

ผลของเมโธมิลต์ต่อวงชีวิตของเซลล์และ
การตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์เม็ดเลือดขาว



นางสาว ทิพิชา โปษยานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0155-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

441825

**EFFECTS OF METHOMYL ON CELL CYCLE AND
APOPTOSIS IN LEUKOCYTIC CELLS**

Miss Tipicha Posayanonda

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biopharmaceutical Sciences**

Faculty of Pharmaceutical Sciences


Chulalongkorn University

Academic Year 2001



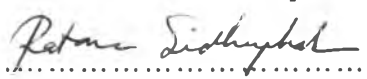

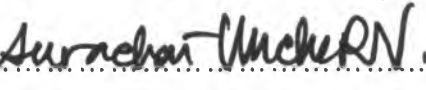
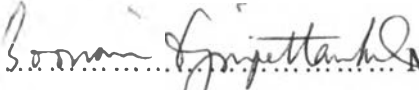
ISBN 974-17-0155-1

Thesis Title Effects of Methomyl on Cell Cycle and Apoptosis in
 Leukocytic Cells
By Miss Tipicha Posayanonda
Field of study Biopharmaceutical Sciences
Thesis Advisor Associate Professor Palarp Sinhaseni, Ph.D.
Thesis Co-advisor Ratana Sindhuphak, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of
Philosophy


..... Dean of Faculty of
 Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tuntisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Boonyong Tuntisira, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Palarp Sinhaseni, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Ratana Sindhuphak, Ph.D.)

..... Member
(Professor Wilhelm Schwaeble, M.D., Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)

..... Member
(Boonsri Ongpipattanukul, Ph.D.)

นางสาว ทิพิชา โปษยานนท์: ผลของเมโทมิลต่อวงจรชีวิตของเซลล์และการตายแบบอะพอพอโตซิสในเซลล์เม็ดเลือดขาว. (EFFECTS OF METHOMYL ON CELL CYCLE AND APOPTOSIS IN LEUKOCYtic CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. พาลก สึงหเสนี, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ดร. รติมา สีนุชุกต์, 224 หน้า. ISBN 974-17-0155-1.

เมโทมิลเป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยและประเทศเกษตรกรรมอื่นๆ ทั่วโลก มีรายงานว่าเมโทมิลนั้นสามารถควบคุมการเกิดอะพอพอโตซิสในพืชได้โดยทำให้เกิดรูขนาด 0.8-1.5 ไมโครเมตรขึ้นที่ผนังของไมโทคอนเดรียของข้าวโพดเทศผู้ที่เป็นหมันและมีปริมาณโปรตีน URF13 ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียอยู่ในระดับสูง อันเป็นผลให้เกิดการตายของเซลล์ต่อมา (Rhoads และคณะ, 1994; Chaumont และคณะ, 1995)



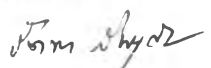
Klotz และคณะ (1997) ได้เสนอว่าเมโทมิลนั้นเป็นสารที่สามารถควบคุมการทำงานของฮอริโมนจากต่อมไร้ท่อได้ นอกจากนี้ ยังมีกรทดลองพบว่าเกิดการพิษต่อหัวใจของเมโทมิลจากรอดอบสนองแบบดีเพรสเซอร์นั้นไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับผลของเมโทมิลต่อการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase แต่อย่างใด (Saiyed และคณะ, 1992; Futagawa และคณะ, 2000) การทดลองของ Lohitnavy และ Sinhaseni (1998) ได้แสดงว่าเมโทมิลสามารถทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ เนื่องจากพบว่า N-acetylcysteine สามารถยับยั้งการตายจากเมโทมิลในเซลล์กล้ามเนื้อได้ ซึ่งการทดลองดังกล่าวที่ว่าเมโทมิลสามารถทำให้เซลล์เกิดความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นตรงกันกับรายงานที่ระบุไว้โดย IPCS (1996) ว่าเมตาบอลิซึมของเมโทมิลนั้นสามารถก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้จากการทำให้เกิดการลดลงของกลูตาไธโอน

จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อให้เมโทมิลขนาด 8 มก./กก. แบบครั้งเดียวแก่หนูทดลองทางปากเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้ว พบว่ามีการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวเม็ดโพไซต์แบบอะพอพอโตซิสเกิดขึ้น และยังพบว่าเมโทมิลสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพอโตซิสในเซลล์เพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวอีกด้วย โดยเซลล์แต่ละชนิดนั้นมีควมไวต่อเมโทมิลในขนาดต่าง ๆ กัน กล่าวคือ เมโทมิลสามารถก่อให้เกิดการลดลงของทรานสเมมเบรนโพเทนเชียลของไมโทคอนเดรีย ($\Delta\Psi$) และอะพอพอโตซิสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ในขนาด 18 มิลลิโมลาร์ (MM6), 12 มิลลิโมลาร์ (THP-1) และ 12 มิลลิโมลาร์ (Jurkat) ที่ 6 ชั่วโมง และในขนาด 12 มิลลิโมลาร์ (MM6), 6 มิลลิโมลาร์ (THP-1) และ 6 มิลลิโมลาร์ (Jurkat) ที่ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีเมโทมิลก่อให้เกิดลักษณะของนิวเคลียสแบบอะพอพอโตซิสได้ในเซลล์ Raji เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบการแตกหักของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ แต่กลับพบว่ามีการหยุดของเซลล์อยู่ในช่วงระยะของ G₀/G₁ แทน

อะพอพอโตซิสที่เกิดขึ้นนั้นสามารถยับยั้งได้โดย zVAD-fmk ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการเกิดอะพอพอโตซิสนั้นเกิดผ่านเอนไซม์ caspase และนอกจากนี้ IL-6 นั้นก็ยังสามารถยับยั้งการเกิดอะพอพอโตซิสจากเมโทมิลในเซลล์เพาะเลี้ยงเหล่านี้ได้อีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอว่าการเกิดอะพอพอโตซิสจากเมโทมิลนั้นมีส่วนที่สัมพันธ์กับการลดลงของ IL-6 หรือการรบกวนที่วิถีที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งสัญญาณของ IL-6 ก็เป็นไปได้

ผลการอ่านชิ้นส่วนของม้ามจากหนูทดลองหลังจากได้รับเมโทมิลทางปากขนาด 8 มก./กก. แบบให้ครั้งเดียวไปแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีการบวมของไมโทคอนเดรียเกิดขึ้นและมีการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียไปในทางเสื่อม โดยพบว่ามีการหายไปของคริสตีที่ผนังไมโทคอนเดรีย และยังพบเซลล์ตายจากการอ่านชิ้นเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่เมโทมิลขนาดเดียวกันอีกด้วย ซึ่งจากการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลกระทบของเมโทมิลต่อเมตาบอลิซึมของพลังงานที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียนั้นพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ 2,3-DPG ในเลือด และมีการเพิ่มขึ้นของการทำงานของเอนไซม์ NADH-DCIP reductase ในเม็ดเลือดแดงแบบมีความสัมพันธ์กันระหว่างขนาดและการตอบสนองด้วย

ผู้วิจัยจึงสรุปได้ว่าเมโทมิลมีผลกระทบต่อการทำงานที่ของไมโทคอนเดรียโดยไปมีผลรบกวนต่อเมตาบอลิซึมของพลังงาน และเมโทมิลในขนาดสูงก็ยังสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพอโตซิสได้ทั้งนอกภายในและในภายใน นอกจากนี้ เมโทมิลยังทำให้เกิดผลกระทบต่อม้ามโดยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียไปในทางเสื่อม รวมทั้งก่อให้เกิดการตายของเซลล์อีกด้วย ผู้วิจัยเสนอว่ากลไกที่เมโทมิลก่อให้เกิดผลต่าง ๆ เหล่านี้จะมีควมสัมพันธ์กับการลดลงของ IL-6 หรือการรบกวนวิถีที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งสัญญาณของ IL-6 โดยการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เหล่านี้แสดงถึงความเป็นไปได้ที่เมโทมิลจะส่งผลกระทบต่อควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้โดยผ่านทางวิถีที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ IL-6 ได้ ซึ่งนับจะมีการทำการศึกษาต่อไป

ภาควิชา	เภสัชวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	เภสัชศาสตร์ชีวภาพ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

4176591633: MAJOR BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES

KEY WORD: METHOMYL / APOPTOSIS / LEUKOCYTIC CELLS / SPLEEN

TIPICHA POSAYANONDA EFFECTS OF METHOMYL ON CELL CYCLE AND APOPTOSIS IN LEUKOCYTIC CELLS THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PALARP SINHASANI, Ph.D., THESIS COADVISOR: RATANA SINDHUPHAK, Ph.D., pp 224. ISBN 974-17-0155-1

Methomyl is a methyl carbamate insecticide widely used in Thailand and many agricultural countries for crop protection. Effects of methomyl on modifying apoptosis in plant has been reported to induce a 0.8-1.5 nm sized-mitochondrial pore generation and cell death in male sterile maize expressing high levels of URF13 protein in its inner mitochondrial membrane (Rhoads et al., 1994; Chaumont et al., 1995).

