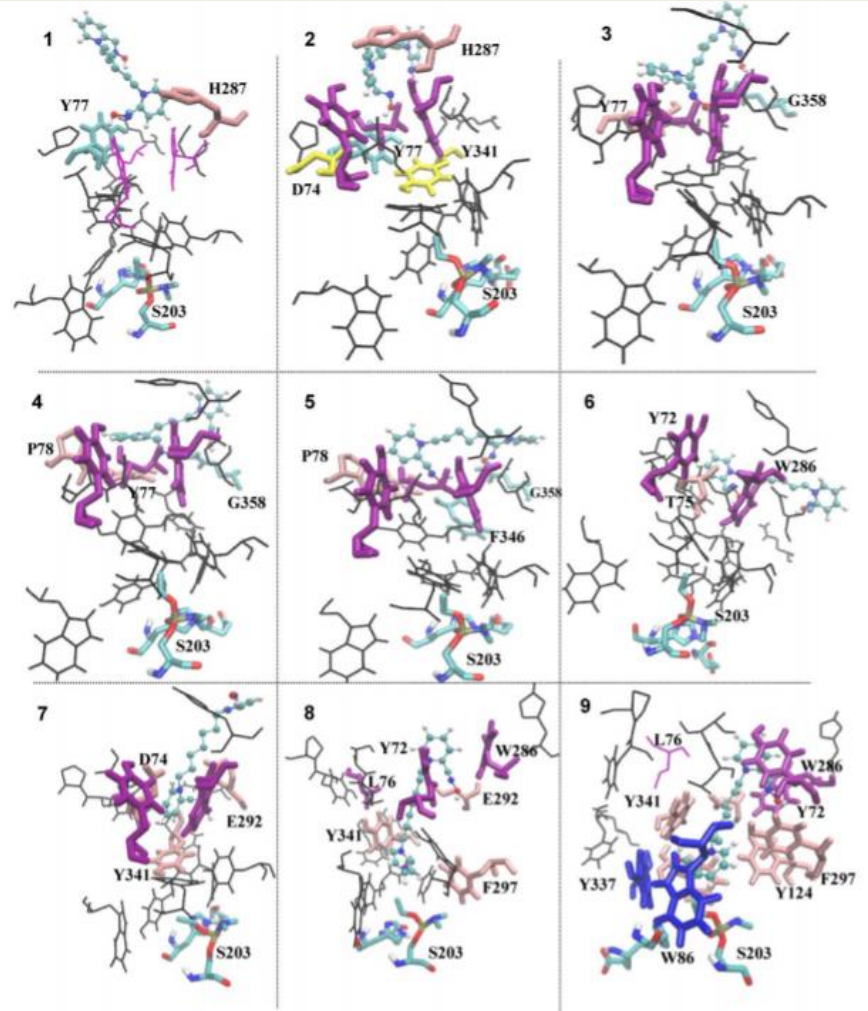
ENERGETICS OF ORTHO-7 (OXIME DRUG) TRANSLOCATION THROUGH THE ACTIVE-SITE GORGE OF TABUN CONJUGATED AchE

Hidrofobik etkileşimlerden sorumlu kalıntılar pembe renkte gösterilirken, ilaçla hidrojen bağı oluşturan kalıntılar cyan ile renklendirilmiştir.

L76 ile birlikte mor renkteki PAS (peripheral anionic site) kalıntıları, Y72 ve W286, gorge'un "bottle neck region“unu oluştururlar. Ilacin aktif triad'a (geçidin altında gösterilen S203) erişim sağlamak için burayi ayirmasi gerekir. Y72 ve W286 kalıntıları, ilacın piridinyum halkaları ile iki aşamada güçlü katyon-π etkileşimi oluşturur: ilki aktif piridinyum halkasi ile, ilaç ilk alındığında (snapshot 6) ve ikincisi periferik piridinyum halkasi ile, ilaç tamamen gorge'a bağlandığında (snapshot 9).

In the fully captured state, residues W86 ve Y337 (mavi) da aktif piridinyum halkası ile benzer katyon-π etkileşimi oluşturur.

Enzimin bağlanma cebini oluşturan ve ilaç yakalama ve salımından sorumlu olan AChE kalıntılarının gösterildigi moleküler dinamik yörüngelerin anlık görüntüleri (snapshots)



Sinha V, Ganguly B, Bandyopadhyay T. Energetics of Ortho-7 (oxime drug) translocation through the active-site gorge of tabun conjugated acetylcholinesterase. PLoS One. 2012;7(7):e40188

ERİTROSIT-PLAZMA ENZİM(LER) FARKLARI

Hem serum hem de eritrosit kolinesteraz aktivitesi, Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın kullanılan pestisitler arasında yer alan bu insektisitler tarafından inhibe edilir.

AChE'nin eritrositlerdeki yarı ömrü 2-3 ay iken, serum kolinesterazın (psödokolinesteraz) yarı ömrü yaklaşık 8 gündür. Bu nedenle, eritrosit AChE, organofosfatlara kronik ve geçici olarak uzak maruziyetin bir göstergesidir.

ENZİM FARKLARI

- AchE, asetilkolini daha hızlı hidrolize ederken Psödokolinesteraz, butirilkolini daha hızlı hidrolize eder.
- Eritrosit AChE'ye özgü aktivite, çok daha yüksek bireyler arası ve bireyler arası varyasyon sunan plazma BChE'nin aksine nispeten sabittir.
- AChE (1 to 3 months), BChE (a few days to weeks)'ye kıyasla antikolinesteraz ajanlarına karşı daha yavaş spontan rejenerasyona uğrar, böylece daha uzun sureli bir maruziyet sonrasinda bu tür bileşikleri tespit etme şansını arttırır ve eritrosit AChE'nin prognostik önemini gösterir.
- Psödokolinesterazın yarı ömrü yaklaşık 8-16 saattir. İleri KC hastalığı olan hastalarda ↓↓
- Süksinilkolin ile nöromüsküler blokaj meydana gelmeden önce azalma **>% 75** olmalıdır.
- Nonspesifik ?
  - Akut miyokard infarktüsü vakalarının % 90.5'inde plazma psödokolinesteraz yükselmesi gözlenmiştir.
  - AchE’in varlığı, karın duvarı defektleri ve nöral tüp defektleri dahil olmak üzere birçok yaygın doğum kusurunu doğrulayabilir.

https://www.labpedia.net/cholinesterase-serum/
Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Cabrera, M.P. *et al.* Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. *Environ Sci Pollut Res* **25,** 18364–18376 (2018).

ENZİM FARKLARI

Eritrositte AchE

Table II. Enzymes of the erythrocyte membrane

Enzymes	References
Acid proteases and peptidases	[40, 92]
Diphosphopyridinenucleotidase	[35]
Triphosphopyridinenucleotidase	[35]
Phosphatases of various specificities	[20, 34, 41, 52, 91, 103]
Cation-dependent adenosinetriphosphatases	[41, 75]
5′-Adenosinemonophosphate deaminase	[79]
Adenylate kinase	[17, 41]
Diglyceride kinase	[52]
Phosphoglycerate kinase	[72]
Sialyltransferases	[63]
Glycolytic enzymes	[16, 25, 82, 90, 105]
Acetylcholinesterase	[11]

- Alles and Hawes (1940) → ilk kez 1940 yılında eritrosit enziminin beyin esteraza benzediğini ancak serumda bulunan kolinesterazdan belirgin şekilde farklı olduğu
- 1949'da Pritchard → Artan AchE aktivitesinin genç eritrositin bir özelliği olduğuna dair ilk doğrudan kanıt, (Retikülositten zenginlerde yüksek aktivite ve retikülositten fakir fraksiyonlarda düşük aktivite bulunmuştur).
- Sabine, O grubunun eritrositlerini A-tipi normal alıcılara nakletmiş ,ardından donör hücrelerini izole etmiş ve benzer sonuçlar elde etmiştir.

*BRAUER, R. W., AND ROOT, M. A.: The cholinesterase of human erythrocytes. Fed. Proc, 4: 113 (1945).
Herz F, Kaplan E. A review: human erythrocyte acetylcholinesterase. Pediatr Res. 1973 Apr;7(4):204-14.
GALEHR, O., AND PLATTNER, F.: Uber das Schicksal des Acetylcholins im Blute. Seine Zerstorung im Blute verschiedener Saugetiere. Pflueger's Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere, 218: 506 (1927).
ALLES, G. A., AND HAWES, R. C: Cholinesterases in the blood of man. J. Biol. Chem., 133: 375 (1940).
SABINE, J. C: Choline esterase of blood cells and plasma in blood dyscrasias, with special reference to pernicious anemia. J. Clin. Invest., 19: 833 (1940).
PRITCHARD, J. A.: Erythrocyte age and cholinesterase activity. Amer. J. Physiol., 158: 72 (1949)
SABINE, J. C: The cholinesterase of erythrocytes in anemias. Blood, 6: 151 (1951).
SABINE, J. C: Erythrocyte cholinesterase titers in hematologic disease states. Amer. J. Med., 27: 81 (1959).

ENZİM FARKLARI - KOLINESTERAZ AKTIVITESINI ETKILEYEN FAKTÖRLER

Kan kolinesteraz aktivitesini etkileyen faktörler (adapted from ATSDR 2007)

	RBC AChE	Serum BChE
Low levels	- Antimalarial drugs (Clark 2002) - Oral contraceptives (Clark 2002) - Some anemias (Tareg et al. 2001) - Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) (Lawson and Barr 1987; Ueda et al. 1990) - Type 1 diabetes mellitus (Suhail and Rizvi 1989)	- Acute infections (Tareg et al. 2001) - Benzalkonium salts (Reigart and Roberts 1999) - Carbon disulfide (Reigart and Roberts 1999) - Chronic debilitating disease (Clark 2002) - Ciguatoxins (Reigart and Roberts 1999) - Cocaine (Clark 2002) - Codeine (Clark 2002) - Dermatomyositis (Reigart and Roberts 1999) - Genetic deficiency (3% of individuals) (Tareg et al. 2001; Clark 2002) - Hepatic parenchymal disease (Clark 2002) - Malnutrition (Clark 2002) - Morphine (Clark 2002) - Pregnancy (Tareg et al. 2001) - Oral contraceptives (Tareg et al. 2001) - Organic mercury compounds (Reigart and Roberts 1999) - Solanines (Reigart and Roberts 1999) - Some anemias (Tareg et al. 2001; Clark 2002) - Succinylcholine (Clark 2002; Çokugras 2003) - Use of gray-top blood collection tubes or those containing fluoride (Clark 2002)
High levels		- Nephrotic syndrome (Clark 2002)

Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Cabrera, M.P. *et al.* Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. *Environ Sci Pollut Res* **25,** 18364–18376 (2018).
ATSDR (2007) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Case studies in Environmental Medicine cholinesterase inhibitors: including pesticides and chemical warfare nerve agents. Course WB1102. Available at: http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.html. Atlanta, 153 pp

KOLİNESTERAZ ENZİMİ – ESAS PATOLOJİ

Epidemiology

- Dünya çapında tahminen ≥ 3 milyon insan her yıl organofosfatlara maruz kalıyor ve bu da yaklaşık 300.000 ölüme neden oluyor.
- ABD'nde, çok az ölümle birlikte yılda yaklaşık 8000 maruziyet vardır.
- Maruz kalma çoğu zaman bir tarım ilacından kaynaklanırken, aynı zamanda organofosfat bileşikleri de içeren karınca ve hamam böceği spreyi gibi ev eşyaları vardır.
- Küresel olarak, organofosfatlı böcek ilaçlarına bağlı % 2-25 arasında değişen ölüm oranları bulunmakta
- en yaygın böcek ilaçları fenitrothion, diklorvos, malathion ve triklorfondur.
- En yaygın ölüm nedeni solunum yetmezliğidir .

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470430/ - Robb EL, Baker MB. Organophosphate Toxicity. 2020 Jul 27. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021

KOLİNESTERAZ ENZİMİ – ESAS PATOLOJİ

Aşırı ACh birikimi sinaptik aralıkta nikotinik ve muskarinik klinik bulgulara neden olur.

For nicotinic signs of acetylcholinesterase inhibitor toxicity, think of the days of the week:

- Monday = Mydriasis
- Tuesday = Tachycardia
- Wednesday = Weakness
- Thursday = Hypertension
- Friday = Fasciculations.

The more common mnemonic that captures the muscarinic effects of organophosphate poisonings is DUMBELS:

- D = Defecation/diaphoresis
- U = Urination
- M = Miosis
- B = Bronchospasm/bronchorrhea
- E = Emesis
- L = Lacrimation
- S = Salivation.

Pathophysiology

- Organofosfat insektisitlerin özelliği, karboksil ester hidrolazların (esas olarak AChE) inhibisyonudur.
- Organofosfat, enzim üzerindeki **serin hidroksil grubunu fosforile ederek AChE'yi inaktive eder.**
- AChE'nin özellikle organofosforlu, klorlu ve karbamatlı pestisitler ile dönüşümsüz inhibisyonu canlı dokudaki sinir sinapslarında ve nöromüsküler kavşaklarda ACh'nin artmasına yol açıp, Ach reseptörlerinin aşırı stimülasyonuna neden olur.
- Sonuçta AcH birikimi kolinerjik bulguların ağırlıkta olduğu bir toksisite tablosu oluşturmaktadır.

Güven A. Asetilkolinesteraz'ın önemi ve inhibitörleri. Kafkas Üni Vet Fak Derg, 2000;6 (1-2): 145-51.
Saydam CK, Sözmen B, Aslan LS. Organofosfor zehirlenmelerine yaklaşım. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 2006; 26: 73-7.
Namba T. Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and clinical effects. Bull Wld Hlth Org. 1971; 44: 289-307.
Heath DF. Organophosphorus poisons. Volume 13. Newyork. Pergamon Pres, 1961; 177-213.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470430/ - Robb EL, Baker MB. Organophosphate Toxicity. 2020 Jul 27. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

On-site analysis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity with the ChE check mobile test kit—Determination of reference values and their relevance for diagnosis of exposure to organophosphorus compounds

Franz Worek[a,*], Martina Schilha[b], Katharina Neumaier[a], Nadine Aurbek[a], Timo Wille[a], Horst Thiermann[a], Kai Kehe[b]

[a] Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Munich, Germany
[b] Bundeswehr Medical Academy, Munich, Germany

HIGHLIGHTS

- We analysed blood samples of 181 male and 61 female volunteers with a mobile field kit.
- Reference values were calculated for acetyl- and butyrylcholinesterase.
- The large inter-individual variability of cholinesterase values calls for determination of individual pre-exposure values.
- The mobile field kit, ChE check mobile, proved to be a suitable tool for on-site analysis of cholinesterase activities.

