

*Originalni članci/
Original articles*

DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ ODREĐIVANJA
AKTIVNOSTI HOLINESTERAZE

DIAGNOSTIC VALUE OF CHOLINESTERASE
ACTIVITY

Correspondence to:

Marija Đorđević

Didiplomirani farmaceut-
medicinski biohemičar

Adresa: Kolonija 18 Jajinci,

Voždovac-Beograd

Tel. 011/ 7 936 371

mob: 064/2 482 838

E-Mail: marija.djordjevic86@yahoo.com

Marija Đorđević¹, Marko Antunović², Branislava Rusić²,
Kristina Denić², Snežana Đorđević²

¹Institut za medicinu rada, Sektor za preventivnu medicinu,
Vojnomedicinska akademija, Beograd

²Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Ključne reči

acetilholinesteraza, organofosforni insek-
ticiidi, akutna trovanja

Key words

Acetylcholinesterase, organophosphorus
insecticides, acute poisonings

Sažetak

Acetilholinesteraza (AChE) je široko rasprostranjen enzim. Nalazi se u nervima, sivoj moždanoj masi, plućima, slezini, timusu i eritrocitima. Glavna uloga ovog enzima je razgrađivanje acetilholina, pri čemu se završava transmisija signala. Organofosfatna jedinjenja (OFJ) su ireverzibilni inhibitori AChE, koja imaju široku primenu u poljoprivredi i kao takva su čest uzrok slučajnih i profesionalnih trovanja.

Cilj ovog rada je sagledavanje najčešćih uzroka ekspozicije koji dovode do poremećaja aktivnosti holinesteraze, kao i pregled rezultata aktivnosti holinesteraze kod otrovanih ljudi. U grupi od 11 akutno otrovanih pacijenata dokazano je prisustvo organofosfatnih insekticida, pri čemu je kod 9 pacijenata došlo do inhibicije AChE. Step en inhibicije enzima bio je uglavnom veći kod bolesnika kod kojih su dokazane veće koncentracije OFJ. Najčešći uzroci trovanja bili su malation i dimetoat. Zabeležen je pad broja akuno trovanih pesticidima u 2013 godini.

Određivanje aktivnosti AChE ima veliki značaj kako sa aspekta lečenja tako i u ekonomskom pogledu. Pružene analitičke informacije potvrđuju dijagnozu trovanja, omogućavaju predviđanje toka bolesti i prognozu oporovka. Kod profesionalno izloženih radnika određivanje aktivnosti acetilholinesteraze i butirilholinesteraze u poređenju sa vrednostima pre ekspozicije može poslužiti kao dobar biološki pokazatelj efekta OFJ i potvrda dijagnoze trovanja.

UVOD

Acetilholin (ACh) je neurotransmitter centralnog i perifernog nervnog sistema. Uglavnom ima ekscitatorni efekat, ali na nekim perifernim parasimpatikusnim nervnim završecima može imati i inhibitorno dejstvo. ACh deluje na dve vrste receptora, nikotinske i muskarinske.

Tokom neurotransmisije ACh se oslobađa u sinaptičku pukotinu i povezuje za holinergički receptor na postsinaptičkoj membrani prenoseći signal iz neurona. Acetilholinesteraza (AChE) je enzim koji je pričvršćen uglavnom za susedast sloj finog vezivnog tkiva koji ispunjava sinaptički prostor između presinaptičkog nervnog završetka i postsinaptičke membrane. Glavna uloga ovog enzima je razgrađivanje acetilholina, pri čemu se završava transmisija signala. Dejstvom enzima oslobađa se holin koji se ponovo preuzima od strane presinaptičkog nerva i koristi za ponovnu sintezu ACh kombinovanu sa acetyl CoA uz pomoć enzima holin acetiltransferaze. Inhibicija esteraze dovodi do gomilanja ACh u sinaptičkoj pukotini, a time i do nakupljanja ACh u sinapsama.