A study of Klotz et al. (1997) suggested methomyl as an endocrine modulator. In addition, its cardiotoxicity from the developed depressor responses may not be related to the anti-acetylcholinesterase action (Saiyed et al., 1992; Futagawa et al., 2000). Lohitnavy and Sinhaseni (1998) suggested that methomyl could generate oxidative stress, as shown by the blocking effect of N-acetylcysteine on methomyl-induced cell death in spleen cells. This oxidative damage induced by methomyl is in agreement with a report from IPCS (1996), which showed that a metabolite of methomyl in the biological systems could generate oxidative stress from a glutathione depletion.

In this study, rats orally exposed to single dose of methomyl at 8 mg/kg body weight for 6 hours showed lymphocyte apoptosis. The apoptosis induced by methomyl was also shown with different sensitivities in leukocytic cell lines. In these cell lines, methomyl reduced mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) and induced apoptosis at concentrations of 18 mM (MM6), 12 mM (THP-1), and 12 mM (Jurkat) after 6 hour-exposure, and at concentrations of 12 mM (MM6), 6 mM (THP-1), and 6 mM (Jurkat) after 24 hour-exposure. Methomyl was not shown to induce nuclear apoptosis in Raji cells since DNA fragmentation was not detected, instead, the Raji cells showed a cell cycle arrest in the G₁G₁ phase.

The apoptosis occurred could be blocked by zVAD-fmk, which indicated a caspase dependent process. In addition, IL-6 could partly prevent methomyl-induced apoptosis in these cell lines, suggesting that the apoptosis was partially related to either the reduction of IL-6 or the interference in IL-6-related signaling pathways.

Transmission electron microscopic sections of spleens collected from rats after the 24 hour-oral exposure to single dose of methomyl at 8 mg/kg illustrated the mitochondrial swelling and degenerative changes with cristae loss. Cell death was shown under light microscope at the same dose of methomyl. Energy metabolism related to mitochondrial function was investigated. The results showed that the increasing levels of 2,3-DPG in blood and the increase in red blood cell NADH-DCIP reductase activity were affected and exhibited in dose-response relationship.

It is concluded that methomyl affects mitochondrial function via the interference with energy metabolism. It can induce apoptosis at high dose treatments both *in vitro* and *in vivo*. In addition, its effects on spleen show mitochondrial degeneration and cell death. Mechanisms of these effects are postulated as a possible relationship to the reduction of IL-6 or the interference with IL-6-related signaling pathways. These changes may suggest the further investigation into possible modulatory effects of methomyl on IL-6 related signals in the immune response.

Department Pharmacology, Physiology, Student's signature

and Biochemistry

Field of study Biopharmaceutical sciences Advisor's signature

Academic year 2001

Co-advisor's signature

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis could not have been completed without funding from Thailand Research Fund and the help of a number of individuals.

First and foremost I would like to thank my advisor, Associate Professor Dr. Palarp Sinhaseni, for her enthusiastic support, and encouragement in the development of this work during my years at Chulalongkorn University, and for providing me with an independent environment in which to cultivate and sharpen my scientific skills. I am extremely thankful for her endless effort to provide invaluable guidance and inspired ideas.

I would like to give a very special thank you to Dr. Ratana Sindhuphak, my co-advisor in the Institute of Health Research, Chulalongkorn University, for her help, advice, and strong support especially in my laboratory part.

I would like to thank Professor Dr. Wilhelm Schwaeble, my co-advisor in the Department of Microbiology and Immunology, University of Leicester, U.K. for providing me with wonderful facilities in his laboratory, and for his help and advice during my stay in England. I also wish to express my thank you to Professor Dr. H.-W. Loms Zeigler-Heitbrock, University of München, Germany, for MM6 and his helpful advice.