ARTICLE INFO

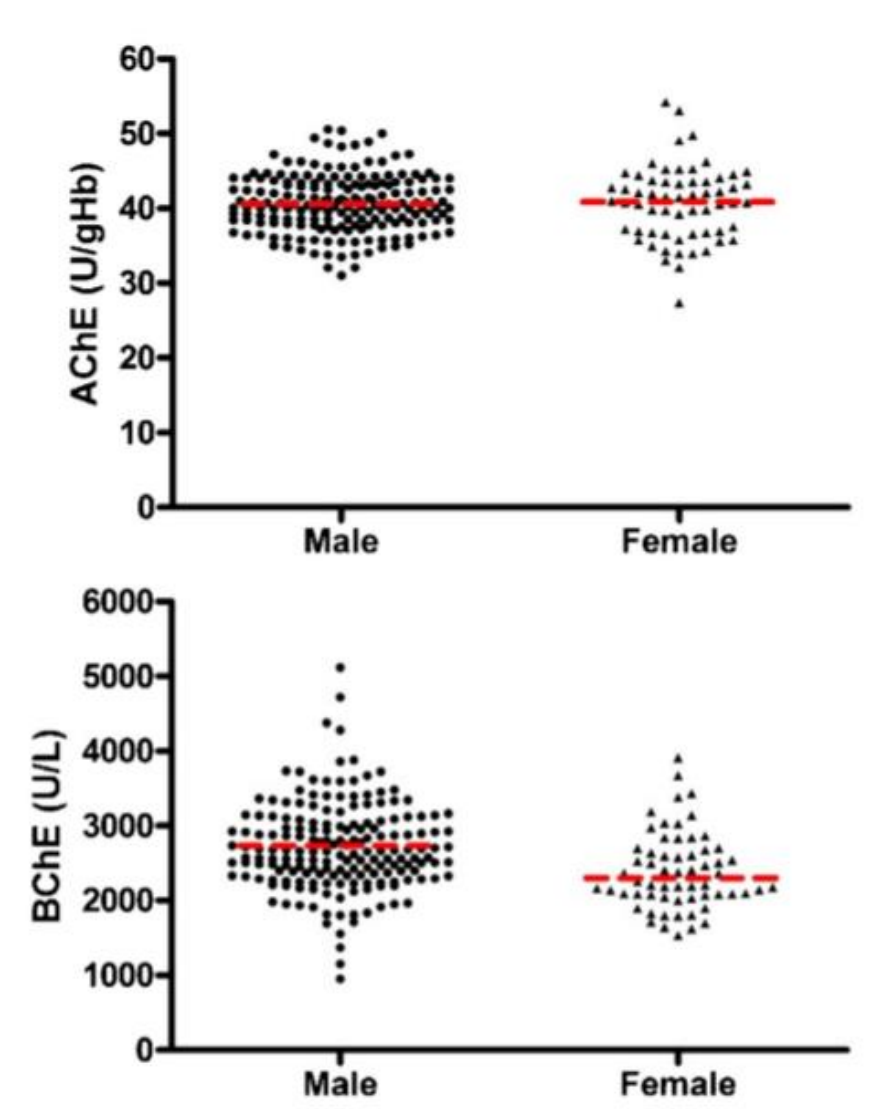
Article history:
Received 2 February 2016
Received in revised form 17 March 2016
Accepted 22 March 2016
Available online 29 March 2016

Keywords:
Acetylcholinesterase
Butyrylcholinesterase
Human whole blood
Reference values
Assay
Field kit

ABSTRACT

Poisoning by organophosphorus compounds (OP) still poses a major medical challenge. Diagnosis of clinical signs of OP poisoning is still the most important parameter for the initiation of specific treatment. However, in case of unspecific signs and of delayed onset of cholinergic crisis a rapid, reliable and on-site analysis of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activity would be of great value. Recently the ChE check mobile, a CE-certified ready to use kit for the determination of whole blood AChE and BChE activities, was developed. Here, we evaluated whole blood AChE and BChE reference values with samples taken from 181 male and 61 female volunteers and analyzed them on-site with the ChE check mobile test kit. The analysis of the data revealed a large inter-individual variability (BChE > AChE), only a small sex difference for AChE but a significant difference for BChE activities. The now available normal range values enable an evaluation of determined AChE and BChE activities in case of suspected exposure to OP nerve agents and pesticides. However, the large inter-individual variability of AChE and BChE activities calls for the determination of pre-exposure values in specific subpopulations in order to enable the diagnosis of low-level OP exposure.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.



Erkek ve kadınlarda AChE ve BChE aktivitelerinin dağılımı. Hesaplanan medyan değerler kırmızı bir çizgi ile işaretlenmiştir.

Worek F, Schilha M, Neumaier K, Aurbek N, Wille T, Thiermann H, Kehe K. On-site analysis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity with the ChE check mobile test kit-Determination of reference values and their relevance for diagnosis of exposure to organophosphorus compounds. Toxicol Lett. 2016 May 13;249:22-8.

ÖLÇÜM TEKNİKLERİ - YÖNTEMLER

GENEL BILGI

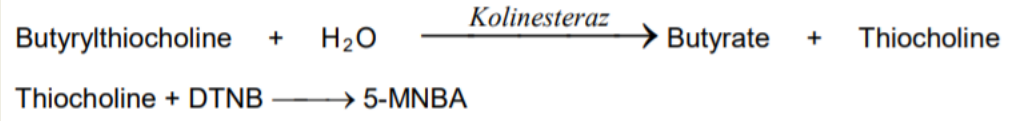
- Biyolojik numunelerde AChE aktivitesinin ölçümü için spektrofotometrik yontemler, eletrokimyasal yontemler, pH belirleme testleri ve radyoaktif testler dahil olmak üzere bir dizi geleneksel yöntem bildirilmiştir.
- Gunumuzde, standart Ellman yontemi en yaygın yontemlerden biri olarak hizmet etmektedir.
- Hassasiyeti artırmak için MS tabanlı HPLC testleri gibi bazı alternatif yöntemler geliştirilmiştir.

Peng L, Rong Z, Wang H, Shao B, Kang L, Qi H, Chen H. A novel assay to determine acetylcholinesterase activity: The application potential for screening of drugs against Alzheimer's disease. Biomed Chromatogr. 2017 Oct;31(10).
Del Carlo M, Pepe A, Sergi M, Mascini M, Tarentini A and Compagnone D. (2010). Detection of coumaphos in honey using a screening method based on an electrochemical acetylcholinesterase bioassay. Talanta, 81 (1-2): 76-81.
Haigh JR, Lefkowitz LJ, Capacio BR, Doctor BP and Gordon RK. (2008). Advantages of the WRAIR whole blood cholinesterase assay: comparative analysis to the micro-Ellman, Test-mate ChE, and Michel (DeltapH) assays. Chem Biol Interact, 175 (1-3): 417-20.
He P, Davies J, Greenway G and Haswell SJ. (2010). Measurement of acetylcholinesterase inhibition using bienzymes immobilized monolith micro-reactor with integrated electrochemical detection. Anal Chim Acta, 659 (1-2): 9-14.
Kao LT and Gratzl M. (2009). Serum cholinesterase assay using a reagent-free micro pH-stat. Anal Biochem , 389 (2): 93-6.
Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr. and Feather-Stone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol, 7: 88- 95
Hu F, Zhang H, Lin H, Deng C and Zhang X. (2008). Enzyme inhibitor screening by electrospray mass spectrometry with immobilized enzyme on magnetic silica microspheres. J Am Soc Mass Spectrom, 19 (6): 865-73.
Peng L, Jiang T, Rong Z, Liu T, Wang H, Shao B, ... Chen H. (2011). Surrogate based accurate quantification of endogenous acetylcholine in murine brain by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 879 (32): 3927-31.
Spencer JD, Rushton D and Allen KR. (2010). A simple liquid chromatography linked to tandem mass spectrometry method for measurement of serum cholinesterase activity using succinylcholine as substrate. Ann Clin Biochem, 47 (Pt 3): 217-22.

KOLORİMETRİK METOD

Serum ve plazma kolinesterazın (CHE) kantitatif tayini

ÇALIŞMA PRENSİBİ



- *Yöntem, CHE için spesifik substrat olarak **butiriltiokolini** kullanır.*
- *CHE, bütiriltiokolin hidrolizini katalize ederek bütirat ve tiyokolin oluşturur.*
- ***Tiyokolin**, hekzasiyanoferratı (III) (sari) hekzasiyanoferrata (II) (renksiz) indirger.*
- ***Absorbanstaki azalma numunedeki CHE aktivitesiyle doğru orantılıdır.***

- Ölçüm Araliği: Tespitaralığı 150 U/L to Lineer limit 22000 U/L.
- INTERFERANSLAR 20 mg/dL ye kadar askorbik asit bulunması, 1000 mg/dL e kadar hemoglobin, bilirubin 60 mg/dL ve lipid 1000 mg/dL.
- 6 aya kadar olan bebeklerde, CHE aktivitesi yetişkinlere göre% 40 ila% 50 daha yüksektir.
- Genç kadınlarda enzim aktivitesi yetişkin erkeklerdekinin yaklaşık% 64 ila% 74'üdür.
- Hamilelik sırasında aktivite azalır.

https://www.spinreact.com/files/Inserts/Bioquimica/BEIS51_CHE_LQ_2018.pdf
Yucesan B, Kurt M, Sezen F, Subasi SA. İlaçlama sektöründe çalışan işçiler ile zehirlenme şüphesi görülen hastaların kolinesteraz seviyelerinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70(1): 7-14.

DIFERANSIYEL PH PROTOKOLÜ

- 820 ul çalışma tamponu içeren diferansiyel pH aparatının karıştırmkuyucuğuna 20 numune (plazma) , ardından 10 ul 275 mmol/L asetilkolin çözeltisi (7,6 mmol / L, nihai konsantrasyon) eklendi.
- Eritrosit kolinesteraz aktivitesinin ölçümü için 10 ul tam kan ve 820 ul kinidin içeren çalışma tamponu kullanıldı. Daha sonra reaksiyonu başlatmak için 10 ul 69 mmol / L (2,0 mmol / L, nihai konsantrasyon) asetilkolin ilave edildi. Tampona 275 mmol / L asetilkolin çözeltisinin 10 ul ilavesi, 4 x 10-4 pH / dakikalık boş bir sürüklenme oluştururken, 10 ul 69 ile 1 x 10-4 pH / dakikalık bir sapma elde edildi.
- Normal bir numunenin ölçümü sırasında geliştirilen tipik pH değişiklikleri -zaman akışı grafiği, Şekil 1'de gösterilmektedir. Yukarıda bildirilen asetilkolin çözeltisi hacimleri kullanılarak uzun süreli doğrusal oranlar elde edildi; 30 saniyelik bir gecikme fazı ve 90 saniyelik bir ölçüm süresi rutin olarak kullanıldı.

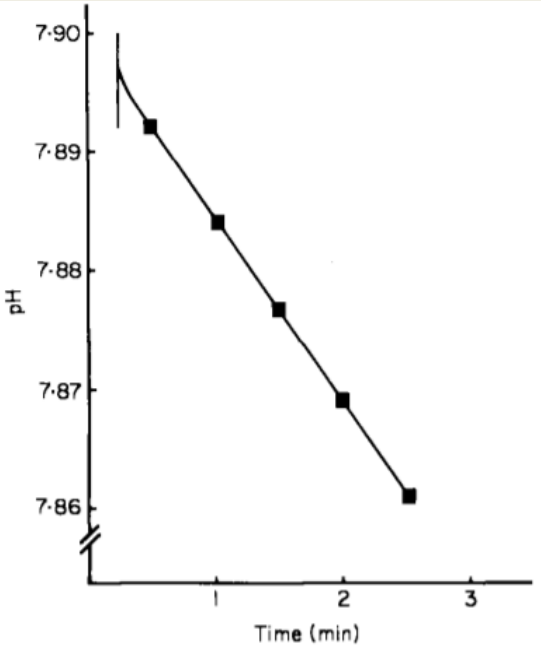


FIG. 1. Time-course of the pH change during a typical measurement sequence.

Barenghi L, Ceriotti F, Luzzana M, Ripamonti M, Mosca A, Bonini PA. Measurement of erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activity by a differential pH technique. Ann Clin Biochem. 1986 Sep;23 (Pt 5):538-45.

DIFERANSIYEL PH PROTOKOLÜ

$$\Delta [H^+] = \beta \cdot \Delta pH, \qquad (1)$$

where β is the buffer capacity determined from the pH change produced by the addition of 10 μL of HCl 0·01 mol/L to 820 μL of buffer, using the differential pH apparatus. The cholinesterase activity of a sample (plasma, washed erythrocytes or whole blood) is calculated as follows:

$$\text{activity} = d \cdot \Delta [H^+]/\text{min}, \qquad (2)$$

where d is the dilution factor.

By combining Equations 1 and 2 the initial cholinesterase activity results to be:

$$\text{activity} = d \cdot \beta \cdot \Delta\ pH/\text{min}. \qquad (3)$$

For example, if d=42 (20 μL of plasma injected into the cuvette, with a final volume of 840 μL), Δ pH/min = 0·0182 and β = 5850 μmol/L/pH, the pseudocholinesterase activity is 4472 U/L.

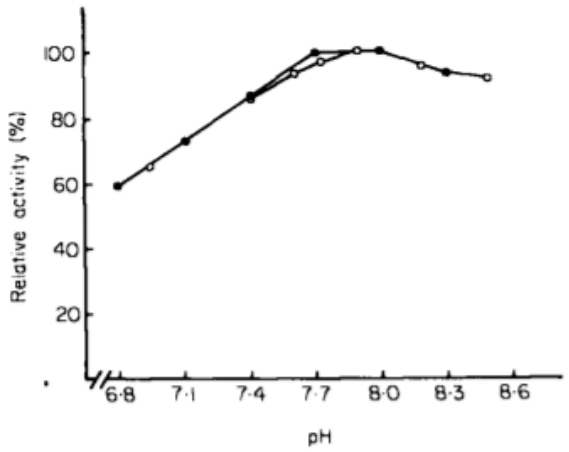


FIG. 2. pH-optimum curves for cholinesterase activity. ●——● plasma sample (activity: 4400 U/L); ○——○ erythrocyte sample (activity: 3500 U/L).

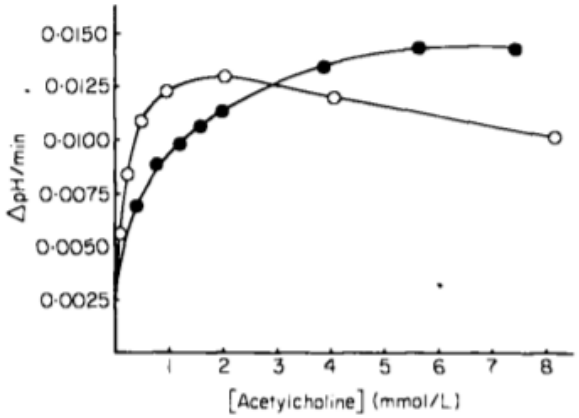


FIG. 3. Hydrolysis rate, 30 s after addition of various amounts of acetylcholine using a plasma sample (●——●) and washed erythrocytes (○——○).

Barenghi L, Ceriotti F, Luzzana M, Ripamonti M, Mosca A, Bonini PA. Measurement of erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activity by a differential pH technique. Ann Clin Biochem. 1986 Sep;23 (Pt 5):538-45.