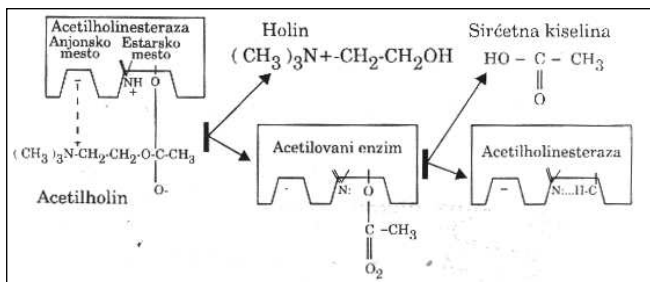
Postoji još jedan enzim sličan AChE a to je butirilholinesteraza (nespecifična holinesteraza).

Razlika između acetilholinesteraze i butirilholinesteraze ustanovljena je na osnovu njihovog različitog afiniteta prema pojedinim estrima holina. Brzina kojom acetilholinesteraza razlaže estre holina opada sa produženjem ugljovodoničnog lanca: acetilholin, propionilholin, butirilholin, dok kod butirilholinesteraze brzina hidrolize opada obrnutim redom. Takođe, za razliku od butirilholinesteraze, acetilholinesteraza razlaže acetyl-β-metilholin, ali ne razlaže benzilholin.

Acetilholinesteraza je jedan od najefikasnijih poznatih enzima; jedan molekul acetilholinesteraze u toku jednog minuta može da hidrolizuje 6×10^5 molekula acetilholina⁽¹⁻⁴⁾.

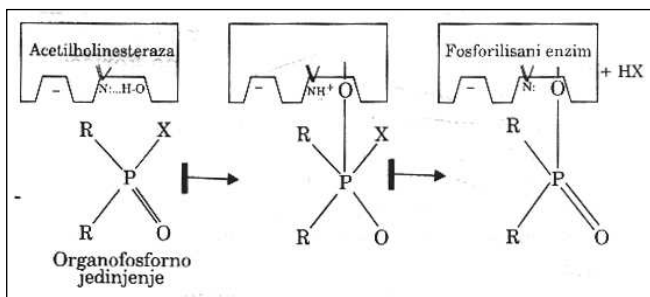
Nasuprot acetilholinesteraze, jasna fiziološka funkcija butirilholinesteraze još uvek nije poznata. Međutim, poznato je iz kliničke prakse da kod genetski uzrokovanog ili stečenog deficita butirilholinesteraze, primena depolarizujućeg mišićnog relaksanta suksametonijuma dovodi do prolongiranog, po život opasnog, nervno-mišićnog bloka.

AchE ima dva aktivna mesta-anjonsko i estarsko. Pri interakciji Ach i AchE dolazi do hidrolize Ach, acetilovanja estarskog mesta AchE i oslobađanje holina. Acetilovana AchE zatim reaguje s vodom, stvara se sirćetna kiselina i slobodna AchE.



Slika. 1 Interakcija acetilholinesteraze i acetilholina

Pri delovanju organofosforinog jedinjenja (OFJ) nastaje reakcija između AchE i ovih jedinjenja na estarskom mestu AchE i stvara se kompleks enzim fosfat. Kako je fosforilisani enzim veoma postojan zbog atoma fosfora koji nije dovoljno elektrofilan da bi reagovao u prisustvu vode, to se spontana reaktivacija uopšte ne odvija ili je veoma spora, tj inhibicija AchE je praktično ireverzibilna (1,4-5).



Slika 2. inhibicija acetilholinesteraze organofosforinim jedinjenjima

Posle nastanka ireverzibilne inhibicije AchE, normalna funkcija se može postići stvaranjem nove AchE, što je veoma spor proces (oko 1% dnevno). Za potpunu normalizaciju funkcije potrebno je i do 100 dana, zavisno od stepena prethodne inhibicije. Zbog inhibicije AchE i izostanka njene funkcije dolazi do nakupljanja Ach na sinapsama nervnih završetaka i do kliničke slike endogenog toksičnog delovanja Ach.

Organofosforina jedinjenja (OFJ) inhibiraju i serumske i eritrocitnu holinesterazu. Po hemijskom sastavu to su estri fosforne kiseline. Ova grupa jedinjenja široko se koristi za uništavanje štetnih insekata, grinja, gljivica, korova i nematoda.

OFJ lako prodiru kroz nepovređenu kožu i sve sluznice. Trovanje može nasati inhalacijom, kontaktom preko kože i ingestijom. Pri profesionalnoj ekspoziciji najvažniji je dermalni put prodiranja i inhalacija, a manji značaj ima prodiranje preko digestivnog trakta.

