

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสและ
แลคเตทดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซม์ในซีรัม กับการเกิดพิษจากเมโรมิถในหนูขาว

นางอรรัตน์ โลหิตนาวิ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-637-249-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**RELATIONSHIP BETWEEN SERUM LACTATE DEHYDROGENASE
ACTIVITY AND LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES CHANGES
AND METHOMYL TOXICITY IN RATS**

Mrs. Ornrat Lohitnavy

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Pharmacy in Pharmacology
Department of Pharmacology**

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1997

ISBN 974-637-249-1

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

อรรถัน โลกิตนาวิ : ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์แลคเตทเดไฮโดรจีเนส และแลคเตทเดไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซม์ในซีรัม กับการเกิดพิษจากเมโรมิทในหนูขาว (RELATIONSHIP BETWEEN SERUM LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES CHANGES AND METHOMYL TOXICITY IN RATS) อ. ที่ปรึกษา :
รศ. ดร. พาลาภ สิงหเสนี ; 108 หน้า. ISBN 974-637-249-1.



ในการศึกษาพิษของเมโรมิทซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต โดยให้เมโรมิทแก่หนูขาวทางปากครั้งเดียวและหลายครั้ง พบว่า หนูขาวที่ได้รับเมโรมิทครั้งเดียวในขนาด 3-7 มก./กก. มีระดับเอนไซม์แลคเตทเดไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 หลังจากได้รับเมโรมิท โดยหนูขาวที่ได้รับเมโรมิทในขนาด 7 มก./กก. มีระดับเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดและมีระดับแลคเตทเดไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซม์ชนิดที่ 3 (LDH-3) และชนิดที่ 4 (LDH-4) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญร่วมด้วย ในวันที่ 3 หลังจากได้รับเมโรมิท หลังจากนั้น ระดับเอนไซม์ดังกล่าวจะลดลงสู่ระดับปกติในวันที่ 5 และ 7 หลังจากได้รับเมโรมิท

ในการศึกษาพิษของเมโรมิทต่อม้าม พบว่า หนูขาวที่ได้รับเมโรมิทในขนาด 6 และ 8 มก./กก. มีน้ำหนักของม้ามและร้อยละของเซลล์ของม้ามที่มีชีวิต (splenocyte viability) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 3 หลังจากได้รับเมโรมิท พิษต่อม้ามที่เกิดจากเมโรมิทนี้สามารถยับยั้งได้โดยสารอะเซทิลซิสเทอีน (N-acetylcysteine) ผลดังกล่าวอาจมีกลไกหลายอย่างที่ข้องซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เกษตรวิทยา
สาขาวิชา เกษตรวิทยา
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นอม 
ลายมือชื่อภาควิชาที่ปรึกษา -

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

C875581 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: METHOMYL / LACTATE DEHYDROGENASE / LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES / SPLEEN

ORNRAT LOHITNAVY : RELATIONSHIP BETWEEN SERUM LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES CHANGES AND METHOMYL TOXICITY IN RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PALARP SINHASANI, Ph.D. 108 pp. ISBN 974-637-249-1.

Studies on the effects of methomyl, a highly toxic carbamate insecticide, in rats receiving a single dose and repeated doses orally were carried out. The rats treated with single doses of 3-7 mg/kg of methomyl showed significant increase in total lactate dehydrogenase (LDH) activity on day 1. The highest total LDH enzyme activity occurred in the rats receiving 7 mg/kg of methomyl on day 3 after dosing. Subsequently, the level of LDH activity declined to normal level on days 5 and 7 after dosing. These high LDH activities were concurrent with significantly increased LDH-3 and LDH-4 level.

Both spleen weight and splenocyte viability were significantly reduced in rats treated with an acute dose of 6 and 8 mg/kg of methomyl on days 1 and 3. Splenotoxicity effect seen was protected by pretreatment with N-acetylcysteine (NAC). These results are discussed in terms of various mechanisms which might be involved. The author suggests that mechanisms how NAC which acts as a scavenger of the free radical generated by injured cells protect against methomyl toxicity should be further investigated.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... เกษตรวิทยา.....

ลายมือชื่อนิสิต..... 

สาขาวิชา..... เกษตรวิทยา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ปีการศึกษา..... 2540.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENT



In this master degree course, I have learned many things especially the scientific thinking. The one who I would like to express my sincere expression is my dear advisor, Assoc. Prof. Dr. Palarp Sinhaseni, who gives me invaluable encouragement and inspires me to be a good scientist with her witful guidance, total support, and avid motivation both advisor status and personal relationship.

I would like to give grateful thanks to Du Pont (Thailand), Prof. Dr. Samruay Shuangchotti, Assoc. Prof. Punya Temjaroen, Assoc. Prof. Supan Sukarun, Assist. Prof. Monvibha Vongsakul, Assist. Prof. Korbtham Sathirakul, Dr. Aeumporn Srigritasanapol, Dr. Rawadee Butraporn, and the thesis committee for their support, kindness, help, facilities and useful advice.