DIFERANSIYEL PH PROTOKOLÜ

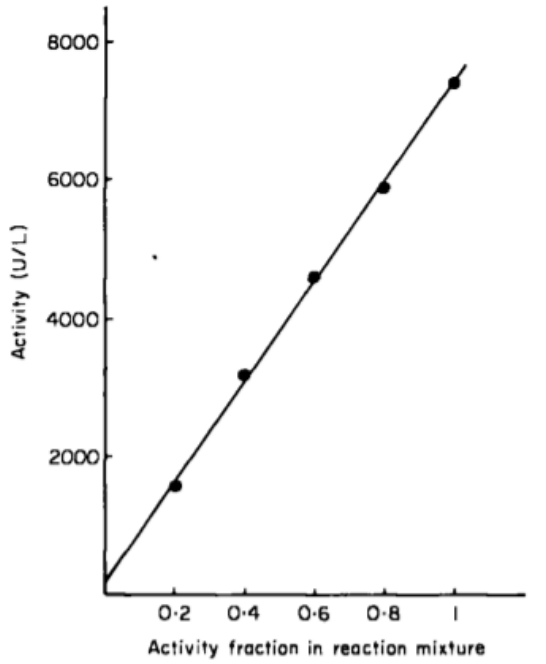


FIG. 5. Linearity of cholinesterase activity determination with differential pH technique.

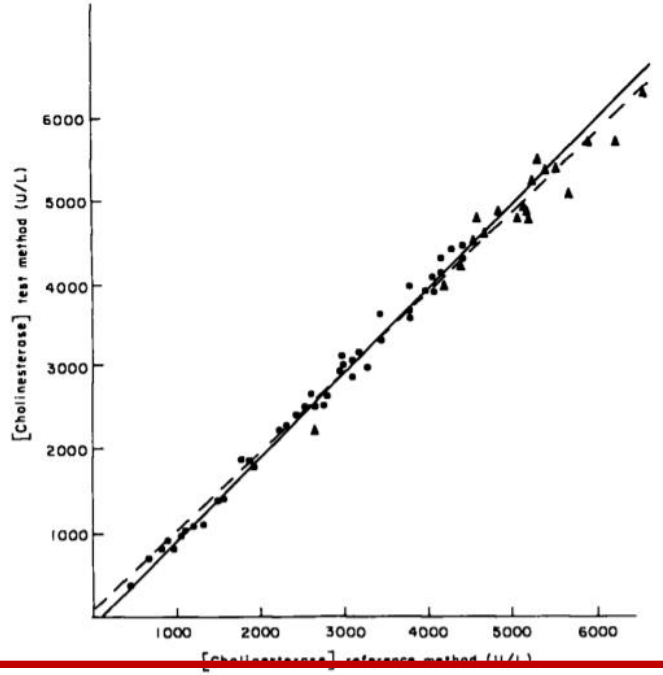


FIG. 6. Correlation between results obtained by the colorimetric method and the proposed pH method for plasma cholinesterase (●——●) and for erythrocyte cholinesterase using washed erythrocytes (▲——▲).

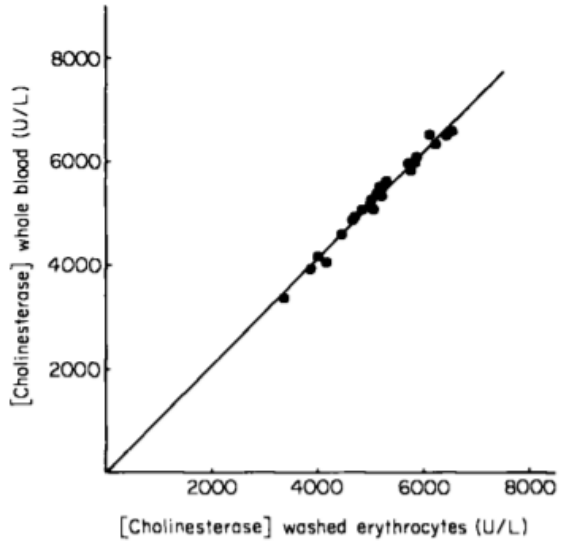


FIG. 7. Correlation between results obtained by the proposed pH method using washed erythrocytes or whole blood as samples for erythrocyte cholinesterase.

Barenghi L, Ceriotti F, Luzzana M, Ripamonti M, Mosca A, Bonini PA. Measurement of erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activity by a differential pH technique. **Ann Clin Biochem**. 1986 Sep;23 (Pt 5):538-45.

Cholinesterase Activity Assay Kit (Colorimetric) (ab235937)

Tayin yöntemi- Kolorimetrik

Örnek tipi- Tam kan

Genel bakış

Kolinesteraz Aktivite Test Kiti (Kolorimetrik), plazmayı ayırmadan tam kan örneklerinde AChE ve BChE aktivitelerini ölçmek ve ayırt etmek için spesifik asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve butirilkolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8) substratları ile selektif BChE inhibitörünü birleştirir. Kan örneklerinin antikolinesteraz bileşiklerine maruziyetini değerlendirmek için basit, uygulaması kolay ve klinik araştırmalarda kullanışlıdır.

Prepare samples, BChE inhibitor, AChE Positive Control, BChE Positive Control and BChE Inhibitor Positive Control.

⇩

Prepare TNB Standard Curve.

⇩

Add DTNB solution to each well containing $Blood_{AChE}$, $Blood_{BChE}$, $Blood_{control}$, AChE, BChE and BChE Inhibitor Positive Control.

⇩

Prepare AChE and BChE substrates.

⇩

Measure absorbance immediately at 412 nm in kinetic mode for 10-30 min at room temperature.

Notlar

Kolinesteraz (ChE), kolin esterlerini hidrolize eden bir grup enzimden oluşur. Kanda iki ChE izoenzimi vardır: asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7), aynı zamanda eritrositler veya esas olarak RBC'lerde bulunan gerçek ChE olarak da bilinir; ve plazmada bulunan, plazma ChE veya psödo-ChE olarak da bilinen bütirilkolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8). Kan AChE veya BChE aktivitesi, zehirli kimyasal maddelere, organofosfatlar veya karbamatlar gibi insektisitlere, anestetiklere ve AD'yi tedavi etmek için kullanılan donepezil veya rivastigmin dahil olmak üzere çeşitli terapötik ilaçlara maruz bırakılarak seçici olarak azaltılabilir. Bu nedenle, **Kan Kolinesterazları (ChE = AChE + BChE), baskılanmış ve / veya artmış merkezi ve periferik sinir sistemi aktivitesinin potansiyel biyobelirteçleri ve olası terapötikleri doğrula araçlarıdır.**

https://www.abcam.com/cholinesterase-activity-assay-kit-colorimetric-ab235937.html

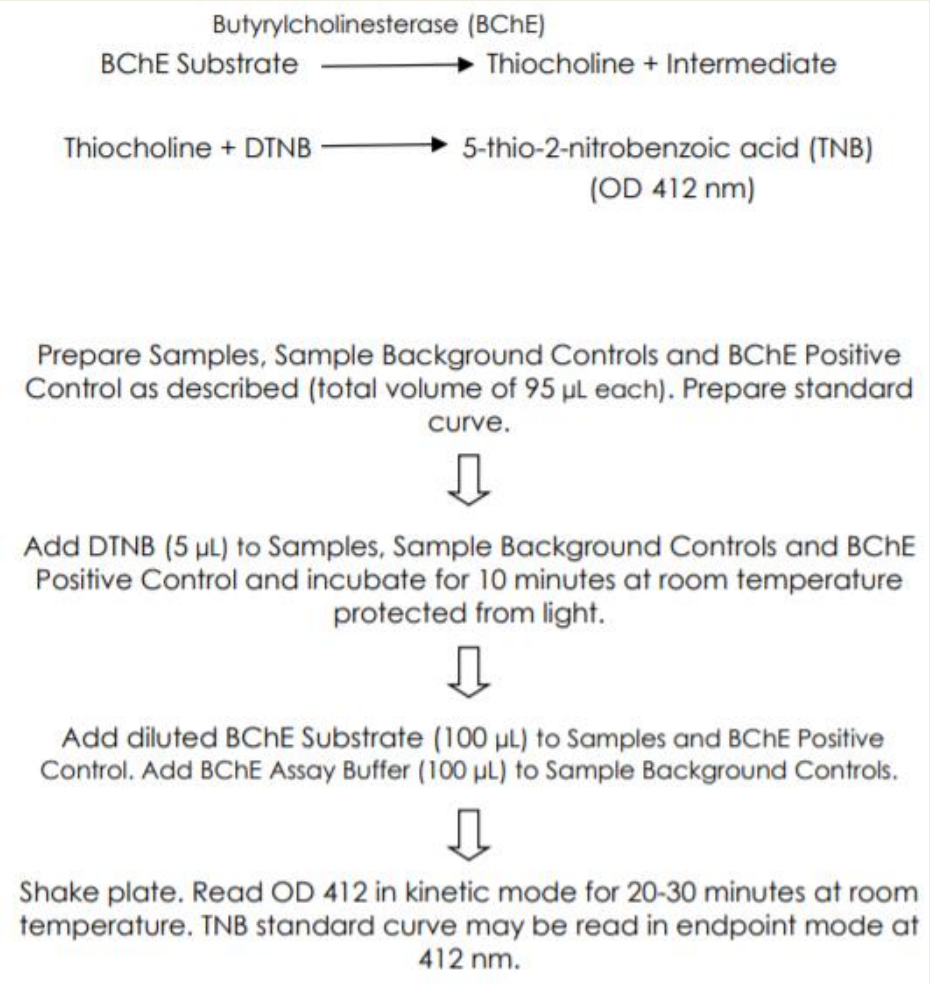
Butyrylcholinesterase Assay Kit (ab241010)

Ürüna dı- Butyrylcholinesterase Assay Kit

Tayin yöntemi- Kolorimetrik

Araştırma Alankarı

- Neuroscience → Neurotransmitter → Acetylcholine
- Neuroscience → Neurology process → Neurodegenerative disease → Alzheimer's disease → Other
- Signal Transduction → Metabolism → Drug metabolism
- Metabolism → Pathways and Processes → Metabolic signaling pathways → Drug metabolism
- Metabolism → Types of disease → Neurodegenerative disease



Fonksiyon

Nörotransmiter asetilkolinin inaktivasyonuna katkıda bulunur. Nörotoksik organofosfat esterlerini indirgeyebilir.

Doku özgüllüğü - Eritrositler dışında çoğu hücrede bulunur.

Hastalkta tutulum

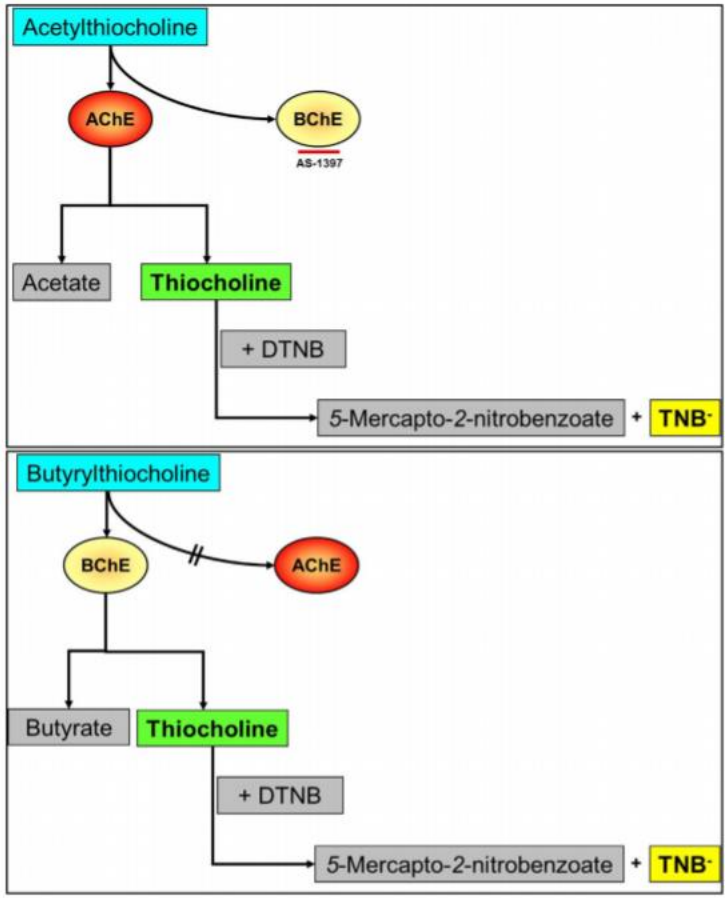
BCHE'deki kusurlar BChE eksikliğinin nedenidir [MIM: 177400].
BChE eksikliği, kas gevşetici süksinilkolin veya mivakuryum ve diğer ester lokal anestetikler dahil olmak üzere belirli anestezik ilaçların kullanımından sonra uzamış apne ile karakterize metabolik bir bozukluktur.
Kalıtsal durum, bir OR özelliği olarak aktarılır.

https://www.abcam.com/butyrylcholinesterase-assay-kit-ab241010.html

ChE testi için tasarlanmıştır

Özellikleri:

- 4 dakikada sonuç
- Parmaktan örnek
- Taşınabilir
- Kullanıcı, kritik sonuçları yorumlamak için uzmana danışmalı
- Askeri ve sivil amaçlar için geliştirildi
- (1) Askeri çatışmalarda ve terörist saldırılarda organofosfat zehirlenmesi (2) Toksik zirai kimyasallarla akut pestisit zehirlenmesi
- +10-50°C arasında çalışabilir.



CHE kontrol mobil test kiti ile AChE (üst) ve BChE aktivitesinin (alt) belirlenmesi için modifiye Ellman testinin şematik reaksiyonları.

https://www.securetec.net/app/uploads/2018/08/Schnelltest-Bestimmung-Cholinesterase_Brochure_ChE_Enzymtest_military_use_70507_v03_EN_Email.pdf

Worek F, Schilha M, Neumaier K, Aurbek N, Wille T, Thiermann H, Kehe K. On-site analysis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity with the ChE check mobile test kit-Determination of reference values and their relevance for diagnosis of exposure to organophosphorus compounds. Toxicol Lett. 2016 May 13;249:22-8.

HASTANEYE YATIŞ VE TABURCUDAKİ ROLÜ

Relevance of Plasma Cholinesterase to Clinical Findings in Acute Organophosphorous Poisoning

DEVANUR RAJASHEKHARA MURTHY MAHADESHWARA PRASAD[1,*], PRASANNA S. JIRLI[2], MAHADEVAIAH MAHESH[3], SHIVANAGAPPA MAMATHA[4]

[1]Department of Forensic Medicine and Toxicology, Government of Karnataka, District Hospital, Chamarajanagar, Karnataka, India
[2]Department of Forensic Medicine and Toxicology, Karnataka Lingayath Education Society University, Jawaharlal Nehru Medical College, Belgaum, Karnataka, India
[3]Department of General Medicine, JSS University, JSS Medical College, Mysore, Karnataka, India
[4]Department of Obstetrics and Gynaecology, JSS University, JSS Medical College, Mysore, Karnataka, India

Abstract

Background: Organophosphorus (OP) poisoning is a major public health problem in developing world. OP pesticides inhibit carboxylic esterase enzymes including plasma cholinesterase (PChE). Clinical manifestations following OP poisoning can be associated with the extent of decrease of PChE. This study was designed to investigate the relevance of PChE level to clinical manifestations in OP poisoning and to evaluate usefulness of PChE in predicting clinical outcomes.
Methods: This was a cross-sectional study which was conducted at Jawaharlal Nehru Medical College, Karnataka from 1st October 2009 to 30th September 2010. Seventy-six OP poisoned patients were enrolled and their clinical manifestations were recorded. 5-ml samples of intravenous blood were collected from each patient (on first day and fifth day of treatment) under strict aseptic precaution and the PChE level was measured.
Results: In total, mean age of patients were 25.5 (range: 21-30) years. Majority of patients were males (65.7 %), from rural areas (86.84 %) and agricultural workers (25%). Main clinical findings at the time of admission were congested conjunctiva (87%), pin point pupil (83%), lacrimation (80%), vomiting (78%), non-reactive pupil (75%), respiratory distress (60%) and abdominal pain (37%). Mean (SD) PChE at 6 hours post-exposure was 3672.4 (4200.1) IU/L. At presentation, cyanosis, muscle weakness, convulsion, respiratory distress and fasciculation were related to cases with >75%reduction of PChE, while, constricted and non-reactive pupil, lacrimation and congested conjunctivae were related to cases with 50-75% reduction and abdominal pain, dryness of conjunctiva, vomiting and diarrhea were related to <50% reduction. Deceased cases had the lowest mean PChE level at presentation (1270.2). Death was mostly observed among patients who had respiratory distress.
Conclusion: A relative relationship between PChE level and clinical manifestations and outcomes was found. These findings can assist health professionals to better evaluate patient's prognosis and improve their treatment plan.