I would like to acknowledge the contributions of the members of my committee: Associate Professor Dr. Boonyong Tuntisira, Assistant Professor Dr. Surachai Unchern, and Dr. Boonsri Ongpipattanukul. Their advice, criticism, and support are very helpful and greatly appreciated.

A special thank you goes to Dr. Vira Kasantikul at the Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, for his great help and advice in the electron microscopy part.

Another special thank you goes to Dr. Yupa Onthuam in the Institute of Health Research, Chulalongkorn University, for her helpful advice on the statistic analysis.

I am deeply grateful to Roger Snowden and his colleagues in the MRC Toxicology Unit, University of Leicester, U.K. My work could not be completed without the kindness, great help, and good advice of these people, who helped me in the part of cell lines and flow cytometric analysis.

I wish to thank the Institute of Health Research, Chulalongkorn University, especially Professor Dr. Nikorn Dusitsin and Professor Dr. Peerasak Chantaraprateep for their kindness and support, and for providing me great facilities in the Institute.

I would also like to express my thanks to the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, especially the Department of Pharmacology and staff, for providing me good facilities in the laboratory.

I would like to acknowledge the help of my lovely colleagues at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University: Flg. Off. Teerayut Suramana and Ms. Nopparat Nuntharatanapong, who always stayed with me and helped me in the laboratory. I am also grateful to them for their useful advice. Many thanks go to everyone in the Lab. 4, Institute of Health Research, Chulalongkorn University, who always helped me with everything related to my laboratory work. I would also like to thank my friends in the Institute of Health Research, Chulalongkorn University, for their generous support and friendship.

I would like to thank the Allergy and Clinical Immunology Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, especially Ms. Supranee Buranapraditkun, for her technical assistance in the flow cytometric analysis part done in Thailand.

A special thank you goes to Du Pont (Thailand) Co. Ltd. for providing me methomyl and its support for my poster presentation at the 40th Annual Meeting of Society of Toxicology in San Francisco, California, U.S.A.

I wish to thank all friends in the Department of Microbiology and Immunology, University of Liecester, U.K., for their helps in the laboratory and their friendship. I had a very great time with them during my stay there.

Thanks to all my relatives and friends for their support and encouragement. Many thanks to Ms. Yolada Yaiprayoon and Ms. Kusalee Wilairat for their kindness and great help with the slides for my viva presentation.

Finally, I would like to dedicate this thesis to my loving mother, Mrs. Tomyantee Posayanonda. Her love, understanding, guidance, encouragement, sacrifices, and support from the very beginning allow me to complete my Ph.D. Although my father passed away, I would like to give a big thank you to him for his love and for teaching me to work hard and always stay with positive attitudes. I certainly love to share my success with him. Loads of thanks go to my lovely sister and brother, Ms. Juntragarn Posayanonda and Mr. Pannuchit Posayanonda for their excellent encouragement and support.

Tipicha Posayanonda

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
TABLE OF CONTENTS	viii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
Problem Statement	1
Objectives	4
Hypothesis	4
Contributions of the Study	4
II LITERATURE REVIEW	5
Carbamates	5
Methomyl	16
Acetonitrile	26
Regulation of the Cell Division Cycle and Cell Death	30
Mitochondria	43
Reactive Oxygen Species	53
Cell Signaling	55
Spleen	65
Cytology of the Spleen	71
Microcirculatory	76
Adhesion Molecules	77
Innate Immune Responses	78
Adaptive Immune Responses	85
III MATERIALS AND METHODS	91
Animals	91
Cells	91

TABLE OF CONTENTS (Continued)

	Page
CHAPTER	
III	
Chemicals	91
Equipment	92
<i>In Vitro Assays</i>	92
<i>In Vivo Assays</i>	95
Data Analysis	102
IV RESULTS	103
V DISCUSSION	174
REFERENCES	179
APPENDICES	
APPENDIX A	200
APPENDIX B	207
APPENDIX C	215
APPENDIX D	220
BIOGRAPHY	224

LIST OF TABLES

	Page
Table 1	Signs and symptoms of anticholinesterase insecticide poisoning..... 12
Table 2	Acute toxicity of technical grade methomyl in laboratory animals..... 21
Table 3	Cellular composition of the spleen..... 70
Table 4	MM6 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours..... 104
Table 5	THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours..... 105
Table 6	Jurkat cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours..... 105
Table 7	Raji cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours..... 106
Table 8	MM6 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 24 hours..... 106
Table 9	THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 24 hours..... 107
Table 10	Jurkat cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 24 hours..... 107
Table 11	Raji cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 24 hours..... 108
Table 12	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in MM6 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours..... 114
Table 13	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours..... 115
Table 14	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in Jurkat cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours..... 115

LIST OF TABLES (Continued)

	Page	
Table 15	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in Raji cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours.....	116
Table 16	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in MM6 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 24 hours.....	116
Table 17	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 24 hours.....	117
Table 18	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in Jurkat cells detected by TMRE after methomyl exposure for 24 hours.....	117
Table 19	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in Raji cells detected by TMRE after methomyl exposure for 24 hours.....	118
Table 20	Increase of MM6 cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours.....	124
Table 21	Increase of THP-1 cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours.....	125
Table 22	Increase of Jurkat cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours.....	125
Table 23	Increase of Raji cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours.....	126
Table 24	Increase of MM6 cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 24 hours.....	126
Table 25	Increase of THP-1 cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 24 hours.....	127
Table 26	Increase of Jurkat cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 24 hours.....	127

LIST OF TABLES (Continued)

	Page	
Table 27	Increase of Raji cells in the sub-G₁ area detected by PI after methomyl exposure for 24 hours.....	128
Table 28	MM6 cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours	135
Table 29	THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours	135
Table 30	Jurkat cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours	136
Table 31	Raji cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours	136
Table 32	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in MM6 cells detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours.....	142
Table 33	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours.....	142
Table 34	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in Jurkat cells detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours.....	143
Table 35	Reduction of mitochondrial transmembrane potential in Raji cells detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours.....	143
Table 36	Increase of MM6 cells in the sub-G₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours	149
Table 37	Increase of THP-1 cells in the sub-G₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours	149
Table 38	Increase of Jurkat cells in the sub-G₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours	150

LIST OF TABLES (Continued)

	Page
Table 39	Increase of Raji cells in the sub-G₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours 150
Table 40	Effects of 1 μM zVAD-fmk on THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours 156
Table 41	Effects of 10 μM zVAD-fmk on THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours 156
Table 42	Effects of 100 μM zVAD-fmk on THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours 157
Table 43	Effects of 1 μM zVAD-fmk on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 159
Table 44	Effects of 10 μM zVAD-fmk on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 159
Table 45	Effects of 100 μM zVAD-fmk on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 160
Table 46	Effects of 50 nM IL-6 on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in MM6 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 163
Table 47	Effects of 50 nM IL-6 on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 164
Table 48	Effects of 50 nM iL-6 on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in Jurkat cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 165

LIST OF TABLES (Continued)

	Page
Table 49	Rat lymphocytic cell death detected by annexin V-FITC after single dose oral-treatments of methomyl for 6 hours..... 170
Table 50	Levels of 2,3-DPG in blood collected from rat after single dose oral-treatments of methomyl for 24 hours..... 172
Table 51	NADH-DCIP reductase activities in red blood cells collected from rat after single dose oral-treatments of methomyl for 6 hours..... 173

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1	The basic structure of the carbamate esters.....9
Figure 2	The interaction between carbamate esters and acetylcholinesterase enzyme 10
Figure 3	Enzymatic process of carbamates..... 10
Figure 4	Chemical structure of methomyl..... 16
Figure 5	Metabolic pathways of methomyl in mammals..... 18
Figure 6	Cell division cycle..... 32
Figure 7	Regulation of the cell cycle..... 33
Figure 8	Cell death..... 38
Figure 9	Model of apoptotic process..... 42
Figure 10	Glycolysis pathway and mitochondria.....44
Figure 11	Glycolysis pathway.....45
Figure 12	Mitochondrial permeability transition pore and apoptosis regulation..... 48
Figure 13	Caspase activation and apoptosis.....52
Figure 14	Formation of ROSs and antioxidant mechanisms in biologic systems..... 54
Figure 15	The mitogen-activated protein kinase (MAPK) core signaling module..... 57
Figure 16	IL-6 receptor system..... 60
Figure 17	Signal transduction pathways involved with the IL-6 receptor..... 61
Figure 18	Histological appearance of red and white pulp.....66
Figure 19	Splenic circulation..... 67
Figure 20	Graph shows percentage of MM6 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours109
Figure 21	Graph shows percentage of THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours110
Figure 22	Graph shows percentage of Jurkat cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours111

