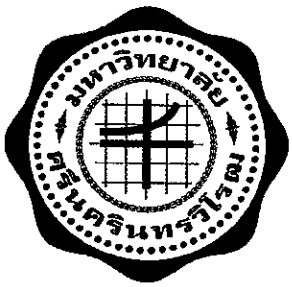
323/255



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

"การใช้อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ สำหรับการ รับสัมผัสสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตของชาวนา ในเขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร"

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม
นายแพทย์ ธนัช พจน์พิศุทธิพงศ์

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก
เงินรายได้ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2554

SWU6-1002: ความสัมพันธ์ระหว่างอะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายและในเม็ดเลือดแดงของชาวนาไทยที่รับสัมผัสสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

THE CORRELATION BETWEEN SALIVA AND RED BLOOD CELL ACETYLCHOLINESTERASE IN THAI RICE FIELD FARMERS EXPOSURE TO ORGANOPHOSPATE

ธนัช พจน์พิศุทธิพงศ์[1], วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม[2], ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล[1]

Thanach Photphisutthiphong[1], Wanlaya Tanechpongtamb[2], Chatchai Ekpanyaskul[1]

[1]ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[1]Department of Preventive and social medicine, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Thailand.

[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Thailand.

Corresponding author, E-mail: mengmaneaw@hotmail.com

บทคัดย่อ

ชาวนาไทยส่วนใหญ่ใช้สารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิด โดยเฉพาะสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต การตรวจคัดกรองสุขภาพจากการประกอบอาชีพ ทางกระทรวงสาธารณสุขใช้กระดาษกรอง (reactive paper) ในการเฝ้าระวังภาวะพิษจากสารออร์กาโนฟอสเฟต อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวทำให้เจือจางในการเก็บ และบอกถึงปริมาณเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในซีรั่มในรูปเชิงคุณภาพเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องการศึกษาว่าเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายสามารถใช้เป็นดัชนีชีวภาพสำหรับพิษสารออร์กาโนฟอสเฟตได้หรือไม่ โดยวัดระดับอะเซติลโคลีนเอส-เตอเรสในน้ำลายและในเม็ดเลือดแดงในชาวนาไทย (มีกลุ่มรับสัมผัสสารออร์กาโนฟอสเฟต และไม่รับสัมผัสสารออร์กาโนฟอสเฟต) และศึกษาดูความสัมพันธ์ระหว่างอะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายและในเม็ดเลือดแดง ดำเนินการศึกษาแบบภาคตัดขวางในกลุ่มชาวนาในเขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม ปีพ.ศ. 2554 จากชาวนาจำนวน 60 คน ที่สุ่มเลือกมาจาก 11 แขวงในเขตหนองจอก เก็บน้ำลายจำนวน 2 มิลลิลิตร และเลือดไม่แข็งตัวจากเส้นเลือดดำจำนวน 5 มิลลิลิตร เพื่อทดสอบหาเอนไซม์อะเซติล-โคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี ELISA วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สหสัมพันธ์ Unpaired t-test, Mann-Whitney U test และ Pearson correlation ผลการศึกษาพบว่า ชาวนาจำนวน 60 คน ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายทั้งไม่ปรับค่าโปรตีนและปรับค่าโปรตีน เท่ากับ 5.24±3.02 ยูนิตต่อลิตร, 0.83±0.54 ยูนิตต่อลิตรต่อโปรตีน 1 ไมโครกรัม ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 2,685±913 ยูนิตต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายที่ปรับค่าโปรตีนและค่า Log_{10} ของเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 0.26 (p-value= 0.04) เมื่อแยกวิเคราะห์ในกลุ่มที่สัมผัสและไม่ได้รับสัมผัสออร์กาโนฟอสเฟต ไม่พบความแตกต่างระหว่างค่าเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายและในเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังพบว่า ทั้งสองกลุ่มมีค่าสหสัมพันธ์ที่ต่ำ (r= 0.14, p-value= 0.54; r= 0.26, p-value= 0.09) จึงสรุปได้ว่ายังไม่เหมาะสมที่จะใช้เอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลายเป็นดัชนีชีวภาพในเกษตรกรที่รับสัมผัสสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เมื่อเปรียบเทียบกับอะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในเม็ดเลือดแดง

คำสำคัญ: ดัชนีชีวภาพ ออร์กาโนฟอสเฟต อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสในน้ำลาย

Abstract

Thai rice field farmers use many kinds of pesticides, especially organophosphate (OP). To screen the health effect from occupational exposure, Ministry of Public Health uses the reactive paper for surveillance its toxicity. However, this method is invasive and provides only a qualitative result of serum cholinesterase enzyme. Therefore, this study aims to find whether (AChE) enzyme in saliva could be used as a biomarker for OP toxicity, by measuring the level of saliva AChE enzyme, red blood cell (RBC) AChE enzyme in Thai rice field farmers (OP exposure & non-OP exposure group) and examine the correlation between saliva and RBC AChE enzyme. A cross-sectional study was conducted in the rice field farmers in Nong Chok district, Bangkok, Thailand. The period of sample collection was in March 2011. The 60 rice field farmers were randomly selected from 11 sub-districts in Nong Chok. Saliva 2 ml and unclotted blood 5 ml from venipuncture were collected and tested for AChE enzyme by ELISA. Unpaired t-test, Mann-Whitney U test and Pearson's correlation, were utilities in data analysis. In all 60 participants, mean ± standard deviation (SD) of saliva AChE without and with protein correction was 5.24±3.02 U/L, 0.83±0.54 U/L/1 microgram protein, respectively. The mean ± SD of RBC AChE was 2,685±913 U/L. The correlation coefficient (r) between saliva AChE with protein correction and Log_{10} of RBC AChE was 0.26 (p-value = 0.04). For subgroup analysis, the OP exposure and non-exposure group, there was no statistical difference between saliva and RBC AChE. Moreover, they were also poor correlation in both groups (r= 0.14; p-value= 0.54, r= 0.26; p-value= 0.09). In conclusion, Saliva AChE enzyme may not be a suitable biomarker in OP exposure in the field farmers when compared with RBC AChE.

Keywords: Biomarker, Organophosphate, Saliva Acetylcholinesterase

Introduction

In Thailand, 40% of employed persons are in agricultural sector. The majority occupation of Thai rural people is the rice field farmers [1]. Number of pesticides imported to Thailand was increased from the past few decades [2]. Thai farmers use many kinds of insecticides during planting, especially organophosphate (OP). Each year, there are many Thai farmers diagnoses with OP poisoning. National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) recommended standard method to diagnose OP intoxication by using the percentage of red blood cell or plasma cholinesterase depression [3]. Before OP intoxication occurs, Ministry of Public Health in Thailand recommend screen its health effect from occupational exposure by using the reactive paper for surveillance since 1987 [4]. However, this method is invasive and provides only a qualitative result of serum cholinesterase (ChE) enzyme.

Saliva biomarker is presently received greater attention in occupational health practice. Saliva collection is non-invasive compared with venipuncture. The method is easy and convenient. Self-collection can be done by various methods such as spit saliva in disposable plastic pipette, put cotton-wool roll in buccal area to absorb saliva. In addition, the saliva collection does not need the trained staff and not carry the risk of needle-stick injuries [5]. Acetylcholinesterase (AChE) enzyme is known to be presented in human saliva. Claus, et al. showed that cholinesterase still has activity when examined by

radiometric method in saliva of healthy adult [6]. Moreover, the activity was also measurable in saliva of 2-5 years children. However, it was shown that there was a large variability within-subject [7]. Otherwise AChE catalytic activity was detected in the saliva samples that were stable for up to 6 hours at room temperature following the provision of the salivary sample [8]. This study then aims to find whether (AChE) enzyme in saliva could be used as a biomarker for OP toxicity.

Objectives

The aim of study was to measure the level of saliva AChE enzyme, red blood cell (RBC) AChE enzyme in Thai rice field farmers (OP exposure & non-OP exposure) and examine the correlation between saliva and RBC AChE enzyme.

Methods

This study was approved by the Ethics Committee of Srinakharinwirot University (No. SWUEC 5/2011). The cross sectional study was conducted in March 2011. The 60 rice field farmers were randomly selected from 11 sub-districts in Nong Chok. Inclusion criteria was the rice field farmers, older than age 18 years, using OP pesticides in exposure group, not using any pesticides in non-exposure group, living in Nong Chok district, Bangkok, Thailand. Exclusion criteria was periodontal disease, dental caries, vigorous teeth-brushing, oral mucosal injury, pernicious anemia, hemoglobinopathy, taking chloroquine, using other pesticides (eg. Carbamate, Pyrethroid) and drank or ate food, smoked, chewed gum, tooth brushed within 1 hour before collecting sample. Any participants took anti-cholinesterase medications such as donepezil, galantamine, rivastigmine were also exclude. Blood and saliva were collected and measured for AChE by ELISA.

Saliva AChE test

Before the saliva collection, the participants washed their hands and rinsed their mouth with tab water in 5 minutes. Then they were collected saliva 2 ml by passive drool technique into sterile propylene tube before venipuncture, transported by ice box under 4°C within 6 hours after collection. Saliva test was done at department of Biochemistry, Srinakharinwirot University. Saliva centrifuged with refrigerator centrifuge at 1,000 rpm for 5 minutes to precipitate any particulate matter and froze in aliquots at -20°C. Analyzed for saliva AChE used Amplex® Acetylcholine/Acetylcholinesterase assay kit [9]. The principle of reaction is the conversion of acetylcholine substrate by AChE to choline. Choline was in turn oxidized by choline oxidase to betaine and H_2O_2, which the latter in the presence of horseradish peroxidase, reacted with Amplex Red reagent in a 1:1 stoichiometry to generate the highly fluorescent product resorufin. This product was measured by Fluorescence microplate reader (SynergyTM HT, Bio Tek Instrument, Inc, USA), excitation at 530-560 nm and emission at 590 nm. Saliva was also analyzed for protein content by using Bradford method. The result was reported in unit/liter/1 microgram protein.

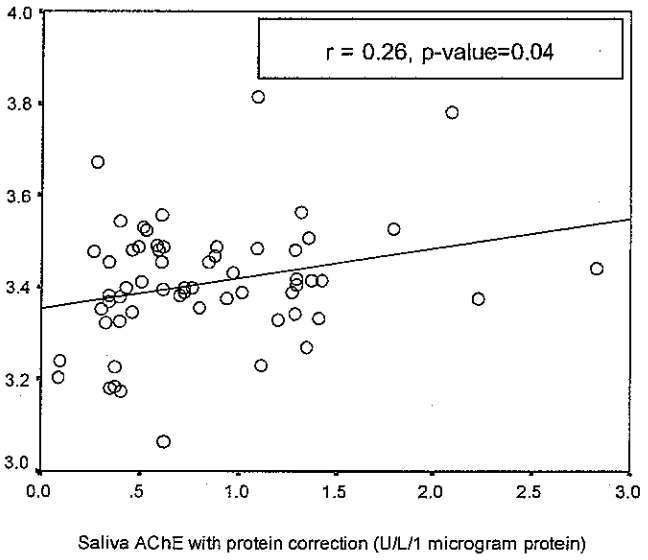


Figure 1 Bivariate scattergram of saliva AChE protein correction (U/L/1 microgram protein) with $\log_{10}$RBC AChE (U/L).

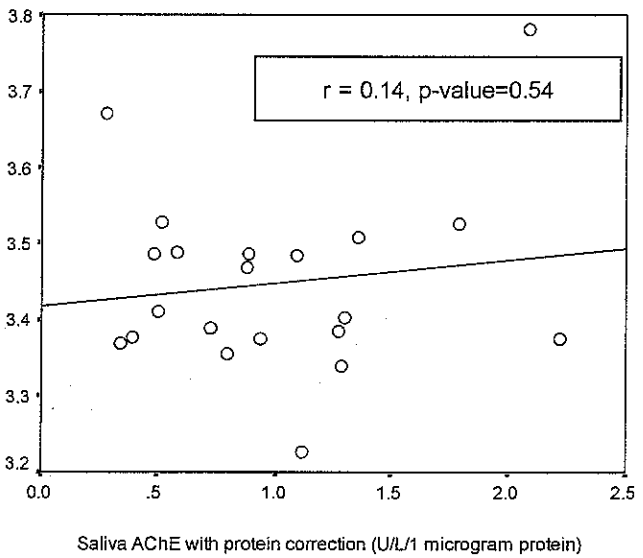


Figure 2 Bivariate scattergram of saliva AChE protein correction (U/L/1 microgram protein) with $\log_{10}$ RBC AChE (U/L) in organophosphate exposure group.

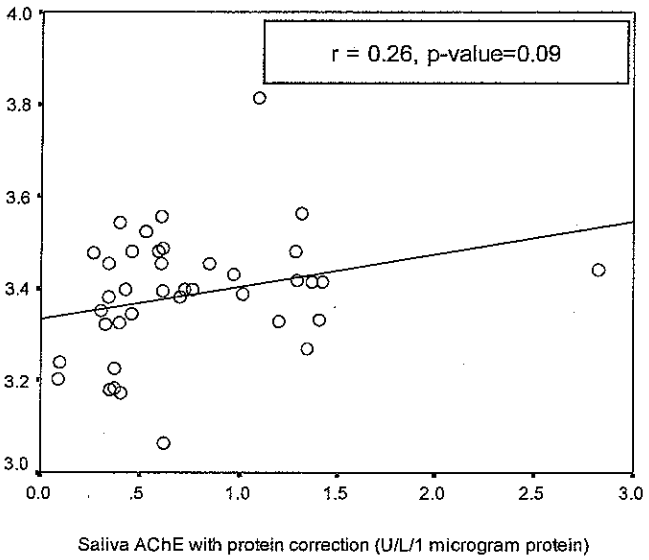


Figure 3 Bivariate scattergram of saliva AChE protein correction (U/L/1 microgram protein) with $\log_{10}$ RBC AChE (U/L) in non-organophosphate exposure group.

Conclusions and Discussion

This study aims to develop the new saliva biomarker for screening OP toxicity. The saliva AChE was comparing the gold standard of its toxicity by RBC AChE. In the present study, all of 60 participants did not have any potential factors which effect to AChE level.

The average of saliva AChE with protein correction was lower than in RBC AChE about 3,234 times. When selecting only non-exposure persons and compared them with previous study which studied in healthy workers, the average level of AChE in saliva was also lower than AChE in erythrocytes. This result is consistent with previous study [10]. The average of saliva and RBC AChE was lower than previous study because non-OP exposure participants lived in the same area with the rice field farmers and may have been exposed to OP by environment exposure or food ingestion. The different analysis method may account for 40% of the variability in RBC AChE and this could not be excluded [11].

When subgroup analysis was done, the saliva AChE and RBC AChE were not statistically different between OP exposure and non-OP exposure group. However, this study found that the mean of saliva and RBC AChE in OP exposure group were greater than non-OP exposure group. This could be the average of age in non-OP exposure group is higher than in OP exposure group (p-value=0.003). Further, high interpersonal variations in RBC AChE could be another factor causing the mean of RBC AChE in OP exposure to be greater than non-OP exposure. Interpersonal variations in ChE activities are greater than intra-personal variations [12]. The intraindividual CV of erythrocyte AChE is 10%, whereas the interindividual CV is 10-40% [13].

The correlation between saliva and RBC AChE in this study was poor correlation. The result consists with previous study. The saliva AChE was not correlated in various subjects such as healthy worker [10]. When stratified by OP exposure, OP exposure group and non-OP exposure group have

same poor correlation.

This study, however, had limitation. The cross sectional design could not indicate the OP toxicity. This is because the standard method that diagnose OP intoxication is to use percentage of red blood cell or plasma cholinesterase depression (before and after exposure).

In conclusion, this study suggests that Saliva AChE enzyme may not be a suitable biomarker in organophosphate exposure in rice field farmers when compared with RBC AChE. Because of the much lower levels of saliva relative to RBC AChE, there was poor correlation between the saliva and RBC AChE, and high intra-individual variation of saliva AChE [6-7].

Acknowledgements

The authors wish to thank David Koh and Vivian Ng, for the collaboration in Saliva Biomarkers research. The authors also thank Rachana Santiyanon, Chalongkwan Tangbanluekal and Pongpetch Kongpuang for their recommendation in RBC AChE analysis. The authors appreciate the research assistance and suggestion from Anamai Thetkathuek, Tassanee Nuchprayoon, Orapan Untimanont, Prapond Dumrongwong, Paisan Khaosak and Nopphawan Photphisutthiphong. This research was supported by the research grant from Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.

References

[1] Statistical Forecasting Bureau, National Statistic office. (2011). *Statistical year book Thailand 2011.* Retrieved February 19, 2012, from http://service.nso.go.th/nso/nsopublish/download/syb_54/SYB_54_T.pdf

[2] Winai Wananukul. (2009). *Acute organophosphorus and carbamate poisoning*. Bangkok: Beyond Enterprise company limited.

[3] Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. (2006). *Pesticide-related illness and injury surveillance: A how-to guide for State-based programs.* Retrieved February 19, 2012, from http://www.cdc.gov/niosh/docs/2006-102/pdfs/2006-102.pdf

[4] Bureau of occupational and environmental disease. (2010). *Manual for public health workers in agriculture*. Bangkok: The agricultural co-operative federation of Thailand.

[5] Soo-Quee Koh, David; & Choon-Huat Koh, Gerald. (2007, December). The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occupational and Environmental Medicine*. 64(3): 202-210.

[6] Claus Henn, Birgit; McMaster, Suzanne; & Padilla, Stephanie. (2006, October). Measuring cholinesterase activity in human saliva. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* 69(19): 1805-1818.

[7] Claus Henn, Birgit; et al. (2008, November). Salivary Cholinesterase activity in children with organic and conventional diets. *Epidemiology*. 19(6): s254-s255.

[8] Sayer, Rachel; et al. (2004, February). Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer's disease and response to cholinesterase inhibitors. *Clinical Biochemistry*. 37(2): 98-104.

[9] Molecular Probes. (2004). *Amplex® Acetylcholine/Acetlycholinesterase Assay Kit.* Retrieved February 19, 2012, from http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A12217

[10] Ng, Vivian; et al. (2009, March). Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure. *Occupational Medicine*. 59(2): 120-122.

[11] Yager, Janice; et al. (1976, April). Components of variability in blood cholinesterase assay results. *Journal of Occupational Medicine*. 18: 242-252.

[12] Gupta, Ramesh C. (2006). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. California: Elsevier Academic Press.

[13] Hayes, WJ; Laws, ER. (1991). *Handbook of Pesticide Toxicology*. San Diego: Academic Press.