Keywords: Organophosphorous compounds; Acute poisoning; Acetyl Cholinesterase; Pesticide

Table 1. Assessment of Severity of Acute Organ phosphorous Compound Poisoning

	SEVERITY		
	Mild	Moderate	Severe
Clinical Manifestations	Fatigue, Headache, Paresthesia, Nausea and Vomiting, Diaphoresis, Salivation, Abdominal pain, Diarrhea, Able to ambulate	Symptoms of mild poisoning + Miosis, General weakness, Dysarthria, Fasciculation, Unable to ambulate	Generalized Fasciculation, Marked miosis (Absent pupillary reaction), Flaccid Paralysis, Pulmonary crepitation, Respiratory distress, Cyanosis, Unconsciousness
Plasma Cholinesterase level	< 10 %	10-20 %	< 50 %

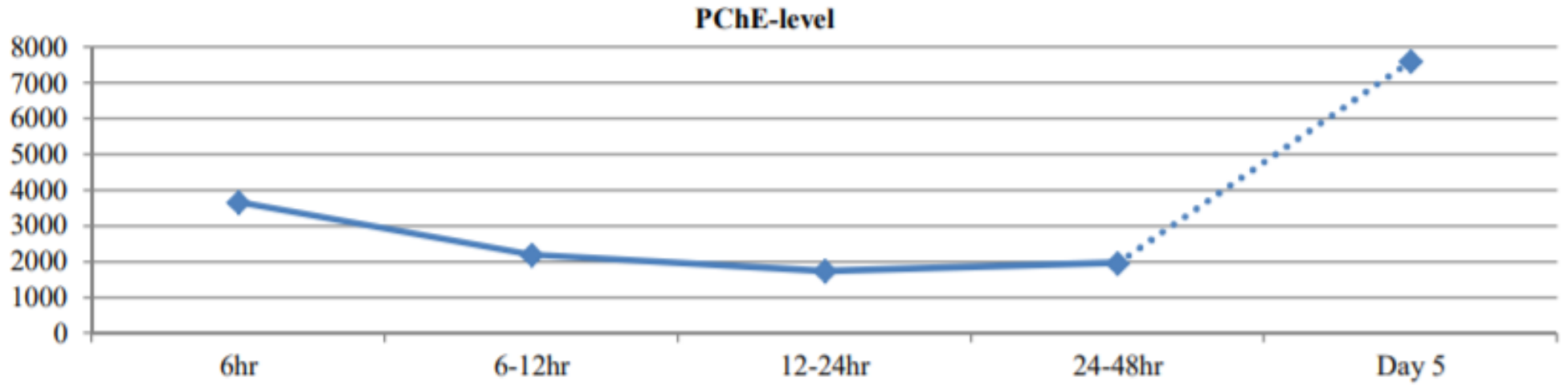


Figure 1. Mean Plasma cholinesterase levels in patients with organ phosphorous poisoning in different times of sampling post-admission.

Devanur R.M.M. Prasad, Prasanna S. Jirli, Mahadevaiah Mahesh, Shivanagappa Mamatha. Relevance of Plasma Cholinesterase to Clinical Findings in Acute Organophosphorous Poisoning. Asia Pacific Journal of Medical Toxicology. 10.22038/APJMT.2013.546

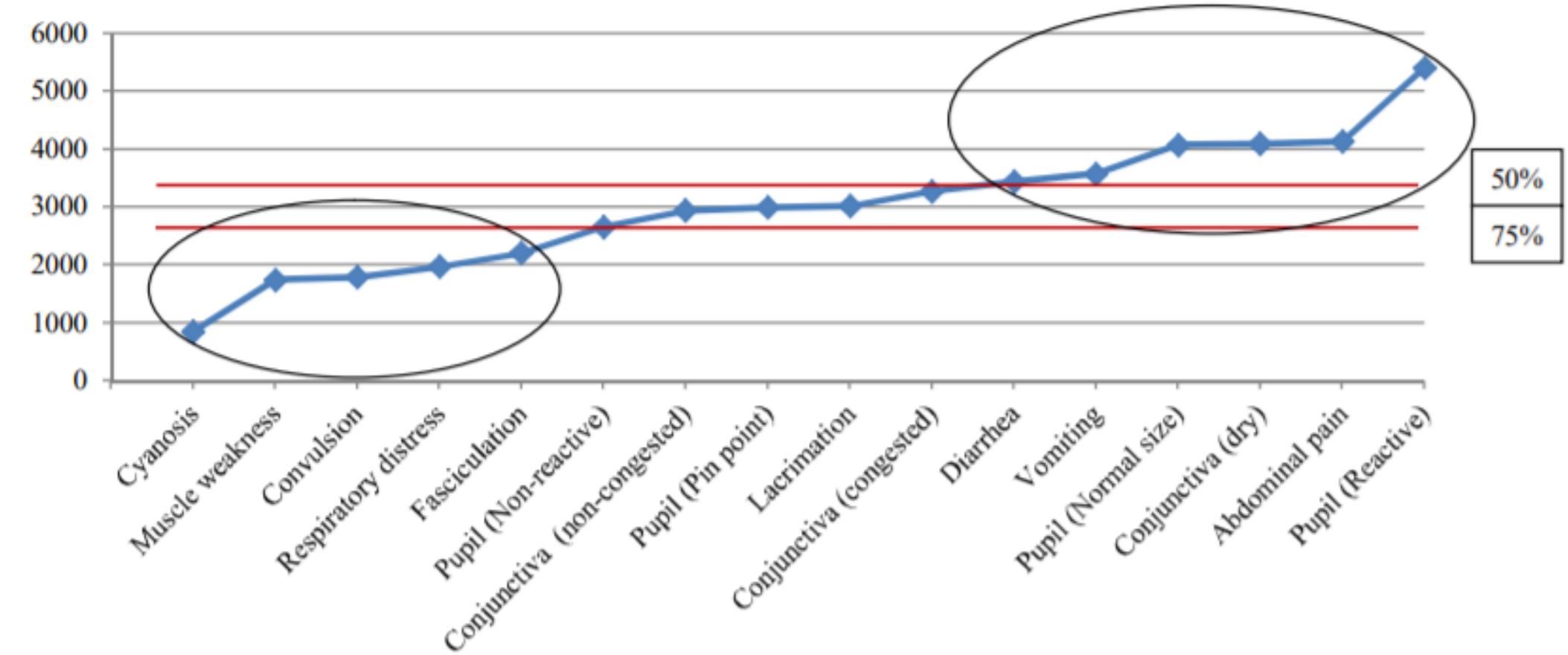


Figure 2. Level of plasma cholinesterase in association with clinical manifestations

Devanur R.M.M. Prasad, Prasanna S. Jirli, Mahadevaiah Mahesh, Shivanagappa Mamatha. Relevance of Plasma Cholinesterase to Clinical Findings in Acute Organophosphorous Poisoning. Asia Pacific Journal of Medical Toxicology. 10.22038/APJMT.2013.546

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Bedside-measurement of serum cholinesterase activity predicts patient morbidity and length of the intensive care unit stay following major traumatic injury

Received: 21 January 2019
Accepted: 4 July 2019
Published online: 18 July 2019

Aleksandar R. Zivkovic[1], Karsten Schmidt[1], Thomas Stein[2], Matthias Münzberg[3], Thorsten Brenner[1], Markus A. Weigand[1], Stefan Kleinschmidt[2] & Stefan Hofer[1,4]

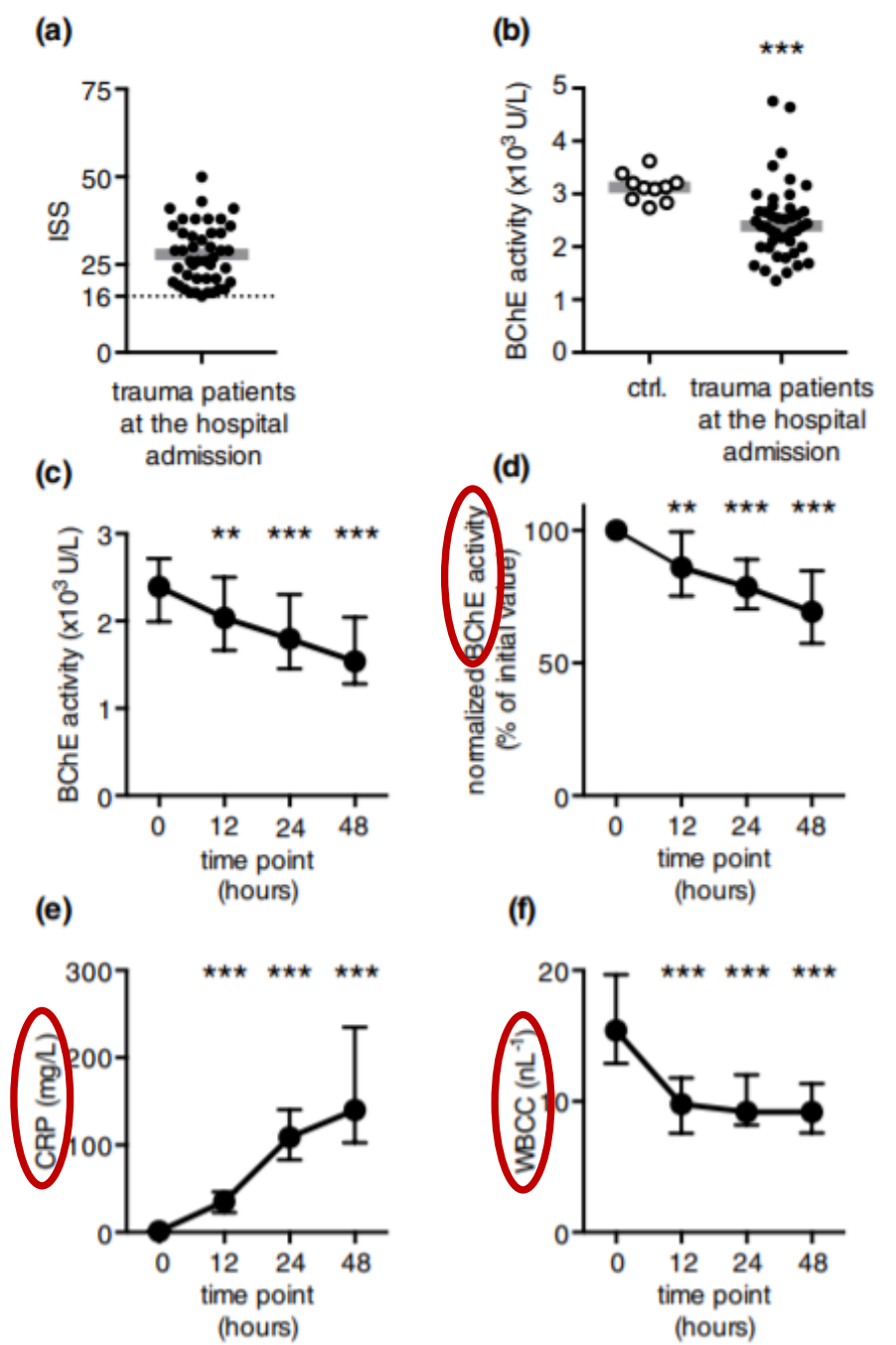
Major traumatic injury (MTI), a life-threatening condition requiring prompt medical intervention, is associated with an extensive inflammatory response often resulting in multiple organ dysfunction. Early stratification of trauma severity and the corresponding inflammation may help optimize resources at the intensive care unit (ICU). The cholinergic system counters inflammation by quickly modulating the immune response. Serum cholinesterase (butyrylcholinesterase, BChE) is an enzyme that hydrolyses acetylcholine. We tested whether a change in the BChE activity correlates with the morbidity and the length of ICU stay. Blood samples from 10 healthy volunteers and 44 patients with MTI were gathered at hospital admission, followed by measurements 12, 24 and 48 hours later. Point-of-care approach was used to determine the BChE activity. Disease severity was assessed by clinical scoring performed within 24 hours following hospital admission. BChE activity, measured at hospital admission, showed a significant and sustained reduction and correlated with disease severity scores obtained 24 hours following admission. BChE activity, obtained at hospital admission, correlated with the length of ICU stay. Bedside measurement of BChE activity, as a complementary addition to established procedures, might prove useful in the primary assessment of the disease severity and might therefore optimize therapy in the ICU.

Zivkovic AR, Schmidt K, Stein T, Münzberg M, Brenner T, Weigand MA, Kleinschmidt S, Hofer S. Bedside-measurement of serum cholinesterase activity predicts patient morbidity and length of the intensive care unit stay following major traumatic injury.

OZET

- Kolinerjik sistem, immune response'u hızlı bir şekilde modüle ederek enflamasyona karşı koyar.
- BChE, aktivitesindeki değişikliğin morbidite ve YBÜ'de kalış süresi ile ilişkili olup olmadığı?
- 10 sağlıklı gönüllüden ve 44 major traumatic injury (MTI) hastasından kan örnekleri hastaneye kabulde toplandı ve ardından 12, 24 ve 48 saat sonra ölçümler yapıldı.
- BChE aktivitesini belirlemek için point-of-care test yaklaşımı kullanıldı.
- Hastaneye kabul sırasında ölçülen BChE aktivitesi, anlamlı ve sürekli bir azalma gösterdi ve hastaneye yatıştan 24 saat sonra elde edilen hastalık şiddeti skorları ile korelasyon gösterdi.
- Hastaneye kabul sırasında elde edilen BChE aktivitesi, YBÜ'de kalış süresiyle ilişkiliydi.
- BChE aktivitesinin yatak başı ölçümü, YBÜ'deki tedaviyi optimize edebilir.

Zivkovic AR, Schmidt K, Stein T, Münzberg M, Brenner T, Weigand MA, Kleinschmidt S, Hofer S. Bedside-measurement of serum cholinesterase activity predicts patient morbidity and length of the intensive care unit stay following major traumatic injury.



(a) Dağılım grafiği, acil servise vardıklarında travma hastalarından elde edilen ISS puanlarını temsil eder.