LIST OF FIGURES (Continued)

	Page
Figure 23	Graph shows percentage of Raji cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours 112
Figure 24	Flow cytometric analysis of cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours 113
Figure 25	Graph shows percentage of MM6 cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 119
Figure 26	Graph shows percentage of THP-1 cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 120
Figure 27	Graph shows percentage of Jurkat cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 121
Figure 28	Graph shows percentage of Raji cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 122
Figure 29	Flow cytometric analysis of the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours 123
Figure 30	Graph shows percentage of MM6 cells in the sub-G ₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours 129
Figure 31	Graph shows percentage of THP-1 cells in the sub-G ₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours 130
Figure 32	Graph shows percentage of Jurkat cells in the sub-G ₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours 131
Figure 33	Graph shows percentage of Raji cells in the sub-G ₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours 132
Figure 34	Flow cytometric analysis of cells with DNA fragmentation in the sub-G ₁ area detected by PI after methomyl exposure for 6 hours 133

LIST OF FIGURES (Continued)

	Page
Figure 35	Flow cytometric analysis of the DNA fragmentation in Raji cells detected by PI after methomyl exposure for 6 hours 134
Figure 36	Graph shows percentage of MM6 cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours..... 137
Figure 37	Graph shows percentage of THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours..... 138
Figure 38	Graph shows percentage of Jurkat cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours..... 139
Figure 39	Graph shows percentage of Raji cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours..... 140
Figure 40	Flow cytometric analysis of cell death detected by annexin V-FITC after acetonitrile exposure for 6 hours..... 141
Figure 41	Graph shows percentage of MM6 cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours..... 144
Figure 42	Graph shows percentage of THP-1 cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours..... 145
Figure 43	Graph shows percentage of Jurkat cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours..... 146
Figure 44	Graph shows percentage of Raji cells with the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours..... 147
Figure 45	Flow cytometric analysis of the reduction of mitochondrial transmembrane potential detected by TMRE after acetonitrile exposure for 6 hours 148

LIST OF FIGURES (Continued)

	Page
Figure 46	Graph shows percentage of MM6 cells in the sub-G ₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours..... 151
Figure 47	Graph shows percentage of THP-1 cells in the sub-G ₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours..... 152
Figure 48	Graph shows percentage of Jurkat cells in the sub-G ₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours..... 153
Figure 49	Graph shows percentage of Raji cells in the sub-G ₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours..... 154
Figure 50	Flow cytometric analysis of cells with DNA fragmentation in the sub-G ₁ area detected by PI after acetonitrile exposure for 6 hours..... 155
Figure 51	Graph shows effects of 100 μ M zVAD-fmk on THP-1 cell death detected by annexin V-FITC after methomyl exposure for 6 hours 158
Figure 52	Graph shows effects of 100 μ M zVAD-fmk on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours..... 161
Figure 53	Immunoblot analysis of caspase-3 cleavage in Jurkat cells after methomyl and acetonitrile exposure for 6 hours..... 162
Figure 54	Graph shows effects of 50 nM IL-6 on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in MM6 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours..... 166
Figure 55	Graph shows effects of 50 nM IL-6 on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in THP-1 cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours..... 167
Figure 56	Graph shows effects of 50 nM IL-6 on the reduction of mitochondrial transmembrane potential in Jurkat cells detected by TMRE after methomyl exposure for 6 hours..... 168
Figure 57	Lymphocytiv cell death..... 170

LIST OF FIGURES (Continued)

	Page
Figure 58	
Electron microscopy of spleen cells collected from rats exposed to methomyl	171
Figure 59	
Levels of 2,3-DPG in blood.....	172
Figure 60	
NADH-DCIP reductase activities in red blood cells.....	173
Figure 61	
Energy production by mitochondria.....	205
Figure 62	
Glucose metabolism in the red blood cell.....	209
Figure 63	
NADH-dependent reduction of DCIP.....	213
Figure 64	
Pathways of methemoglobin reduction: NADH-dependent and NADPH-dependent	214