Većina radnika izloženih pesticidima su poljoprivredni radnici (vozači traktora, ratari, voćarski i vinogradarski radnici, radnici u staklenicima), radnici na održavanju uređaja za primenu pesticida (mehaničari, električari), piloti, radnici na utovaru pesticida i održavanju aviona, magacioneri, prodavci u poljoprivrednim apotekama, radnici na proizvodnji pesticida, radnici koji rade ne dezinfekciji, deratizaciji itd (1,5).

Organofosforni insekticidi su uzročnici oko 80-90 % slučajeva svih akutnih trovanja ljudi pesticidima. Godišnje se u svetu registruje oko 100000 žrtava akutnog trovanja organofosforinim jedinjenjima. Oko 20 % su akcidentalna trovanja, a samoubilačkih je oko 70 %, pri čemu je 30 % slučajeva sa letalnim ishodom (5-8).

Izlaganje organofosfatima može da dovede do četiri klinička sindroma, koji imaju različitu patogenezu, prognozu i koji zahtevaju različit tretman. Oni se javljaju nakon različito dugog latentnog intervala posle izlaganja organizma čoveka organofosforinom jedinjenju. To su: akutna holinergička kriza, intermedijarni sindrom, odložena periferna neuropatija i druge specifične lezije organa.

Simptomatologija akutne holinergičke krize javlja se neposredno po ekspoziciji, odnosno maksimalno do 12 sati od momenta ekspozicije. Kako je pri trovanju organofosfatima fiziološka funkcija enzima acetilholinesteraze blokirana, slika trovanja ima karakteristike intoksikacije endogenim acetilholinom. U zavisnosti od stepena inhibicije acetilholinesteraze i povećanja sadržaja acetilholina, organofosfati dovode do stimulacije odnosno paralize prenosa nervnih impulsa u centralnim i neuroefektnim sinapsama holinergičkog nervnog sistema. U kliničkoj slici trovanja razlikuju se: muskarinski efekti (bradikardija, bronhokonstrikcija, bronhoreja, hipotenzija, pojačani motilitet gastrointestinalnog trakta, abdominalni grčevi, mioza, hipersalivacija), nikotinski efekti (hipertenzija, tahikardija, fascikulacija, nekroza skeletnih mišića), kao i centralni toksični fenomeni (tremor, inkoordinacija pokreta, konvulzije, centralna depresija disanja, koma i smrt) (5,9-11).

Terapija trovanja organofosforinim jedinjenjima podrazumeva aspiraciju gornjih respiratornih puteva, kardiopulmonalnu reanimaciju, lavažu želuca, davanje specifičnih lekova odnosno antidota. U okviru specifične terapije primenjuju se atropin kao antagonist muskarinskih receptora i oksimi kao reaktivatori inhibirane holinesteraze. Konvencionalna terapija podrazumeva i primenu benzodiazepina, koji su efikasni antikonvulzivi (5,9-11).

Cilj ovog rada je sagledavanje najčešćih uzroka ekspozicije koji dovode do poremećaja aktivnosti holinesteraze, kao i pregled rezultata analize aktivnosti holinesteraze kod otrovanih ljudi.

MATERIJAL I METODE

Uzorci biološkog materijala (krv i urin) pacijenta akutno otrovanih OFJ korišćeni su za određivanje aktivnosti enzima i određivanje koncentracije OFJ.

Određivanje OFJ vršeno je primenjenom metodom na UPLC-MS analitičkom sistemu (12).

Određivanje aktivnosti eritrocitne holinesteraze vršeno je Elmanovom metodom koja se zasniva na merenju brzine hidrolize tiholinskog supstrata nastalog katalitičkim dejstvom enzima pod određenim uslovima (13).

Za kvantitativno određivanje serumske holinesteraze korišćen je in vitro dijagnostički test – Dimension kliničko-hemijski test.

REZULTATI

U Tabeli 1. prikazane su vrednosti o aktivnostima enzima, vrste OFJ pesticida i njihove koncentracije. Takođe, bolesnici su prikazani na osnovu pola i starosne dobi.