(b) Hastaneye kabul sırasında 10 sağlıklı gönüllüden (kontrol, açık daireler) ve 44 majör travma hastasından (kapalı daireler) ölçülen BChE aktivitesini temsil eder.

(c) Hastaneye yatıştan 12, 24 ve 48 saat sonra yaralı hastalarda ölçülen BChE aktivitesi, hastaneye kabul sırasındaki ilk ölçümle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır.

(d) (c) 'de gösterilen BChE aktivite verileri, hastaneye girişte elde edilen başlangıç değerlerine göre normalleştirilmiştir.

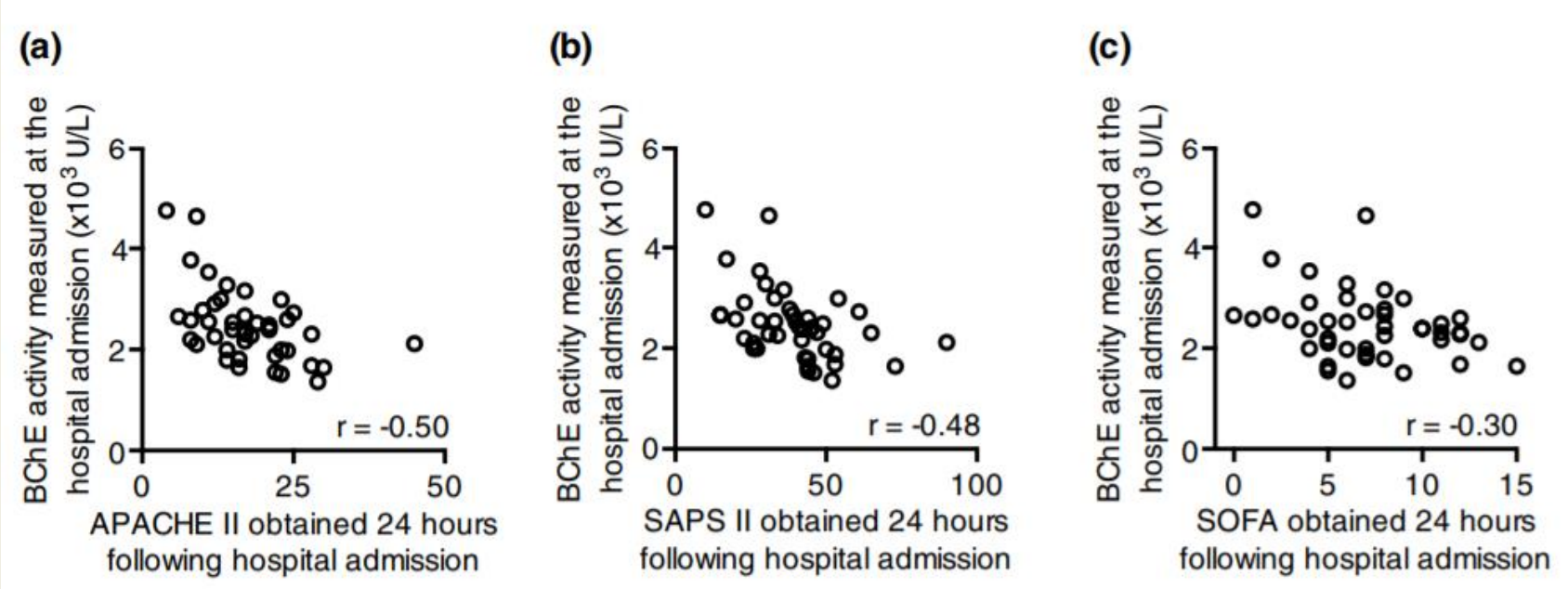
(e) CRP aktivitesi, hastaneye yatıştan 12 saat sonra başlayan sürekli bir artış olduğunu ortaya koydu.

(f) WBC'deki ilk yükselme 12 saat sonra azaldı ve gözlem süresi boyunca sabit kaldı.

ISS – Injury Severity Score

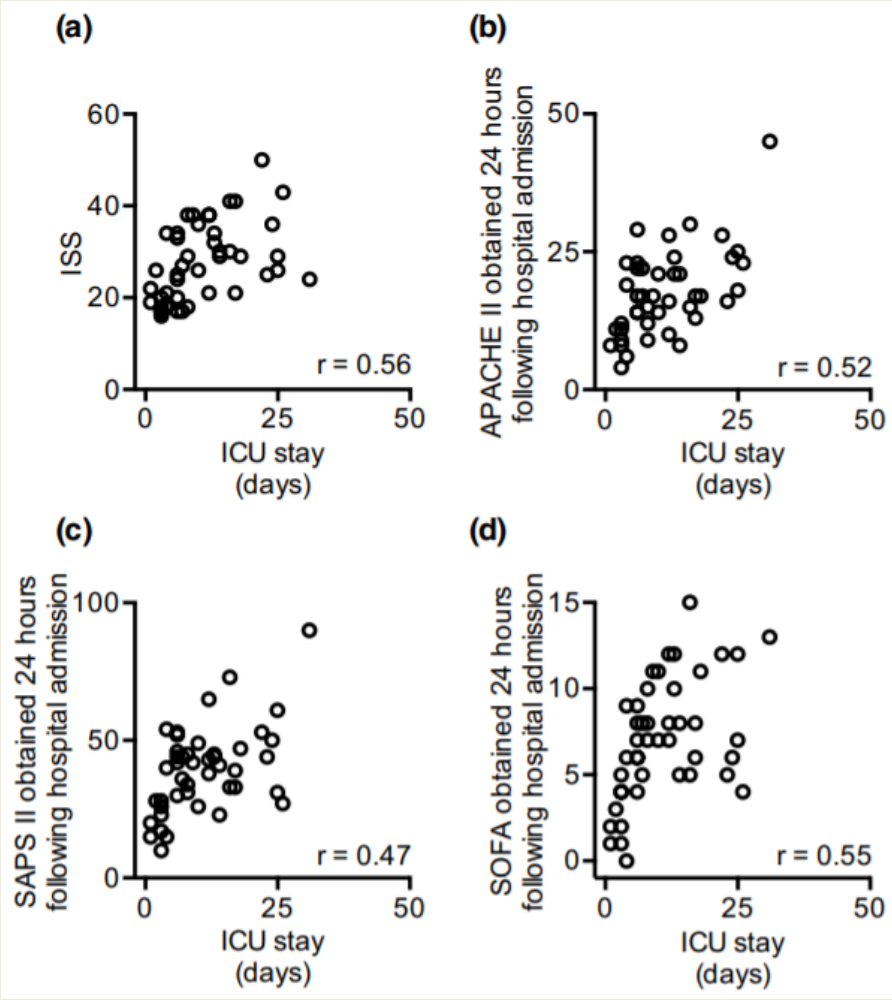
**p<0.01; ***p<0.001

Zivkovic AR, Schmidt K, Stein T, Münzberg M, Brenner T, Weigand MA, Kleinschmidt S, Hofer S. Bedside-measurement of serum cholinesterase activity predicts patient morbidity and length of the intensive care unit stay following major traumatic injury.

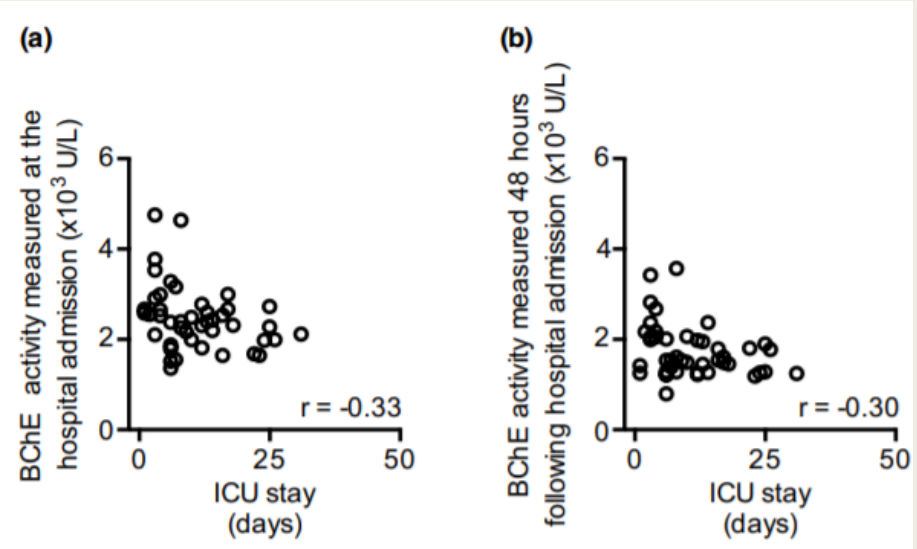


- Hastaneye kabulde ölçülen BChE aktivitesi, 24 saat sonra elde edilen hastalık şiddeti skorları ile ilişkilidir.
- Hastaneye kabulde majör travma hastalarından ölçülen BChE aktivitesinin ve 24 saat sonra elde edilen APACHE II (a), SAPS II (b) ve SOFA (c) skorlarının korelasyonu

Zivkovic AR, Schmidt K, Stein T, Münzberg M, Brenner T, Weigand MA, Kleinschmidt S, Hofer S. Bedside-measurement of serum cholinesterase activity predicts patient morbidity and length of the intensive care unit stay following major traumatic injury.



Hastalık şiddeti skorları, majör travmatik yaralanmayı (MTI) takiben YBÜ'de kalış süresiyle ilişkilidir.
(a) Elde edilen ISS puanı, ciddi şekilde yaralanan hastaların YBÜ'de kalış süresiyle ilişkilidir.
(b) APACHE II, (c) SAPS II ve (d) MTI'yi takiben hastaneye yatıştan 24 saat sonra alınan SOFA skorları, YBÜ'de kalış süresiyle ilişkilidir.



Hastaneye kabul sırasında ölçülen BChE aktivitesi, majör travmatik yaralanması olan hastalarda YBÜ'de kalış süresi ile ilişkilidir.

Hastaneye kabulde (a) ve 48 saat sonra (b) travma hastalarından ölçülen BChE aktivitesi, YBÜ'de kalış süreleri ile ilişkilidir.

Zivkovic AR, Schmidt K, Stein T, Münzberg M, Brenner T, Weigand MA, Kleinschmidt S, Hofer S. Bedside-measurement of serum cholinesterase activity predicts patient morbidity and length of the intensive care unit stay following major traumatic injury.

KLİNİKLE UYUMU - BAŞKA OLAYLARDA TANISAL DEĞERİ VAR MI ? - YAYINLAR

- RSHMB UZEM (Ulusal Zehir Danışma Merkezi) verilerine göre pestisit zehirlenmeleri 2000 yılında UZEM'e müracaat eden toplam hastaların %8,3 (1.518)'ünü, 2001 yılında ise %8,5 (1.472)'ini oluşturmuştur.
- Ayrıca RSHMB UZEM 2000-2001 verilerine göre; pestisit toksisitesi Türkiye'de en fazla 20- 29 yaş grubunda görüldüğünü bildirmiştir.

Dawson AH, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe SJ, et al. Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. PLoS Med, 2010; 26: 7(10); e 1000357.
Cesaretli Y, Özcan N, Özer N, Olcay HE. The evaluation of pesticide exposures in the years of 2000-2001 in Turkey. Refik Saydam Hygene Institute, Poison information Center data in the years of 2000-2001.

Harran Üniv Vet Fak Derg, 2017; 6 (1): 57-62 *Araştırma Makalesi*

GAP Bölgesi'nde Pestisit Satış Yerlerinde Çalışanlarda Kolinesteraz İnhibitörleri ve Karaciğer Enzim Düzeylerinin İncelenmesi

Fatma MUTLU[1*], Zeynep ŞİMŞEK[2], Mehmet CİCİ[3]

[1]Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.
[2] Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.
[3] Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

Tablo 2. Pestisit satış yerlerinde çalışanların çalışma sürelerine göre enzim düzeylerinin dağılımı

Çalışma Süresi	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	AChE
1 Yıldan az	17.4±8.9	13.8±8.4	78.5±36.6	7.3±0.7	4.2±0.4	274.4±226.2	9648.6±2280.1
1-9 Yıl	18.9±8.5	21.5±14.0	68.7±22.5	6.5±0.7	3.7±0.4	216.2±153.1	10046.4±2501.5
10 Yıl ve üzeri	19.7±9.0	27.6±16.9	66.6±14.0	6.4±0.5	3.5±0.4	176.7±34.4	10783.9±2540.9
F Değeri	1.795	28.950	6.226	58.563	88.965	7.648	4.475
P Değeri	0.167	0.0001	0.002	0.0001	0.0001	0.001	0.012

Tablo 3. Pestisit satış yerlerinde açıkta ürün satışı durumuna göre enzim düzeylerinin dağılımı

Açıkta Ürün Satılma Durumu	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	AChE
Evet	18.3±8.6	14.7±9.0	64.6±18.7	6.9±0.9	3.9±0.4	310.6±255.5	9354.8±2096.3
Hayır	18.3±9.3	19.3±14.0	6.9±0.8	3.9±0.4	3.9±0.5	231.4±181.7	10051.5±2458.5
T Değeri	-0.003	-2.241	-2.340	-0.363	-0.368	2.621	-1.865
P Değeri	0.997	0.026	0.020	0.717	0.713	0.009	0.063

Tablo 4. Pestisit satış yerlerinde muhafazalı oda olma durumuna göre enzim düzeylerinin dağılımı

Muhafazalı Oda Durumu	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	AChE
Evet	18.3±9.6	17.9±12.9	71.3±22.9	6.9±0.8	4.0±0.5	247.9±200.8	9887.4±2447.7
Hayır	18.4±7.4	21.7±15.2	76.4±34.2	6.7±0.7	3.8±0.5	222.3±166.1	10212.9±2274.3
T Değeri	-0.083	-2.105	-1.487	1.797	2.061	0.996	-1.019
P Değeri	0.934	0.036	0.138	0.073	0.040	0.320	0.309

Tablo 5. Pestisit satış yerlerinde havalandırma düzeni bulunma durumuna göre dağılımı

Havalandırma Düzeni	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	AChE
Evet	18.1±10.2	16.3±12.1	73.4±28.0	7.1±0.8	4.1±0.5	263.1±224.1	9791.5±2493.8
Hayır	18.7±7.7	21.9±14.6	71.6±23.1	6.7±0.7	3.8±0.5	214.6±143.6	10213±2308.6
T Değeri	-0.635	-3.775	0.609	4.973	6.085	2.233	-1.559
P Değeri	0.934	0.0001	0.543	0.001	0.0001	0.026	0.312

Tablo 6. Pestisit satış yerlerinde çalışanların pestisit uygulamasında çalışma durumuna göre enzim düzeylerinin dağılımı

Pestisit Uygulama Durumu	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	AChE
Evet	20.1±12.2	13.7±7.9	69.8±25.4	7.5±0.7	4.2±0.5	338.0±299.9	9847.3±2326.6
Hayır	16.7±8.1	13.4±8.6	75.1±28.2	7.2±0.7	4.2±0.4	263.7±211.7	9329.9±2295.5
T Değeri	2.235	0.248	-1.215	2.388	0.617	1.947	1.411
P Değeri	0.027	0.804	0.226	0.018	0.538	0.053	0.160

Turk J Anaesth Reanim 2015; 43: 381-6 DOI: 10.5152/TJAR.2015.32848

Adıyaman İli Bölgesinde Psödokolinesteraz Enzim Eksikliği

Pseudocholinesterase Enzyme Deficiency in Adıyaman City Area

Ruslan Abdullayev[1], Ömer Burak Küçükebe[1], Recai Kaya[1], Bülent Çelik[2], Hatice Kuşderci[1], Mehmet Duran[1], Öznur Uludağ[1], Mesut Öterkuş[1], Aysel Buyrukcan[1], Ülkü Sabuncu[1], Abdullah Arpacı[3]

[1]*Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, Adıyaman, Türkiye*

[2]*Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoistatistik Bölümü, Ankara, Türkiye*

[3]*Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye*

Psödokolinesteraz (PKE), süksinilkolinin (depolarizan bir nöromüsküler bloker) hidrolizinden sorumludur.

PKE süksinilkolini önce süksinilmonokolin, daha sonra da süksinik aside metabolize ederek etkisini sonlandırmaktadır.

Eksikliğinde, normal koşullarda yaklaşık olarak 5-10 dakika süren süksinilkolinin etkisi uzamakta ve birkaç saate kadar sürebilmektedir.

Tablo 3. Cinsiyete göre PKE eksikliği

	PKE düzeyi			
	Normal		Düşük	
Cinsiyet	n	%	n	%
Erkek (n=262)	249	95,0	13	5,0
Kadın (n=702)*	646	92,0	56	8,0

*16-40 yaş arası kadınlar için farklı referans aralığı alınmıştır (bk. Gereç ve yöntemler). PKE: psödokolinesteraz

Yeni hızlı ve kısa etkili non-depolarizan nöromüsküler blokerlerin kullanıma girmesi ile birlikte süksinilkolin kullanımını klinik pratikte giderek azalmıştır, fakat zor havayolu, tok hasta, elektrokonvülzif tedavi gibi durumlarda hâlâ klinisyenlerin ilk tercihi olmaya devam etmektedir.

Kullanım endikasyonu olan durumlarda, hastanın PKE enziminin olası eksikliği düşünülmelidir.

ERITROSIT MEMBRAN ACHE AKTIVITESI - HASTALIK ILISKISI

- Yaşlı insanlarda ve yenidoğanlarda azalmış eritrosit AChE aktivitesi kanıtlanmıştır.
- Farklı yaşlardaki eritrositlerin in vitro olarak hazırlanan alt fraksiyonları, yasli RBC'lerin genç RBC alt popülasyonlarından daha düşük bir AChE enzim aktivitesi sergilediğini, eritrosit AChE'nin yaşlanmanın biyobelirteci olarak kabul edildiğini göstermistir.
- Paroksismal noktürnal hemoglobinürili hastalar ve hemolitik anemili hastalarda, düşük eritrosit AChE seviyeleri karakteristiktir.

Jaromin A., Korycińska M., Piętka-Ottlik M., Musiał W., Peczyńska-Czoch W., Kaczmarek L., Kozubeka A. Membrane perturbations induced by new analogs of neocryptolepine. Biol. Pharm. 2012;35:1432–1439.
Herz F., Kaplan E. A Review: Human erythrocyte acetylcholinesterase. Pediatr. Res. 1973;7:204–214.
Hilário S., Saldanha C., Martins e Silva J. An in vitro study of adrenaline effect on human erythrocyte properties in both gender. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2003;28:89–98.
Prall Y.G., Gambhir K.K., Ampy F.R. Acetylcholinesterase: An enzymatic marker of human red blood cell aging. *Life Sci.* 1998;63:177–184.

ERITROSIT MEMBRAN ACHE AKTIVITESI - HASTALIK ILISKISI

- Rutin anjiyografi yapilan insülin bagimli olmayan DM hastalarında, RBC AChE enzim aktivitesinde bir bozulma ve floresein enjeksiyonundan sonra hidrofobik eritrosit membraninda akışkanlıkta azalma gosterilmistir.
- **Parkinson, esansiyel hipertansiyon, glokom, retinal vaskülit, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Hirschsprung hastalığı gibi farklı hastalıklardan muzdarip hastalardan alınan kan örneklerinde gerceklestirilen çalışmalar, RBC AChE enzim aktivitesinin artmış seviyelerini gostermektedir.** – TANISAL BELIRTEC ?

Prall Y.G., Gambhir K.K., Ampy F.R. Acetylcholinesterase: An enzymatic marker of human red blood cell aging. Life Sci. 1998;63:177–184.
Sargento L., Zabala L., Saldanha C., Ramalho P.S., Silva J.M. The effect of sodium fluorescein angiography on erythrocyte properties. Clin. Hemorheol. Microcirc. 1998;18:135–139.
Coelho H., Azevedo M., Proença C., Martins e Silva J., Manso C. Plasma dopamine-beta-hydroxylase and erythrocyte acetylcholinesterase in a group of patients with Parkinson disease. J. Neur. Transm. 1978;42:163–166.
Martins e Silva J., Proença M.C., Nogueira J.B., Clara J.G., Costa J.N., Manso C. Erythrocyte acetylcholinesterase in essential hypertension. J. Neural Transm. 1980;49:127–132.
Zabala L., Saldanha C., Martins e Silva J., Ramalho P.S. Red blood cell membrane integrity in primary open angle glaucoma: Ex vivo and in vitro studies. Eye. 1999;13:101–103.
Ramalho P.S., Hormigo A., Martins R., Saldanha C., Martins Silva J. Haematological changes in retinal vasculitis. Eye. 1988;2:278–282.
Duarte C., Pinto S., Napoleão P., Pronto-Laborinho A.C., Barros M.A., Freitas T., de Carvalho M., Saldanha C. Identification of erythrocyte biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2016;64:989–994.
Chalkoo M.A., Rashid A., Kakroo S.M., Razvi S.A., Wani A.A. Role of erythrocyte acetylcholinesterase in the diagnosis of hirschsprung's Disease. J. Pioneer. Med. Stud. 2013;3:79–82.

ERITROSIT MEMBRAN ACHE AKTIVITESI - HASTALIK ILISKISI

- RBC'lerde artmis AChE enzim aktivitesi, kanda yüksek inflamatuar molekül konsantrasyonları, ROS ve reaktif nitrojen türlerinin varlığı ile karakterize edilen inflamatuar vasküler hastalıklar olan glokom, esansiyel hipertansiyon ve ALS'de doğrulanmıştır.
- Sonuç olarak, eritrosit AChE, inflamasyonun bir belirteci olarak kabul edilebilir ?

Martins e Silva J., Proença M.C., Nogueira J.B., Clara J.G., Costa J.N., Manso C. Erythrocyte acetylcholinesterase in essential hypertension. J. Neural Transm. 1980;49:127–132.
Zabala L., Saldanha C., Martins e Silva J., Ramalho P.S. Red blood cell membrane integrity in primary open angle glaucoma: Ex vivo and in vitro studies. Eye. 1999;13:101–103.
Chalkoo M.A., Rashid A., Kakroo S.M., Razvi S.A., Wani A.A. Role of erythrocyte acetylcholinesterase in the diagnosis of hirschsprung's Disease. J. Pioneer. Med. Stud. 2013;3:79–82.
Harrison D.G., Guzik T.J., Lob H.E., Madhur M.S., Marvar P.J., Thabet S.R., Vinh A., Weyand C.M. Inflammation, immunity, and hypertension. Hypertension. 2011;57:132–140.
Galassi F., Renieri G., Sodi A., Ucci F., Vannozzi L., Masini E. Nitric oxide proxies and ocular perfusion pressure in primary open angle glaucoma. Br. J. Ophtalmol. 2004;88:757–760.
Rafael R. Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of its functional effects. Acc. Chem. Res. 2013;46:550–559.
Silva-Herdade A.S., Saldanha C. Effects of acetylcholine on an animal model of inflammation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2013;53:195–202.

Biomed Chromatogr. 2017 Oct;31(10). doi: 10.1002/bmc.3971. Epub 2017 Apr 18.

A novel assay to determine acetylcholinesterase activity: The application potential for screening of drugs against Alzheimer's disease

Liang Peng [1,2], Zhengxing Rong [1], Hao Wang [1], Biyun Shao [1], Lei Kang [1], Hong Qi [1], Hongzhuan Chen [1]

Affiliations + expand

PMID: 28295437 DOI: 10.1002/bmc.3971

Abstract

Acetycholinesterase (AChE) that regulates hydrolysis of acetylcholine (ACh) in the brain, is an important target for treatment of Alzheimer's disease (AD), a feature of which is ACh deficiency. However, the methods to precisely determine AChE activity are still under development. We developed a new method to exploit acetylcholine-d_4 as a surrogate substrate of ACh and measure product choline-d_4 via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This assay detected activity of AChE present in the normal mouse brain, which is consistent with the standard Ellman assay that determines products spectrophotometrically. In AD mouse models, the result of LC-MS/MS assay showed significant higher AChE activity than that seen in control normal mice, while treatment of AD mice with an AChE inhibitor, huperzine A, led to partial decreases in AChE activity. Our results suggest that this surrogate-based LC-MS/MS method is a new, sensitive and convenient assay for the determination of AChE activity, providing a useful means for screening active compounds that target AChE.

Keywords: HILIC; LC-MS/MS; acetycholinesterase; acetylcholine; surrogate analyte.

- **Cholinergic deficiency in AD** has received noticeable attention to target **AChE for disease therapy.**
- **AchE inhibitors including galantamine, rivastigmine and donepezil are currently the most important first-line treatments for AD.**
- Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-ESI-MS assay has been currently developed to improve the method.
- *To eliminate endogenous butyrylcholinesterase activity present in tissue, 10 µL of 2 mM iso-OMPA (tetraisopropyl pyrophosphoramide)* in tris buffer was added to 10 µL brain homogenate supernatants

- ***We developed a new method to exploit acetylcholine-d_4 as a surrogate substrate of ACh and measure product choline-d_4 via LC-MS/MS.***
- ***This assay detected activity of AChE present in the normal mouse brain, which is consistent with the standard Ellman assay that determines products spectrophotometrically.***

Lassiter TL, Marshall RS, Jackson LC, Hunter DL, Vu JT and Padilla S. (2003). Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. Toxicology; 186 (3): 241-53.
Naik RS, Doctor BP and Saxena A. (2008). Comparison of methods used for the determination of cholinesterase activity in whole blood. Chem Biol Interact, 175 (1-3): 298-302.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
journal homepage: www.elsevier.com/locate/burns
ELSEVIER
BURNS

Point-of-care measured serum cholinesterase activity predicts patient outcome following severe burns

Karsten Schmidt[a,1,2], Aleksandar R. Zivkovic[a,1,], Martin Thiele[b,3], Johannes Horter[c,4], Thorsten Brenner[a,2], Markus A. Weigand[a], Stefan Kleinschmidt[b,5], Stefan Hofer[a,d]*

[a] *Department of Anesthesiology, Heidelberg University Hospital, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg, Germany*
[b] *Department of Anaesthesia, Intensive Care Medicine and Pain Therapy, BG Trauma Center Ludwigshafen/Rhine, Ludwig-Guttmann-Str. 13, 67071 Ludwigshafen, Germany*
[c] *Department of Hand, Plastic and Reconstructive Surgery-Burn Center, BG Trauma Center Ludwigshafen/Rhine, Ludwig-Guttmann-Str. 13, 67071 Ludwigshafen, Germany*
[d] *Clinic for Anesthesiology, Intensive Care, Emergency Medicine I and Pain Therapy, Westpfalz Hospital, Hellmut-Hartert-Str. 1, 67655 Kaiserslautern, Germany*

- Serum kolinesterazın (BChE) yanıklar dahil akut enflamatuar hastalıklarda klinik olarak ilgili bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir.
- Bu gözlemsel kohort çalışmasında BChE aktivitesi POCT kullanılarak ölçülmüştür.
- POCT ölçümleri, 35 hastanın acil servise kabulünde yapılmış ve 12, 24 ve 48 saat sonra tekrarlanmıştır.
- Yanık yaralanması olan hastaların, hastaneye kabulünü takiben BChE aktivitesinde sürekli azalma gözlemlenmiştir. BChE aktivitesi, yanık yaralanma şiddeti, organ yetmezliği şiddeti ve yoğun bakım ünitesi kaynak gereksinimleri ile negatif korelasyon göstermiştir.
- Son olarak, POCT tarafından ölçülen BChE aktivitesi, kısaltılmış yanık ciddiyet indeksi (ABSI) skorlamasını tamamlayabilir ve akut yanık bakımı tedavisinde muhtemelen erken risk sınıflandırmasını iyileştirebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Indian J Pathol Microbiol. Apr-Jun 2021;64(2):266-276. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_567_19.

Estimation of plasma and RBC acetylcholinesterase in children: An evaluation tool for Hirschsprung's disease?

Neha Kuvelkar [1], Serena DSouza [1], K Vidhyashree [2], Gowri Shankar [3], Maria Frances Bukel [2], Santosh Noronha [1], Usha Kini [2]

Affiliations – collapse

Affiliations

1 Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology, Bombay, Powai, Maharashtra, India.
2 Department of Pathology, St. John's Medical College, Bengaluru, Karnataka, India.
3 Department of Paediatric Surgery, Indira Gandhi Institute of Child Health Hospital, Bengaluru, Karnataka, India.

Özet

Background: Rektal mukozal biyopsilerin donmuş kesitlerinde artmış asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, Hirschsprung hastalığını (HD) doğru bir şekilde teşhis eder. Ancak bir tarama testi olarak kanda bir biyobelirteç arayışı, kişiyi kanda AChE'yi aramaya ve bunun HD teşhisindeki rolünü incelemeye yönlendirir.

Amaç: Normal çocuklarda plazma ve eritrositlerde AChE aktivitesini tahmin etmek için düşük maliyetli güvenilir bir yöntem geliştirmek (kontrol) ve bunun HD'deki rolünü incelemek (test).

Materyal ve metod: Kan için AChE testi.... rektal mukozal biyopsilerin altın standart doku AChE histokimyası ile karşılaştırılmıştır..

Results: Ellman'ın optimum modifiye edilmiş metotları, plazma AChE aktivitesini analiz etmek için en uygun bulundu, Wilson ve Henderson'ın metodu, RBC'lerde ekstraksiyon ve AChE tahmini için optimaldi....

Conclusion: Test kan örnekleri için belirlenen, birbirini dışlayan AChE aktivite aralığı normal ile örtüştü ve bu nedenle HD IÇIN BIR TANI ARACI OLARAK KABUL EDILMEDI.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz enzim testi; Ellman yöntemi; Hirschsprung hastalığı; plazma; Kırmızı kan hücreleri.

Toxicology 258 (2009) 79–83

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Comparison of the oxime-induced reactivation of rhesus monkey, swine and guinea pig erythrocyte acetylcholinesterase following inhibition by sarin or paraoxon, using a perfusion model for the real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity

Nadja M. Herkert[a], Guy Lallement[b], Didier Clarençon[b], Horst Thiermann[a], Franz Worek[a,*]

[a] Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstrasse 11, 80937 Munich, Germany
[b] Unité de Neuropharmacologie, CRSSA, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche Cedex, France

AChE aktivitesi, bir akış detektöründe online analiz edildi

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 December 2008
Received in revised form 7 January 2009
Accepted 8 January 2009
Available online 20 January 2009

Keywords:
Acetylcholinesterase
Erythrocyte
Organophosphorus compounds
Inhibition
Reactivation
Kinetic analysis

ABSTRACT

Recently, a dynamically working in vitro model with real-time determination of membrane-bound human acetylcholinesterase (AChE) activity was shown to be a versatile model to investigate oxime-induced reactivation kinetics of organophosphate- (OP) inhibited enzyme. In this assay, AChE was immobilized on particle filters which were perfused with acetylthiocholine, Ellman's reagent and phosphate buffer. Subsequently, AChE activity was continuously analyzed in a flow-through detector. Now, it was an intriguing question whether this model could be used with erythrocyte AChE from other species in order to investigate kinetic interactions in the absence of annoying side reactions. Rhesus monkey, swine and guinea pig erythrocytes were a stable and highly reproducible enzyme source. Then, the model was applied to the reactivation of sarin- and paraoxon-inhibited AChE by obidoxime or HI 6 and it could be shown that the derived reactivation rate constants were in good agreement to previous results obtained from experiments with a static model. Hence, this dynamic model offers the possibility to investigate highly reproducible interactions between AChE, OP and oximes with human and animal AChE.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

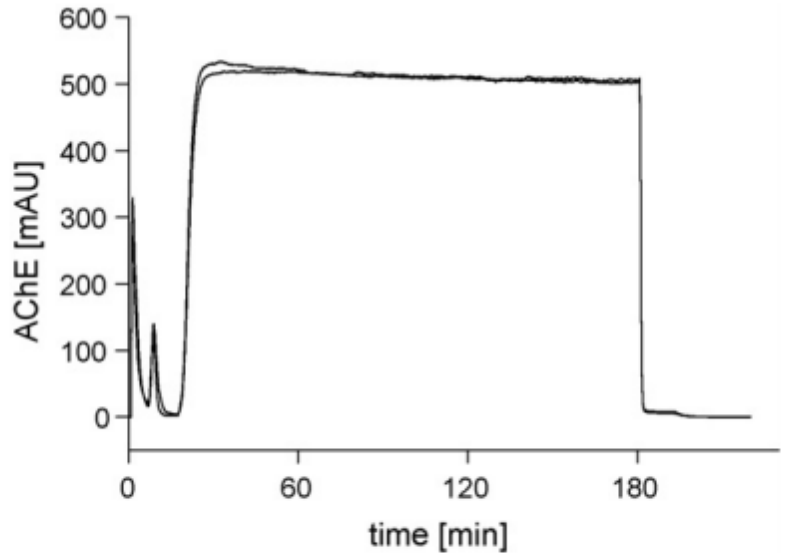


Fig. 1. Time course of AChE activity using freshly drawn (solid line) and deep-frozen human red blood cell (dashed line) after addition of substrate ATCh and DTNB.

- Enzim reaktörünün eklenmesinden sonra, RBC'lerin hemolizinden ve dolayısıyla hemoglobinin yıkanmasından kaynaklanan iki kısa süreli pik meydana gelmektedir.
- Ach (0.45 mM, 30 dakika) ekledikten sonra, absorbans değerleri yaklaşık 500 mAU'ya yükselmis ve bu seviyede sabit kalmistir.
- t = 180 dakikada blank değerler (DTNB, asetiltiyokolin ve jelatin içeren fosfat tamponu), enzim reaktörünün çıkarılması ve tampon blank başlangıç değerine dönmesinden önce boş bir filtre yerleştirilmesiyle belirlenmiştir.

Herkert NM, Lallement G, Clarençon D, Thiermann H, Worek F. Comparison of the oxime-induced reactivation of rhesus monkey, swine and guinea pig erythrocyte acetylcholinesterase following inhibition by sarin or paraoxon, using a perfusion model for the real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity. Toxicology. 2009;258(2-3):79-83.

AChE'nin sarin ve paraoxon (PXE) ile inhibisyonu takiben oksimlerle yeniden aktivasyonu

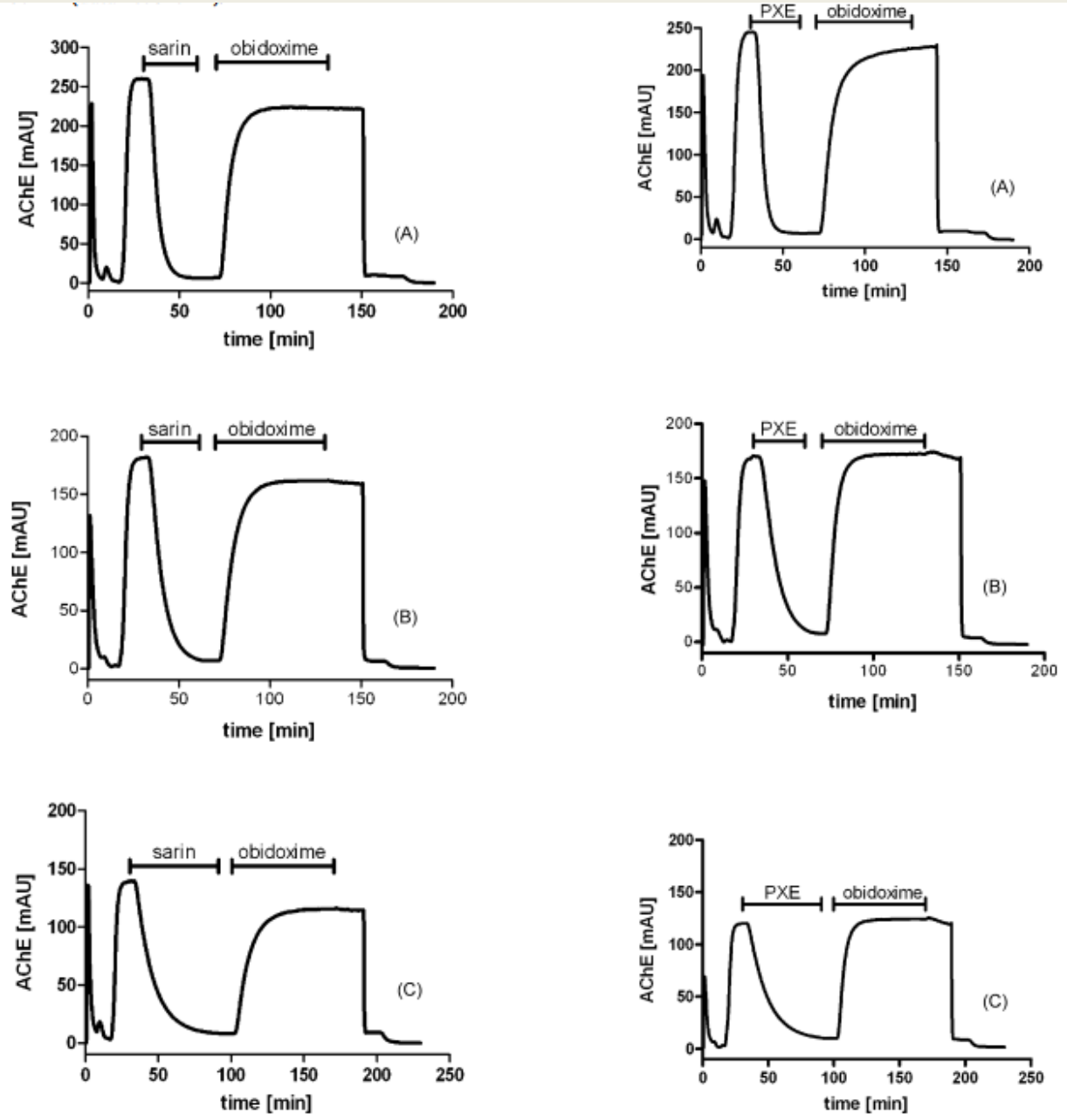


Fig. 2. Time course of AChE activity from deep-frozen and thawed rhesus monkey (A), swine (B) and guinea pig erythrocytes (C) **after inhibition with sarin (50 nM) for 30 min (rhesus monkey and swine) or 60 min (guinea pig) and reactivation with obidoxime (10 M).**
Following the equilibration phase, the enzyme was inhibited with sarin (30 or 60 min). Then, sarin was discontinued and after a 10 min washout phase, reactivation started with addition of 10 M obidoxime. After 130 min (rhesus monkey and swine) or 160 min (guinea pig), obidoxime was discontinued and **the values of reactivated AChE with ATCh, DTNB and buffer were determined.** After 150 min (rhesus monkey and swine) or 190 min (guinea pig), the enzyme reactor was replaced by a blank filter and the blank values of the complete perfusion medium, and gelatine buffer only were determined.

Fig. 3. Time course of AChE activity from deep-frozen and thawed of rhesus monkey (A), swine (B) and guinea pig erythrocytes (C) **after inhibition with paraoxon (PXE; 1 M) for 30 min (rhesus monkey and swine) or 60 min (guinea pig) and reactivation with obidoxime (10 M).** Following the equilibration phase, the enzyme was inhibited with paraoxon (30 or 60 min). Then, paraoxon was discontinued and after a 10 min washout-phase, reactivation started with addition of 10 M obidoxime. After 130 min (rhesus monkey and swine) or 160 min (guinea pig), obidoxime was discontinued and **the values of reactivated AChE with ATCh, DTNB and buffer were determined.** After 150 min (rhesus monkey and swine) or 190 min (guinea pig), the enzyme reactor was replaced by a blank filter and the blank values of the complete perfusion medium, and gelatine buffer only were determined.

AChE, acetylcholinesterase; ATCh, acetylthiocholine iodide; DTNB, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

Herkert NM, Lallement G, Clarençon D, Thiermann H, Worek F. Comparison of the oxime-induced reactivation of rhesus monkey, swine and guinea pig erythrocyte acetylcholinesterase following inhibition by sarin or paraoxon, using a perfusion model for the real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity. Toxicology. 2009;258(2-3):79-83.

Toxicology Letters 209 (2012) 173–178

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase

Nadja M. Herkert[a], Gregor Freude[b], Ulrich Kunz[b], Horst Thiermann[a], Franz Worek[a,*]

[a] Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Munich, Germany
[b] Department of Neurosurgery, Military Hospital, Ulm, Germany

AChE aktivitesi, bir akış detektöründe online analiz edildi

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 December 2011
Received in revised form
20 December 2011
Accepted 23 December 2011
Available online 2 January 2012

Keywords:
Acetylcholinesterase
Enzyme kinetics
Erythrocyte
Brain
Oxime
Organophosphorus compound

ABSTRACT

There is an ongoing debate whether oximes can effectively counteract the effects of organophosphorus compounds (OP) on brain acetylcholinesterase (AChE) activity and whether there are differences in the kinetic properties of brain and erythrocyte AChE. In order to investigate the kinetics of AChE from different tissues and species the well established dynamically working in vitro model with real-time determination of membrane-bound AChE activity was adapted for use with brain AChE. The enzyme reactor, that was loaded with brain, erythrocyte or muscle AChE, was continuously perfused with substrate and chromogen while AChE activity was on-line analyzed in a flow-through detector. It was possible to determine the Michaelis–Menten constants of human erythrocyte, muscle and brain AChE which were almost identical. In addition, the inhibition kinetics of sarin and paraoxon as well as the reactivation kinetics of obidoxime and HI 6 were determined with human, swine and guinea pig brain and erythrocyte AChE. It was found that the inhibition and reactivation kinetics of brain and erythrocyte AChE were highly comparable in all tested species. These data support the view that AChE from different tissue has similar kinetic properties and that brain AChE is comparably susceptible toward reactivation by oximes.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Sarin (30 nM) ile inhibisyondan ve obidoksim (10 M) ile yeniden aktivasyondan sonrasinda, insan eritrositlerinde (taranmış kırmızı çizgi) ve beyin dokusunda (düz mavi çizgi) AChE aktivitesinin zaman süreci

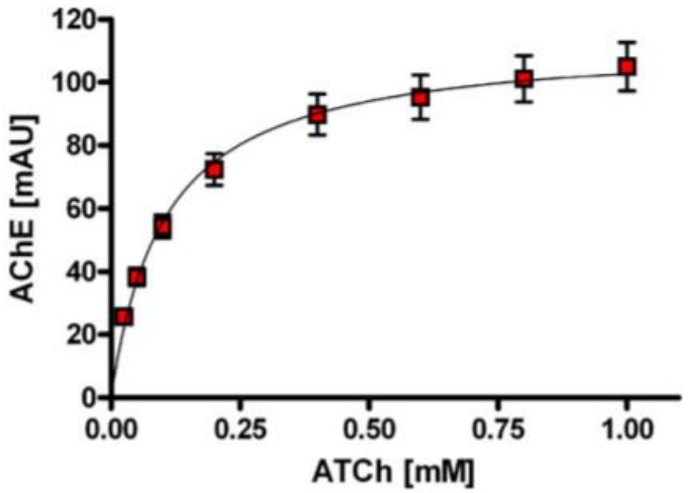
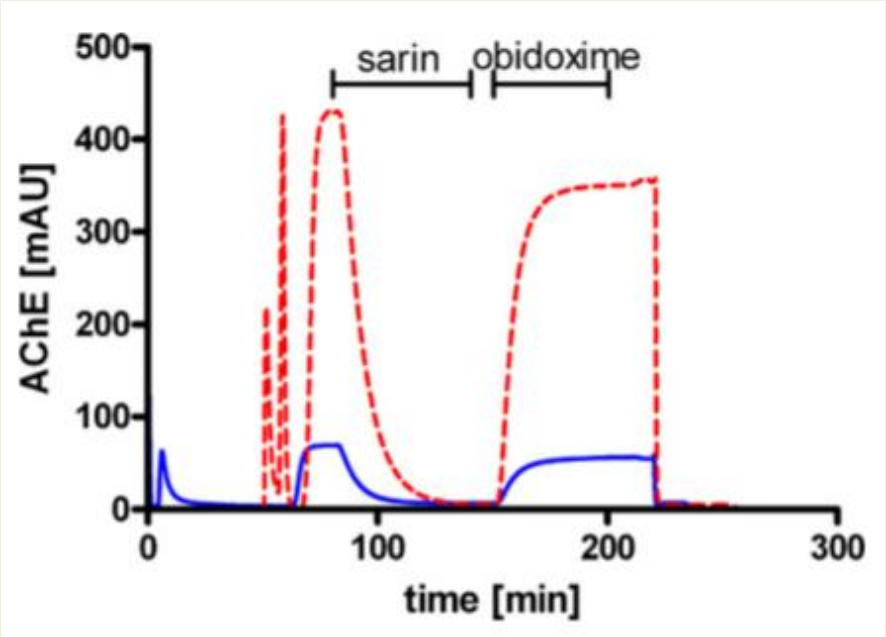


Fig. 2. Calculated Michaelis–Menten curve of human brain AChE upon perfusion with different ATCh concentrations (0.025–1.0 mM). The Michaelis–Menten constants K_m are shown in Table 2.

Table 1
Michaelis–Menten constants (K_m) of human erythrocyte, muscle and brain AChE.

Enzyme source	K_m [μM]	R^2
Erythrocyte	92.3 ± 3.8	0.997 ± 0.001
Muscle tissue	92.4 ± 11.3	0.998 ± 0.001
Brain tissue	101.1 ± 6.5	0.995 ± 0.001

The data are given as K_m (μM) and are means ± SD of 6 experiments.

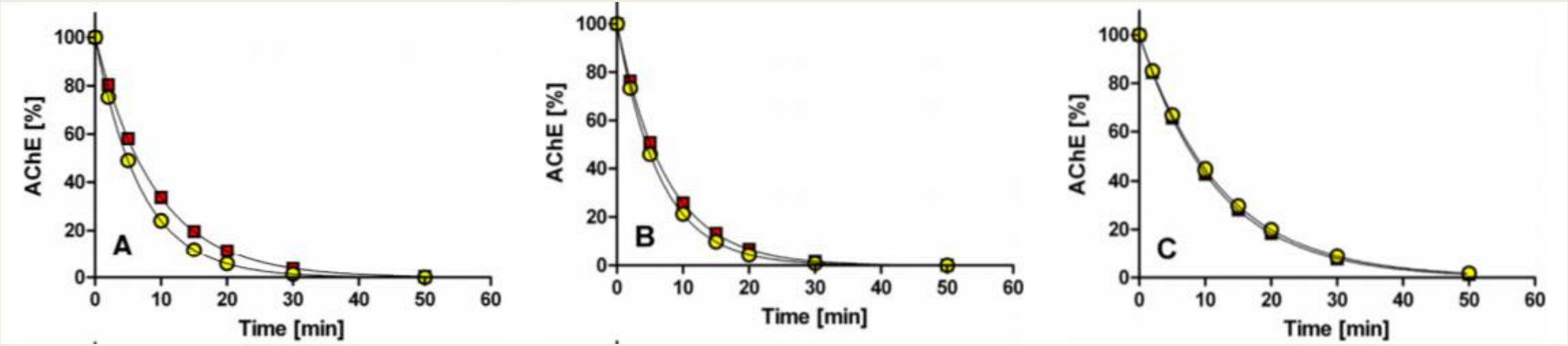


Mavi çizgi:
0.45 mM ATCh eklenmeden önce biyoreaktör 60 dakika boyunca 0.3 mM DTNB ile yıkandı.
↓
Maksimum aktiviteye ulaştıktan sonra, 60 dakika süreyle 30 nM sarin eklendi.
↓
10 dakikalık bir arınma aşamasından sonra, yeniden aktivasyon 10 M obidoksim uygulanarak başlatıldı.

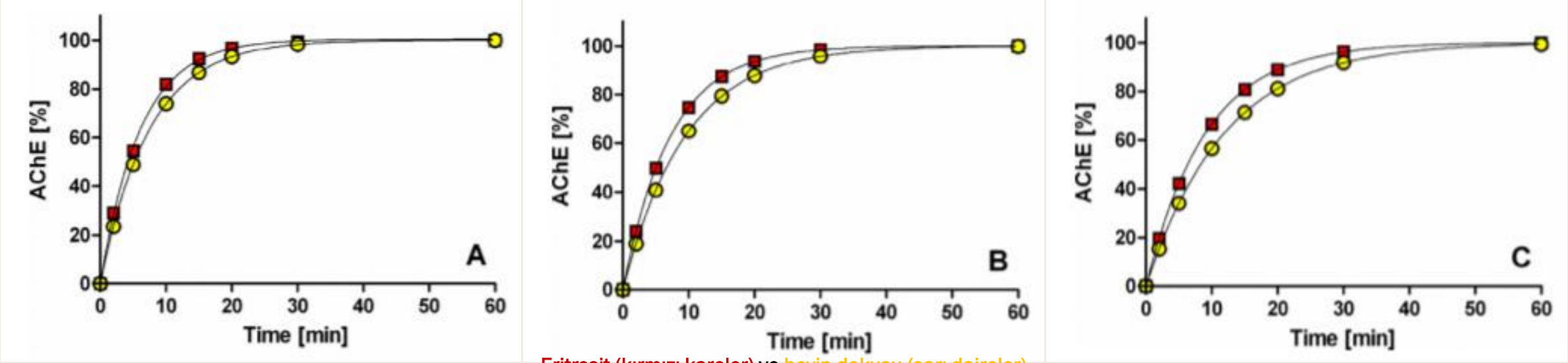
Kirmizi çizgi:
Maksimum aktiviteyi belirlemek için 0,3 mM DTNB ve 0,45 mM ATCh eklenmeden önce, enzim reaktörüne jelatin içeren fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4), distile su (eritrositlerin hemolizini kolaylaştırmak için) 5 dakika boyunca perfüze edildi↓
Maksimum aktiviteye ulaştıktan sonra, 60 dakika süreyle 30 nM sarin eklendi.
↓
Devami soldaki gibi

Herkert NM, Freude G, Kunz U, Thiermann H, Worek F. Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase. Toxicol Lett. 2012 Mar 7;209(2):173-8.

İnsan (A), swine (B) ve guinea pig (C) AChE'nin sarin (insan için 30 nM, kobay ve domuz AChE için 50 nM) tarafından hesaplanan zamana bağlı inhibisyonu.



Sarin ile inhibe edilmiş insan (A), swine (B) ve guinea pig (C) AChE'nin (insan için 30 nM ve swine ve guinea pig AChE için 50 nM) obidoksim (10 M) ile hesaplanan zamana bağlı reaktivasyonu



Eritrosit (kırmızı kareler) ve beyin dokusu (sarı daireler)

Herkert NM, Freude G, Kunz U, Thiermann H, Worek F. Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase. Toxicol Lett. 2012 Mar 7;209(2):173-8.

Conclusions;

- Michaelis-Menten kinetiğinin belirlenmesi, test edilen enzim türlerinin neredeyse aynı Km değerlerine sahip oldugunu gosterdi.
- Ek olarak, beyin ve eritrosit AChE'nin inhibisyon ve reaktivasyon kinetiği oldukça benzerdi.
- Bu veriler, farklı dokulardan AChE'nin neredeyse benzer kinetik özelliklere sahip olduğu ve beyin AChE'nin oksimler tarafından reaktivasyona karşı karşılaştırılabilir şekilde duyarlı olduğu görüşünü desteklemektedir.

Herkert NM, Freude G, Kunz U, Thiermann H, Worek F. Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase. Toxicol Lett. 2012 Mar 7;209(2):173-8.

GUNUMUZ - GELECEK

sensors MDPI

Communication

A Smartphone Camera Colorimetric Assay of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activity

Miroslav Pohanka * and Jitka Zakova

Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Trebesska 1575, CZ-50001 Hradec Kralove, Czech Republic; jitka.zakova@unob.cz
* Correspondence: miroslav.pohanka@unob.cz

Abstract: Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) can serve as biochemical markers of various pathologies like liver disfunction and poisonings by nerve agents. Ellman's assay is the standard spectrophotometric method to measure cholinesterase activity in clinical laboratories. The authors present a new colorimetric test to assess AChE and BChE activity in biological samples using chromogenic reagents, treated 3D-printed measuring pads and a smartphone camera as a signal detector. Multiwell pads treated with reagent substrates 2,6-dichlorophenolindophenyl acetate, indoxylacetate, ethoxyresorufin and methoxyresorufin were prepared and tested for AChE and BChE. In the experiments, 3D-printed pads containing indoxylacetate as a chromogenic substrate were optimal for analytical purposes. The best results were achieved using the red (R) channel, where the limit of detection was 4.05 μkat/mL for BChE and 4.38 μkat/mL for AChE using a 40 μL sample and a 60 min assay. The major advantage of this method is its overall simplicity, as samples are applied directly without any specific treatment or added reagents. The assay was also validated to the standard Ellman's assay using human plasma samples. In conclusion, this smartphone camera-based colorimetric assay appears to have practical applicability and to be a suitable method for point-of-care testing because it does not require specific manipulation, additional education of staff or use of sophisticated analytical instruments.

Keywords: Carbamate; cholinesterase; diagnosis; Ellman's assay; image analysis; inhibition; liver function test; organophosphate; point-of-care

check for updates

Citation: Pohanka, M.; Zakova, J. A Smartphone Camera Colorimetric Assay of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activity. *Sensors* **2021**, *21*, 1796. https://doi.org/10.3390/s21051796

Akıllı telefon kamerası tabanlı kolorimetrik kolinesteraz aktivitesi analizinin, AChE, BChE veya her ikisinin de biyokimyasal birbiyomarker olarak rol oynadığı bakım noktası testi için güvenilir bir araç olduğunu kanıtlanmıştır.

Test, standart spektrofotometriye benzer sonuçlar sağlamıştır.

Testin özellikleri, bir bakım noktası testi için ümit vericidir ve mevcut klinik ve evde bakım uygulamalarına kolayca uyarlanabilir hale getirmektedir.

Akıllı telefon kamerası tabanlı kolorimetrik test, aynı zamanda bakım noktası testlerinin ortak gereksinimlerini ve beklentilerini de karşılamaktadır: basitlik, taşınabilirlik, numunelerle ayrıntılı işlem yapılmaması, düşük maliyet, zararlı reaktiflerin kullanılmaması vb.

Pohanka M, Zakova J. A Smartphone Camera Colorimetric Assay of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activity. *Sensors (Basel)*. 2021;21(5):1796.

Multiwall Carbon Nanotube-Based Acetylcholinesterase Biosensor for Detecting Organophosphorous Pesticides

Buy Article:
$107.10 + tax
(Refund Policy)
ADD TO CART
BUY NOW

Authors: Sun, Xia; Wang, Xiangyou; Zhao, Wenping
Source: Sensor Letters, Volume 8, Number 2, April 2010, pp. 247-252(6)
Publisher: American Scientific Publishers
DOI: https://doi.org/10.1166/sl.2010.1257

6

In order to develop a biosensor for detecting the organophosphate pesticides residues, a novel acetylcholinesterase biosensor based on immobilized enzyme membrane-electrode separating sensor was proposed, in which electrode was modified with multiwall carbon nanotubes, and acetylcholinesterase was cross-linked with glutaraldehyde and then attached to chitosan membrane. During the detection, the enzyme membrane was fixed on the surface of multiwall carbon nanotubes/glassy carbon electrode with O-ring and thus the amperometric acetylcholinesterase-multiwall carbon nanotubes/glassy carbon electrode sensor was used for detecting organophosphate pesticides. The new sensor exhibited good electrocatalytic behavior towards the electro-oxidation of thiocholine. Thus amplified response current of the biosensor and improved detection sensitivity. Based on the inhibition of organophosphate pesticides to the enzymatic activity of acetylcholinesterase, using dichlorvos as a model compound, the conditions for detecting the pesticide were explored. Under optimal conditions, the response current was proportional to the concentration of dichlorvos range from 5 μg/L to 50 μg/L with the correlation coefficient of 0.9921. The detection limit was 3 μg/L, far below the maximum residue level (100 μg/L) established by European Union for residues of the dichorvos in the vegetables and fruits. The biosensor exhibited good reproducibility and stability and provided a new method for detecting organophosphate pesticides residues.

Keywords: ACETYLCHOLINESTERASE; BIOSENSOR; MULTIWALLED CARBON NANOTUBES; PESTICIDES RESIDUES

Chemical Research in Toxicology®

US University of Sussex

Subscriber access provided by University of Sussex Library

Article

Immunopurification of acetylcholinesterase from red blood cells for detection of nerve agent exposure

Alicia J. Dafferner, Lawrence M. Schopfer, Gaoping Xiao, John R. Cashman, Udaya Yerramalla, Rudolph C Johnson, Thomas A. Blake, and Oksana Lockridge

Chem. Res. Toxicol., **Just Accepted Manuscript** • DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00209 • Publication Date (Web): 11 Sep 2017

Downloaded from http://pubs.acs.org on September 12, 2017

Just Accepted

"Just Accepted" manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides "Just Accepted" as a free service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. "Just Accepted" manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. "Just Accepted" manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are accessible to all readers and citable by the Digital Object Identifier (DOI®). "Just Accepted" is an optional service offered to authors. Therefore, the "Just Accepted" Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the "Just Accepted" Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these "Just Accepted" manuscripts.

A Method for Diagnosing Organophosphate Pesticide Exposure in Humans using Liquid Chromatography Coupled Tandem Mass Spectrometry

Amruta S Indapurkar [1], Padmanabhan Eangoor [1], Jihee Stephanie Yeh [1], Manideepika Vakkalanka [1], John R Cashman [2], Jennifer S Knaack [1]

Affiliations + expand

PMID: 33367644 DOI: 10.1093/jat/bkaa197

Abstract

Organophosphate (OP) pesticides are commonly utilized worldwide for agricultural purposes and pose a health threat through air, ground, and water contamination. Here, we present a convenient method for diagnosing exposure to OP pesticides in humans. This immunoprecipitation method relies on extraction of butyrylcholinesterase (BChE), a biomarker of OP poisoning that adducts OP compounds, from human serum using agarose beads conjugated to anti-BChE antibodies. Extracted BChE was then digested with pepsin and analyzed for unadducted and OP-adducted peptides by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). To characterize and validate this method, pooled human plasma was exposed to parathion and dichlorvos to form diethoxyphospho, aged ethoxyphospho and dimethoxyphospho adducts with BChE. Untreated plasma was also analyzed for unadducted peptides. Additionally, samples were analyzed using Ellman's assay to measure BChE functional activity. The percent inhibition of BChE was 53.5±5.76 and 95.2±0.37%, respectively, for plasma treated with parathion for 1 hour and 24 hours. The percent inhibition was 97.2±0.98 for plasma treated with dichlorvos for 1 hour. The percent inhibition was 97.9±0.41% when the plasma treated with parathion for 1 hour, parathion for 24 hour and dichlorvos for 1 hour were mixed. Individual adducts were quantified in a single chromatographic run. Untreated plasma contained 26.4±1.87 ng/mL of unadducted BChE and no adducted peptides. In contrast, the plasma sample treated with both pesticides contained no unadducted BChE, but did contain 9.46±1.10, 10.9±0.98 and 14.1±1.10 ng/mL of diethoxyphospho, aged-ethoxy, and dimethoxyphospho peptides, respectively. The ability to identify and measure BChE and BChE adducts to parathion and dichlorvos is expected to be useful for diagnosing human exposure to multiple OP pesticides.

İnsan plazması, **BChE ile dietoksifosfo, aged etoksifosfo ve dimetoksifosfo eklentileri** oluşturmak üzere parathion ve diklorvos'a maruz bırakıldı.

Immünopresipitasyon yöntemi ile anti-BChE antikorlarına konjuge agaroz boncuklar kullanılarak insan serumunda **BChE ekstraksiyonu**

Ekstrakte edilen BChE – **pepsin digestion** ve **LC-MS/MS** ile OP-eklenmiş **peptid**ler açısından **analiz**

BChE ve BChE adducts tanımlanması ve ölçülmesinin, insanların birden çok OP pestisitine maruziyetinin teşhisinde faydalı olması beklenmektedir.

Indapurkar AS, Eangoor P, Yeh JS, Vakkalanka M, Cashman JR, Knaack JS. A Method for Diagnosing Organophosphate Pesticide Exposure in Humans using Liquid Chromatography Coupled Tandem Mass Spectrometry. J Anal Toxicol. 2020 Dec 26;bkaa197