Another one who I would like to express my sincere expression is my husband, Mr. Manupat Lohitnavy, who inspires me to have another aspiration, creating our family ourselves with love and mutual understanding.

Ultimately, I would like to take this page to express my gratefulness and heartfelt love to my parents, Dr. Annop and Mrs. Penrat Samatiwat, for everything they have given and, of course, their unceasing love. Every goodness of mine also belongs to them.

Ornrat Lohitnavy

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
Problem statement.....	1
Objectives.....	3
Hypotheses.....	3
Contributions of the study to the field of pesticide toxicity.....	4
II LITERATURE REVIEW	5
Methomyl.....	5
1. Structure and properties.....	6
2. Kinetics and metabolism in laboratory animals.....	7
3. Mechanism of toxicity.....	9
4. Toxicological Studies.....	9
Lactate dehydrogenase	
(L-lactate : NAD ⁺ oxidoreductase; E.C.1.1.1.27.).....	11
1. Roles in carbohydrate metabolism.....	11
2. Total lactate dehydrogenase.....	12
2.1 Tissue distribution.....	12

CONTENTS (Cont.)

CHAPTER	Page
2.2 Clinical significance of total LDH.....	14
3. Lactate dehydrogenase isoenzymes.....	14
3.1 Classification of LDH isoenzymes and their tissue distributions.....	14
3.2 Clinical significance of LDH isoenzymes.....	19
3.3 LDH isoenzymes in rats and other species.....	23
4. Sample collection.....	25
5. Measurement of total LDH activity and LDH isoenzymes.....	26
5.1 Total LDH activity.....	26
5.2 LDH isoenzymes.....	27
6. Reference ranges.....	29
6.1 Total LDH activity.....	29
6.2 LDH isoenzymes.....	29
III MATERIALS AND METHODS.....	31
Animals.....	31
Chemicals.....	32
1. Determination of possible relationship between serum LDH activity and LDH isoenzyme changes and methomyl toxicity in rats.....	32
Experimental designs.....	33
Preparation of methomyl solution.....	35
Dosing technique.....	35
Blood collection technique.....	35

CONTENTS (Cont.)

CHAPTER	Page
Tissue collection technique.....	36
Determination of total LDH activity.....	36
Determination of LDH isoenzymes.....	39
Haematologic tests.....	46
Determination of plasma haemoglobin.....	46
Determination of glutamate pyruvate transaminase (GPT) activity.....	46
Data analysis.....	46
2. Determination of splenotoxicity in methomyl- exposed rats..	47
Experimental designs.....	47
Preparation of methomyl solution.....	48
Preparation of N-acetylcysteine solution.....	48
Dosing technique.....	48
Blood collection technique.....	48
Tissue collection technique.....	49
Determination of splenocyte viability.....	49
Determination of erythrocyte cholinesterase activity.....	50
Determination of cholinesterase activity in spleen.....	51
Data analysis.....	53
IV RESULTS.....	54
1. Determination of possible relationship between serum LDH activity and LDH isoenzyme changes and methomyl toxicity in rats.....	54
Signs of toxicity.....	54
Haematological tests.....	55

CONTENTS (Cont.)

CHAPTER	Page
Total LDH activity.....	55
LDH isoenzymes pattern.....	59
GPT activity.....	62
Organ weight and relative organ weight.....	62
Histopathologic alterations.....	62
2. Determination of splenotoxicity in methomyl- exposed rats..	63
Signs of toxicity.....	63
Erythrocyte and spleen cholinesterase activity.....	63
Spleen weight and splenocyte viability.....	63
V DISCUSSION.....	66
Total LDH activity and LDH isoenzymes in methomyl-exposed rats.....	66
Correlation between alteration of LDH isoenzymes and toxicity of methomyl.....	67
Methomyl-induced splenotoxicity.....	67
Roles of N-acetylcysteine on methomyl-induced splenotoxicity.....	68
VI CONCLUSION.....	69
REFERENCES.....	71

CONTENTS (Cont.)

	Page
APPENDIX	
APPENDIX A.....	81
APPENDIX B.....	83
APPENDIX C.....	85
APPENDIX D.....	94
APPENDIX E.....	97
APPENDIX F.....	100
APPENDIX G.....	102
BIOGRAPHY.....	108


 สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Toxic signs of acetylcholinesterase inhibition.....	2
Table 2	Physical and chemical properties of methomyl.....	7
Table 3	Acute toxicity of technical grade methomyl in laboratory animals.....	10
Table 4	Proposed mechanism for abnormal serum enzyme levels.....	14
Table 5	Conditions affecting the total LDH activity in human serum.....	16
Table 6	Nomenclature, composition, and tissue source of LDH isoenzymes found in human serum by electrophoretic techniques.....	16
Table 7	Relative degree of increase of total LDH and abnormality of isoenzyme pattern in certain disease states.....	21
Table 8	Total LDH and LDH isoenzyme activities in the serum of various normal animal species.....	24
Table 9	Tissue distribution of LDH isoenzymes in rats.....	24
Table 10	Reference ranges of LDH isoenzymes in the human serum.....	30
Table 11	Single dose administration of methomyl in rats.....	33
Table 12	Repeated dose administration of methomyl in rats.....	33
Table 13	Administration protocol for determination of splenotoxicity in methomyl-exposed rats.....	47
Table 14	The total LDH activity of rats treated with a single dose of methomyl (3-7 mg/kg) at various time points after dosing.....	56
Table 15	The total LDH activity of rats treated with 5 daily doses of methomyl at various time points after dosing.....	56
Table 16	The number of rats fed a single dose and repeated doses of methomyl with increased total LDH activity.....	57

LIST OF TABLES (Cont.)