Tabela 1. Podaci o otrovanim bolesnicima

bolnik	pol	starost	identifikovan OFJ	koncentracija OFJ	BuChE, IJ/L	AchE IJ/L
1	ž	59	dimetoat (krv) dimetoat(urin)	0,22mg/L 0,004mg/L	5377	3356.95
2	m	40	dimetoat (krv)	dokazano u tragu	1975	1344
3	m	36	dimetoat(krv) dimetoat(urin)	9,70mg/L 6,75mg/L	3244	1175
4	ž	27	malation (krv) malation(urin)	nije dokazan dokazano u tragu	6363	4605
5	ž	50	malation(urin)	1,20mg/L	4899	5678
6	m	76	malation(krv) malation(urin)	0,71mg/L 0,08mg/L	580	198
7	ž	68	malation(krv)	3,1mg/L	720	1153
8	m	37	karbafuran(krv) karbafuran(urin)	0,2mg/L dokazano u tragu	7010	2793
9	m	44	malation(urin)	1,37mg/L	7870	2041
10	ž	26	dimetoat(krv) dimetoat(urin)	11,70mg/L 16,53mg/L	4454	1264
11	ž	39	diazinon(krv) diazinon(urin)	0,04mg/L 0,03mg/L	6000	2065

DISKUSIJA

Postavljanje dijagnoze akutnog trovanja organofosforim jedinjenjima (OFJ) i praćenje toka njihovog metabolizma veoma je značajno u terapiji. Dijagnoza trovanja može se potvrditi određivanjem aktivnosti (acetilholinesteraze) AChE u eritrocitima i (butirilholinesteraze) BuChE u serumu, a veoma je značajna identifikacija i određivanje koncentracije organofosforim jedinjenja u serumu, i praćenje daljeg metabolizma preko njihovih urinarnih metabolita-alkilfosfata.

Analiza organofosforim jedinjenja i njihovih metabolita u biološkom materijalu, obuhvata primenu velikog broja metoda, kako pripreme uzoraka za analizu, tako i njihovo određivanje. Njihova identifikacija veoma je složena, a praćenje niskih koncentracija nalaže primenu veoma osetljivih analitičkih tehnika, kao što je hromatografija sa UV ili masenim spektrometrijskim detektorom (12, 14-16).

Prema podacima Centra za kontrolu trovanja u 2011. god je pregledano 58 pacijenata zbog akutne ekspozicije i trovanja pesticidima, a na Klinici lečeno 35 pacijenata. Najčešći toksični agensi bili su organofosforni insekticidi (71%). Lečen je približno jednak broj muškaraca i žena. Od hospitalizovanih pacijenata bez kliničke slike trovanja (PSS0) je bilo 14 osoba (40%). Trovanje lakog stepena (PSS1) ispoljeno je kod 6 pacijenata (17%), srednje teškog stepena (PSS2) kod 3 pacijenata (9%), a zbog teškog trovanja (PSS3) je lečeno 9 pacijenata (25%). Letalan ishod zbog akutnog trovanja organofosfatnim insekticidima je zabeležen kod 2 pacijentkinje (17).

U 2012. Zbog akutne eksozicije i trovanja pesticidima u OPR CKT pregeledano je 97 pacijenta (2.3%) od ukupnog broja pregledanih pacijenata, što je značajno više u odnosu na prethodnu godinu. Na bolničko lečenje je primljeno 54 bolesnika, što čini 6.5% ukupno hospitalizovanih pacijenata. U odnosu na pol, bilo je više muškaraca (65%) u odnosu na žene (35%). Najčešći toksični agensi su i ove godine bili

organofosfatnih insekticidi (54%) (18).

Od hospitalizovanih pacijenata bez kliničke slike trovanja (PSS0) je bilo 18 osoba (33%). Trovanje lakog stepena (PSS1) je ispoljeno kod 15 pacijenata (28%), srednje teškog stepena (PSS2) kod 6 pacijenata (11%), a zbog teškog trovanja (PSS3) je lečeno 10 pacijenata (19%). Letalan ishod je zabeležen kod 3 pacijentkinje koje su bile otrovane organofosfatnim insekticidima (18).

U odnosu na 2012. godinu u 2013. je zabeležen pad broja akutnih trovanja pesticidima (81 bolesnik). Na bolničko lečenje je primljeno 38 bolesnika. Lečeno je 60.5% muškaraca i 39.5% žena.

Od hospitalizovanih pacijenata trovanja lakog stepena (PSS1) je ispoljeno kod 22 pacijenata (57.9%), srednje teškog stepena

(PSS2) kod 3 pacijenata (7.9%), a zbog teškog trovanja (PSS3) je lečeno 8 pacijenata (21.1%). Letalan ishod je zabeležen kod 5 pacijenata (19).

Podaci o akutno otrovanim pacijentima hospitalizovanim 2013. sa kliničkom slikom trovanja organofosforim insekticidima prikazani su u tabeli 1.

Pri akutnim trovanjima obično postoji povezanost između stepena inhibicije aktivnosti AchE i težine kliničke slike. Pri inhibiciji aktivnosti AchE od 50% u odnosu na početnu, mogu se očekivati laka trovanja, od 60% do 70% srednje teška, od 80% do 90% teška i pri aktivnosti AchE od 1 do 4% smrtna. Pojava simptoma trovanja više zavisi od brzine inhibicije holinesteraze nego od apsolutnog nađenog nivoa aktivnosti (1,5).

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 1. vidi se da je AchE bila inhibirana u uzorcima dobijenim od 9 pacijenata nakon prijema. Takođe, kod ovih pacijenata dokazane su i značajne koncentracije OFJ. Najčešći uzročnici trovanja bili su malation i dimetoat. Stepenn inhibicije enzima bio je uglavnom veći kod pacijenata kod kojih su dokazane visoke koncentracije OFJ.

Veoma niske vrednosti enzima AchE od 118 IJ/L i BuchE od 580 IJ/L uz nešto nižu koncentraciju malationa zabeležene su kod pacijenata starosti 76 godina. Ovo ukazuje na činjenicu da su stare osobe osetljivije na delovanje toksičnih agenasa zbog usporenog metabolizma i eliminacije otrova.

Oporavak pacijenata otrovanih OFJ je dug i spor proces. Razgradnja acetilholina se događa tek nakon sinteze novih količina AchE što je mali procenat dnevno. U toku lečenja se AchE određuje na svakih 72h pri čemu se prati vraćanje AchE u opseg referentne vrednosti. Takođe se prati i nivo koncentracije organofosfatnog jedinjenja sa ciljem da se utvrdi stepen njegove eliminacije iz organizma kao i njegov eventualni rezidualni efekat usled deponovanja u mastima (1,5).

ZAKLJUČAK

Kada je je aktivnost enzima u okviru referentnih vrednosti, a nije dokazano prisustvo OFJ prekida se sa davanjem antidota. Ova činjenica ukazuje na veliki značaj laboratorijskog određivanja aktivnosti enzima kako u aspektu lečanja tako i u ekonomskom pogledu.

Pri akutnim trovanjima otrovani će biti privremeno nesposobni za rad, do saniranja kliničkih manifestacija. Nakon potpunog ozdravljenja, radnike je potrebno premestiti na druge poslove sve dok aktivnost holinesteraze ne dostigne nivo koji je imala pre ekspozicije (oko 2-3 meseca zavisno od stepena inhibicije). Nakon toga radnici će moći da se vrate na prethodna radna mesta uz sanaciju uslova rada i adekvatnu primenu mera zaštite. U slučajevima trovanja sa trajnim posledicama ili recidiva trovanja, indikovana je promena radnog mesta ⁽⁵⁾.

U dijagnostici trovanja veoma je bitno izvršiti analizu organofosfornih jedinjenja i njihovih metabolita u biološkom materijalu. Pružene analitičke informacije potvrđuju dijagnozu trovanja, omogućavaju predviđanje toka bolesti i prognozu oporovka.

Holinesteraza je parametar od izuzetnog značaja za potvrdu ili isključivanje trovanja OFJ kao i pokazatelj stanja pacijenata i uspešnosti primenjene terapije. Step en inhibicije AchE određuje težinu trovanja, a serumska holinesteraza samo ukazuje na kontakt sa organofosfatnim jedinjenjima.

Kod profesionalno izloženih radnika određivanje aktivnosti acetilholinesteraze i butirilholinesteraze u poređenju sa vrednostima pre ekspozicije može poslužiti kao dobar biološki pokazatelj efekta OFJ i potvrda dijagnoze trovanja.

Abstract

Acetylcholinesterase (AChE) is widely distributed enzyme. It is present in nerves, gray brain matter, lung, spleen, thymus and erythrocytes. The main role of this enzyme is degradation of acetylcholine when transmission of the signal finishes. Organophosphate compounds are irreversible inhibitors of AChE, which are widely used in agriculture and as such are common cause of accidental and professional poisoning.

The aim of this study is to determine the most common causes of exposure that lead to disorder of cholinesterase activity, as well as to review the results of the analysis of cholinesterase activity in intoxicated people.

In the group of 11 acutely poisoned patients, the presence of organophosphate compounds was determined. Nine patients had inhibition of AChE. Patients with a higher concentration of organophosphate compounds had a higher degree of inhibition of the enzyme. The most common poisons were malathion and dimethoate. There was a decrease of people intoxicated by organophosphate compounds in 2013.

Determination of AChE has a great importance both from the aspect of the treatment and from economical point of view. Provided analytical information confirm a diagnosis of poisoning, allow monitoring of disease as well as the prediction of recovery. The activity of acetylcholinesterase and butirilholinesterase compared with values before exposure can serve as a good indicator of the biological effect in cases of exposed workers. These parameters also confirm a diagnosis of poisoning.

LITERATURA

1. Vidaković A. Medicina rada II. Beograd: Udruženje za medicinu rada Jugoslavija; 1997.
2. Varagić V, Milošević M, Famakologija, 23. izdanje, Elit Medica, Beograd, 2009
3. Barton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I, Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics, The McGraw Hill Companies, New York, 2008
4. Katzung B, Masters S, Trevor A, Basic and clinical pharmacology, 12th Edition, The McGraw Hill Companies, New York, 2012
5. Vidaković A. Profesionalna toksikologija. Beograd: Udruženje toksikologa Jugoslavije; 2000.
6. Vučinić S. The experience of national poison control centre in management of acute organophosphorous insecticide poisoning. Proceedings from CBMTS IV, Switzerland: Spiez; 2002; 51-54
7. Chowdhury F, Bari S, Alam J, Rahman M, Bhattacharjee B, Qayyum A, Mridha S, Organophosphate poisoning presenting with muscular weakness and abdominal pain-a case report, BMC Research Notes 2014, 7:140
8. Sudakin D, Power L, Organophosphate exposures in the United States: a longitudinal analysis of incidents reported to poison centers, J. Toxicol. Environ. Health A, 2007; 70(2): 141-7
9. Hodgson E, A Textbook of modern toxicology, 3rd Edition, J. Wiley and Sons Inc, New Jersey, 2004
10. Singh S. Organophosphorous poisoning: an evidence based approach. MJAFI. 2004; 60:2-4
11. F. Barile, Clinical Toxicology Principles and Mechanisms, CRC Press, Boca Raton, 2005.
12. Zlatković M, Jovanović M, Đorđević D, Vučinić S, Brzo simultano određivanje organofosfornih pesticida u humanom serumu i urinu metodom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. Vojnosanit. pregl. 2010; 67(9):717-722.
13. Elman G, Courtney D, Andres V, Featherstone R, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem Pharmacol, 1961; 7: 88-9
14. Inoue S, Saito T, Mase H, Suzuki Y, Takazawa K, Yamamoto I, Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. J Pharm Biomed Anal 2007; 44(1): 258-64
15. Singh B, Dogra T, Rapid method for the determination of some organophosphorus insecticides in a small amount of serum in emergency and occupational toxicology cases, Indian J Occup Environ Med. Aug 2009; 13(2): 84-87
16. Musshoff F, Junker H, Madea B, Simple determination of 22 organophosphoruspesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection, J. Chromatogr. Sci, 2002; 40(1): 29-34
17. Godišnjak Centra za kontrolu trovanja godina 2011, Vojnomedicinska akademija, Beograd, 2012.
18. Godišnjak Centra za kontrolu trovanja godina 2012. Vojnomedicinska akademija, Beograd, 2013.
19. Godišnjak Centra za kontrolu trovanja godina 2013. Vojnomedicinska akademija, Beograd, 2014.