		Page
Table 17	LDH isoenzymes in the plasma of rats treated with an oral dose of methomyl (3-7 mg/kg) at various time points after dosing....	60
Table 18	LDH isoenzymes in the plasma of rats treated with 5 daily doses of 5 mg/kg of methomyl at various time points after dosing.....	60
Table 19	The erythrocyte cholinesterase inhibition, spleen weight, relative weight and splenocyte viability of rats treated with 6, 8 mg/kg of methomyl, the rats pretreated with 60 mg/kg NAC following 8 mg/kg methomyl, and the control groups at various time points after dosing.....	64
Table 20	Compositions of the reagents to set up the calibration curve of GPT.....	99
Table 21	GPT activity in the plasma of rats receiving an oral dose of methomyl (3-7 mg/kg) at various time points after dosing.....	101
Table 22	GPT activity in the plasma of rats receiving 5 repeated doses of 5 mg/kg/day of methomyl at various time points after dosing.....	101
Table 23	Organ weight of rats fed an acute dose (3-7 mg/kg) of methomyl at various time points after dosing.....	103
Table 24	Relative organ weight of rats fed an acute dose (3-7 mg/kg) of methomyl at various time points after dosing.....	104
Table 25	Organ weight of rats fed 5 repeated doses of 5 mg/kg/day of methomyl at various time points after dosing.....	105
Table 26	Relative organ weight of rats fed 5 repeated doses of 5 mg/kg/day of methomyl at various time points after dosing....	106

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	The interaction between an organophosphate or carbamate with the serine hydroxy group in the active site of the enzyme cholinesterase.....	2
Figure 2	Chemical structure of methomyl.....	6
Figure 3	The proposed metabolic pathways of methomyl in mammals.....	8
Figure 4	The reversible reaction between lactate and pyruvate catalyzed by LDH.....	11
Figure 5	Schematic diagram of glycolytic pathway of carbohydrate metabolism.....	13
Figure 6	A. The five LDH isoenzymes separated by electrophoretic technique; B. The LDH isoenzymes pattern in the normal serum of human.....	17
Figure 7	The distribution of LDH isoenzymes in various tissues of human.....	18
Figure 8	Tissue LDH isoenzyme patterns obtained with a thin-layer agarose gel electrophoretic system.....	18
Figure 9	Serum LDH isoenzyme patterns obtained with a thin-layer agarose gel electrophoretic system.....	22
Figure 10	Typical pattern of changes in serum enzyme activities following an uncomplicated myocardial infarction.....	22
Figure 11	Typical LDH isoenzyme pattern in the serum of various normal animal species.....	23
Figure 12	Experimental design for acute dose and repeated dose administration of methomyl in rats.....	34
Figure 13	Preparation of cellulose acetate plate and preparation of the electrophoretic chamber.....	41

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 14	Sample preparation and application.....	42
Figure 15	Electrophoresis of the sample plate.....	43
Figure 16	Visualization of isoenzyme bands.....	45
Figure 17	Total LDH activity in plasma of rats receiving an oral dose (3-7 mg/kg) of methomyl at different time points after dosing...	58
Figure 18	Total LDH activity in plasma of rats receiving 5 repeated doses of selected dose (5 mg/kg/day) of methomyl at various time points after dosing.....	58
Figure 19	LDH isoenzymes in the plasma of control rats in acute and repeated administration.....	59
Figure 20	Comparison of the LDH isoenzymes between control and 7 mg/kg methomyl-treated rats.....	61
Figure 21	Spleen weight of the rats treated with an acute dose (6 and 8 mg/kg) of methomyl and the rats pretreated with 60 mg/kg of NAC following an acute dose of 8 mg/kg of methomyl at various time points after dosing.....	65
Figure 22	Splenocyte viability of the rats treated with an acute dose (6 and 8 mg/kg) of methomyl and the rats pretreated with 60 mg/kg of NAC following an acute dose of 8 mg/kg of methomyl at various time points after dosing.....	65
Figure 23	Rulings on hemocytometer counting chamber.....	88
Figure 24	Technique for applying diluted blood to hemocytometer	89
Figure 25	Preparation of a blood smear	91
Figure 26	Blood cells.....	93

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 27	Relative weight of liver of rats treated with an oral dose of methomyl (3-7 mg/kg) at various time points after dosing.....	107
Figure 28	Relative weight of liver in rats treated with 5 mg/kg of methomyl for 5 days at various time points after last dosing.....	107



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย