

اکسیدازها و مقاومت به حشره کش‌های پیرتروئید در حشرات مهم پزشکی

احمد علی عنایتی (Ph.D.)^{*} حسین لدنی (Ph.D.)^{**}

چکیده

اکسیدازها که P450 microsomal monooxygenases یا Mixed function oxidases و یا به اختصار MFO نامیده می‌شوند یک خانواده از آنزیم‌های گوناگون هستند که در بافت‌های همه موجودات هوایی از جمله حشرات یافت می‌شوند. این آنزیم‌ها به‌طور کلی در متابولیسم مواد خارجی نظیر داروها، حشره‌کش‌ها و سموم گیاهی و نیز ترکیبات ساخته شده در درون بدن حشرات نظیر اکدی استروئیدها و هورمون‌های جوانی نقش موثری دارند. این دسته از آنزیم‌ها در فعال‌سازی بیولوژیکی ترکیبات فسفوروئیوات مثل حشره‌کش‌های فسفره دخالت دارند. آنها دارای فعالیت‌های بسیار متنوعی نظیر هیدروکسیلاسیون، اپوکسیداسیون، سولفوکسیداسیون، آلکیلایون، دسولفوراسیون و دهالوژناسیون اکسایشی می‌باشند که این تنوع در فعالیت‌ها ناشی از تنوع در ساختمان این آنزیم‌ها است. تاکنون بیش از 100 ژن اکسیداز در ژنوم دروزوفیلا شناسایی شده‌اند که معمولاً به‌صورت خوشه‌ای مرتب شده‌اند. متابولیسم حشره‌کش‌ها بوسیله این دسته از آنزیم‌ها یکی از مکانیسم‌های عمومی است که حشرات بدین طریق به حشره‌کش‌ها مقاوم می‌شوند. این مقاله مروری نقش اکسیدازها در مقاومت به حشره‌کش‌ها به خصوص انواع پیرتروئید را بررسی می‌کند.

واژه‌های کلیدی : اکسیدازها، مقاومت، حشره‌کش‌ها، ناقلین

مقدمه

درمقاومت به حشره‌کش‌های پیرتروئید (مهم‌ترین دسته از حشره‌کش‌های مورد مصرف) نقش دارند عبارتند از افزایش تجزیه آن‌ها به‌وسیله آنزیم‌ها و نیز تغییر در محل اثر حشره‌کش‌ها (9-1).

البته مکانیسم‌های کم‌اهمیت‌تری نظیر کاهش جذب از طریق کوتیکول و افزایش دفع نیز وجود دارند (14-10). در بین مکانیسم‌های متابولیک مقاومت، منواکسیژنازها از همه مهم‌ترند (15). البته استرازها و گلوکوناسیون اس-

از دیرباز استفاده از انواع مختلف معدنی، گیاهی و طبیعی حشره‌کش‌ها در کنترل آفات و ناقلین بیماری‌ها رایج بوده است. پس از کشف حشره‌کش‌های مصنوعی نظیر ددت، استفاده از این مواد رو به تزاید گذاشته است. عکس العمل طبیعی جمعیت‌های حشرات درمقابل به‌کارگیری حشره‌کش‌ها، ایجاد و گسترش مقاومت می‌باشد. این پدیده که براساس اصل گزینش طبیعی رخ می‌دهد دارای مکانیسم‌های متعددی می‌باشد. مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که

* متخصص حشره‌شناسی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات بهداشت محیط مازندران

+ * ساری : کیلومتر 18 جاده خزرآباد-

دانشکده بهداشت

** متخصص حشره‌شناسی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
E تاریخ دریافت : 84/1/28 تاریخ تصویب: 84/5/22

بیش از 70 خانواده و 127 زیرخانواده ژن در ابرخانواده P450 شناسایی شده‌اند که از این تعداد 37 خانواده در جانوران و فقط 16 خانواده در پستانداران کشف گردیده‌اند (20). تاکنون شش خانواده P450 در حشرات کشف شده‌اند که پنج خانواده از آنها اختصاصاً در حشرات وجود داشته (CYP 6,9,12,18 and 28) و یک خانواده به‌طور مشترک در حشرات و مهره‌داران (CYP4) یافت می‌شود. در کل بیش از 100 نوع ژن P450 در حشرات یافت شده است (21,15). تصور می‌شود که ژن‌های P450 از یک ژن و در طی یک سری دوپلیکاسیون ژن که از حدود 360 میلیون سال پیش آغاز شد مشتق شده‌اند تا سیتوکروم P450 موجود در میکروزوم و نیز میتوکندری‌ها را به وجود آورند (22).

بیان P450 دارای طرح‌های مختلفی در مراحل مختلف زندگی و نیز بافت‌های بدن حشرات است. به‌طور کلی سطح P450 در تخم‌ها غیرقابل تشخیص است و در مراحل لاروی کم و زیاد می‌شود، در شفیره‌ها مجدداً غیرقابل تشخیص است و در مرحله بالغ در سطوح بالا بیان می‌شود (23). MFOها در روده و بافت چربی به مقادیر بالا بیان می‌شوند و ایزوفرم‌های خاصی از آنها نیز در کوتیکول و لوله‌های مالپیگی حشرات بیان می‌گردند (24,25). بعضی از ژن‌های P450 در مگس‌های خانگی به وسیله فنوباربیتالها (PB) و حشره‌کش‌هایی مثل ددت و دیلدین القاء می‌شوند (26). در

ترانسفرازها نیز حائز اهمیت زیادی هستند (16,17). به منظور درک بهتر مکانیسم پایه هیدرولیز حشره‌کش‌ها به وسیله آنزیم‌های اکسیداز، مروری مختصر بر آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

Āũ ũ ā Ū ā ũ Āũ
P450

هنگامی که رنگدانه (Pigment) میکروزومی کبکد با منواکسیدکربن اشیاء شود دارای جذب ماکزیمم در 450nm می‌شود. به همین دلیل از زمان کشف این موضوع در 40 سال پیش این آنزیم‌ها را به نام P450 می‌شناسند. البته در منابع اسامی متنوعی به این دسته از آنزیم‌ها داده‌اند که از جمله آن‌ها عبارتند از: Mixed Function Oxidases (MFOs), Cytochrome monooxygenases, P450, منواکسیژنازهای چند سوبسترای، اکسیدازهای میکروزومایی و پروتئین‌های تیولات هم که البته از بین اینها نام P450 به تنهایی بدون هیچ ابهامی می‌تواند معرف این دسته از آنزیم‌ها باشد. در نامگذاری آنزیم‌های ابرخانواده P450، پیشوند Cytochrome P450 برگرفته از Cytochrome P450 به وسیله یک رقم که بیانگر خانواده و یک حرف که بیانگر زیرخانواده و یک رقم که بیانگر خود آنزیم به‌خصوص می‌باشد دنبال می‌شود. ژن مربوط به هر آنزیم با همان علائم ولی به‌صورت ایتالیک نوشته می‌شوند. اعضاء یک خانواده و زیرخانواده از این آنزیم‌ها به ترتیب دارای 40 درصد و 55 درصد اشتراک در اسیدهای آمینه می‌باشند (18,19).

P450 Ĥũ ũ Ĥœ ũ

به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (48).

â ũōĂ Āũ Āø

Jao و Casida (1974) نقش اکسیدازها را در متابولیسم پرمترین در سوسری آلمانی نشان دادند (49). مقدار فعالیت آنزیم‌های اکسیداز در سوش مقاوم به پرمترین Village Green سوسری آلمانی به نسبت 96/9 برابر به اثبات رسیده است (50). 825 مرتبه مقاومت به فنوالرات در سوش Munsyana به وسیله سینرژيست PBO به 12 مرتبه کاهش یافته که این نشان‌دهنده درگیری آنزیم‌های اکسیداز در مقاومت به پرمترین در این سوش است (51). در سوش Aves از سوسری آلمانی نیز مقاومت به پیرتروئیدها ناشی از اکسیدازها مشاهده شد. تماس با سیزژيست PBO باعث کاهش 93 مرتبه مقاومت به پرمترین به 29 مرتبه شد. میزان فعالیت خنثی‌کنندگی آنزیم‌های اکسیداز در سوش حساس و مقاوم بترتیب برابر 2/4 به 4/2 مرتبه بودند. میزان متابولیسم وابسته و غیر وابسته به NADPH حشره‌کش سی پرمترین در این سوش 1/8 و 2/2 مرتبه بیشتر از سوش حساس بود (52). تست‌های زیست‌سنجی و سیزژيست بر روی 12 سوش جمع‌آوری شده از فیلد سوسری آلمانی مقاومت‌های متفاوتی را به پیرتروئیدها نشان داد که در 5 مورد از آنها قابل سرکوب به وسیله PBO بود که این نشان‌دهنده درگیری آنزیم‌های اکسیداز می‌باشد. مقادیر فعالیت آنزیم‌های اکسیداز در سوش مقاوم در مقایسه با سوش حساس Orlando برابر 5/6 تا 12 مرتبه بود (53).

به پیرتروئیدها در گروه‌های مختلف حشرات مهم از نظر پزشکی می‌آید.

âũ ũŵ Āũ Ā

مقاومت به حشره‌کش‌های پیرتروئید ناشی از اکسیدازهای P450 در مگس‌های خانگی کاملاً شایع است. در مگس خانگی سوش LPR از نیویورک، 5000 مرتبه مقاومت به دلتامترین اساساً ناشی از افزایش بیان P450 بوده است (42، 43). مطالعات ژنتیکی مقاومت به پیرتروئیدها با استفاده از مارکرهای مورفولژیک نشان داده است که مقاومت بسیار بالای قابل سرکوب به وسیله سینرژيست پیپرونیل بوتوکسید (PBO) در سوش LPR در ارتباط با کروموزم‌های 1 و 2 می‌باشد (44). ژن CYP6D1 بر روی کروموزوم 1 و تحت تأثیر فاکتور کنترل کننده‌ای مستقر بر روی کروموزوم 2 قرار دارد (44). این ژن در سوش LPR ده برابر سوش حساس بیان شده است (45). در سوش Rutgers مگس خانگی، 120 مرتبه مقاومت به دیازینون ناشی از p450 و متابولیسم دیازینون نیز در این سوش وابسته به NADPH می‌باشد. ژن CYP6A1 از این سوش جدا شده که دارای بیان بالایی بوده است (26). تولید مقادیر زیاد CYP6A1 در سوش Rutgers به علت تکثیر ژن نبوده بلکه به وسیله جایگاهی بر روی کروموزوم II که خود تحت تأثیر عامل کنترل کننده‌ای بر روی کروموزوم V می‌باشد کنترل می‌شود (46، 47). در سوش ALHF مگس خانگی از آلاباما، مقاومت به پرمترین ناشی از P450 بوده و نسبت مقاومت 1800 مرتبه‌ای به وسیله تماس قبلی با PBO

ژن جدید از خانواده چهار CYP4 کشف شد (67).

تست‌های سینرژیک و تست‌های بیوشیمیایی از مهم‌ترین روش‌های تعیین مکانیسم‌های آنزیمی مسئول مقاومت به حشره‌کش‌ها می‌باشند. در تست سینرژیک، بسیار مهم است که از سینرژیک‌هایی استفاده شود که به‌طور اختصاصی باعث مهار سیستم آنزیمی خاص شوند. این کار خیلی آسان نیست به‌دلیل این‌که سنیرژیک پیرونیل بوتوکسید آنزیم‌های اکسیداز و نیز استراز را مهار می‌کند (68). با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، مقادیر و یا میزان فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از سوبستراهای مدل مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. ولی گاهی رابطه خطی بین مقادیر یا میزان فعالیت آنزیم‌ها با سطوح مقاومت به حشره‌کش‌ها وجود ندارد. به‌عنوان مثال افزایش در مقادیر P450 هیچ‌گاه از 2-3 مرتبه بیشتر نمی‌شود این درحالی است که ممکن است مقاومت ناشی از اکسیدازها به بیش از 1000 مرتبه بالغ شود. بنابراین، در تفسیر نتایج این‌گونه آزمایشات باید دقت لازم مبذول گردد (15:69:70).

مطالعه در حشرات قوی‌ترین اطلاعات را در مورد سرنوشت آن‌ها در سیستم‌های زنده و نیز نقش دقیق تر گروه‌های مختلف آنزیمی در تجزیه و غیرسمی‌کردن حشره‌کش‌ها به‌دست می‌دهد (15). راه‌های متابولیسم حشره‌کش‌های پیرتروئید به‌طور وسیعی در پرستانداران و حشرات مورد مطالعه قرار گرفت. در کل دو

بخش قابل توجهی از مقاومت به پرمترین در آنوفل استغنیسی ناشی از مقادیر افزایش یافته اثر خنثی‌سازی اکسیدازها بوده است (56-54، 29).

در پشه کولکس کوئین کوفاسیاتوس از چین و عربستان سعودی، مقاومت به پیرتروئیدها اساساً ناشی از اکسیدازهای P450 بود (59-57). درگیری اکسیدازها در مقاومت به پیرتروئیدها در کولکس کوئین کوفاسیاتوس، آنوفل استغنیسی و آئدس اجیپتی از هندوستان نیز نشان داده شد (60). ژن CYP6E1 از یک سوش مقاوم به پیرتروئید کولکس کوئین کوفاسیاتوس از عربستان سعودی جدا سازی و کلون شد (61). ژن CYP6E1 نیز کلون، سکانس و بیان شد و بررسی Northern blot نشان داد که این ژن در سوش مقاوم به مراتب بیشتر از سوش حساس بیان می‌شود (62).

استفاده از پشه‌بندهای آغشته به حشره‌کش پرمترین برای مدت زمان طولانی باعث ایجاد مقاومت به این حشره‌کش در آنوفل گامبیه کنیا شد (65-63). در مطالعات بعدی مشخص شد که مکانیسم این مقاومت افزایش P450 بوده است (65). مقاومت به پیرتروئیدها در آنوفل آلبیمانوس از کشور گواتمالا اساساً ناشی از اکسیدازها بوده است (66).

درگیری تعداد زیادی از ژن‌های اکسیداز در مقاومت به پیرتروئیدها در آنوفل گامبیه با روش‌های بیولوژی مولکولی مشخص شده است. در یک مطالعه روی مکانیسم مقاومت به پرمترین، 14 ژن از خانواده شش CYP6 و دو ژن از خانواده نه CYP9 و هم‌چنین 18

سی‌پرمترین در رات با استفاده از کربن نشان‌دار در موقعیت‌های بنزیل سیکلوپروپان و سیانو از ایزومرهای ترانس و سیس نشان داد که یک مسیر متابولیسم و تجزیه استری ایزومرهای سیس، آنزیم‌های اکسیدازها می‌باشند (75:74). Casida و Suderlund (1977) تأثیر ساختمان ایزومرهای مختلف پیرتروئیدها را بر شدت هیدرولیز و هیدروکسیله شدن آنها به وسیله آنزیم‌های میکروزومی موش‌ها مورد مطالعه قرار دادند (76). آنها دریافتند که ایزومرهای ترانس 6 تا 77 مرتبه بیشتر از ایزومرهای سیس از همان مولکول متابولیزه شدند. اما باید به خاطر داشت که ایزومرهای سیس سریعتر از ایزومرهای ترانس اکسیده می‌شوند. این حساسیت به اکسیدازها در پیرتروئیدهای آلفا سیانو خیلی برجسته و مشهود نیست. به همین دلیل آنها نسبت به پیرتروئیدهای غیر آلفا سیانو در مقابل اکسیدازها مقاوم‌ترند (77).

متابولیسم پرمترین در سوسری آمریکایی، مگس خانگی و لارو کرم کلم مورد مطالعه قرار گرفت (78:33). محققین 42 متابولیت مختلف از طریق هیدروکسیلاسیون در موقعیت‌های مختلف نظیر 4 به وجود آمده بودند را گزارش کردند. مشابه این‌گونه مطالعات در پستاندران، شدت متابولیسم ایزومرهای

ترانس در این مطالعات بسیار بالاتر از ایزومرهای سیس بود و مهم‌ترین متابولیت‌ها فنوکسی بنزوئیک اسید، فنوکسی

مسیر عمده متابولیک در همه سیستم‌های زنده وجود دارد. پیرتروئیدها از نظر ساختمانی استرهای 3- فنوکسی بنزوئیل الکل و یا آلفا-سیانو- فنوکسی بنزوئیل الکل با اسیدهای کریزانتمیک هستند. اگرچه این باند استری محل اصلی اثر و فعالیت آنزیم‌های استرازاست ولی پیوند استری به وسیله اکسیدازها نیز مورد حمله قرار می‌گیرند. البته اکسیدازها سایر قسمت‌های مولکول حشره‌کش را نیز هیدروکسیله می‌کنند (71:29).

متابولیسم حشره‌کش‌ها به وسیله اکسیدازها از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی است که به وسیله آن حشرات زیجادی به انواع حشره‌کش‌ها مقاومت نشان داده‌اند (21:15). Casida و Abernathy (1973) متابولیسم زرمترین را به وسیله میکروزوم‌های تهیه شده از کبد موش‌ها مورد مطالعه قرار دادند (72). آنها دریافتند که اکسیدازها در متابولیسم زرمترین به الکل و اسید مربوطه

نقش دارند. ایزومر ترانس زرمترین با سرعت بیشتری نسبت به ایزومر سیس متابولیزه شد. همین راجحان متابولیسم ترانس به سیس در مطالعات متابولیسم زرمترین در Milkweed bugs، سوسری‌ها، مگس‌های خانگی و کرم کلم مورد ملاحظه قرار گرفت (49).

پس از تجویز خوراکی حشره‌کش‌های پیرتروئید به موش‌ها، آنها به سرعت متابولیزه شده و متابولیت‌های مربوطه اساساً از طریق ادرار و مدفوع و عمدتاً به شکل کونژوگه گلیکوزید دفع می‌شوند (73). متابولیسم

حالی که فعالیت بالای هیدرولیز سیس پرمترین در کوتیکول و روده مشاهده گردید. متابولیسم پرمترین به وسیله اکسیدازها در کولکس کوئین کوفاسیاتوس حساس و مقاوم انجام شد (61). 2500 مرتبه مقاومت پرمترین به وسیله PBO به 43 مرتبه کاهش یافت. فعالیت P450 2/5 بار بیشتر از سوش حساس بود. میکروزوم های تهیه شده از روده و سایر نقاط بدن از سوش مقاوم با حضور NADPH 62 درصد و 46 درصد از پرمترین تجویز شده را متابولیزه کردند در حالی که شدت متابولیسم در سوش حساس 12/1 درصد و 2/3 درصد بود. مهم ترین متابولیت ناشی از اکسیداسیون 4' هیدوروکسی پرمترین و مهم ترین متابولیت هیدورلیز فنوکسی بنزوئیل ال کل بوده اند (61).

۷۴

اکسیدازها دسته بسیار مهمی از آنزیم ها هستند که در همه جانداران هوازی وجود دارند. نقش اصلی این آنزیم ها تسهیل واکنش های متابولیسم مواد سمی خارجی و داخلی در بدن جانداران می باشد. متابولیسم حشره کش ها به وسیله اکسیدازها پاسخ سازشی و تکاملی است که تحت تاثیر فشارهای گزینشی حشره کش ها در حشرات به وجود می آید. تغییرات کمی و کیفی اکسیدازها از بعد افزایش در بیان ژن و نیز ایجاد تنوع در آنها از مکانیسم های ایجاد مقاومت به حشره کش ها می باشد. تا کنون بیش از 100 نوع مختلف اکسیداز در حشرات شناسایی شدند که عمده آنها در مقاومت به حشره کش ها نقش اساسی دارند. این آمار با مشخص شدن ژنوم

بنزوئیل ال کل و 4' هیدوروکسی پرمترین بودند. اکسیدازها فقط زمانی فعال هستند که با NADPH تقویت شده باشند. بنابراین محلول آنزیم بدون افزودن NADPH به عنوان شاهد و محلول آنزیم باضافه NADPH فعالیت اکسیداز را اندازه گیری می کند. مهم ترین روش متابولیسم پرمترین هیدرولیز پیونداستری به وسیله استراز و یا اکسیدازها و نیز هیدروکسیلاسیون گروه متیل موقعیت های 2' و 4' و 6' بخش اسیدی و گروه فنوکسی بنزوئیل بخش ال کل مولکول های سیس و ترانس می باشند. تجزیه بیشتر متابولیت ها به وسیله حملات اکسیداسیون بر آلدهیدها و اسیدهای کربوکسیلیک اتفاق می افتد. در کل اکسیدازها در رات و موش خانگی ایزومر سیس را بیشتر از ترانس متابولیزه می کنند (78).

گونه ویژگی در شدت متابولیسم ایزومرهای سیس و ترانس مشاهده شده است. به عنوان مثال میکروزوم مگس خانگی فقط متیل ترانس ایزومر ترانس پرترین را هیدروکسیله می کند ولی آنزیم های کرم کلم ترجیحاً گروه متیل ترانس ایزومر سیس پرمترین را هیدروکسیله می کند. اگر چه موقعیت 4' بیشترین نقطه هیدروکسیلاسیون می باشد ولی میکروزوم های موش و مگس خانگی موقعیت 6' ترانس و سیس پرترین را و میکروزوم های موش موقعیت 2' سیس پرترین را هیدروکسیله می کنند (79).

بافت ویژگی نیز در متابولیسم پرمترین در لارو آرمیورم مشاهده شد. همونای کوتیکول، بافت چربی و روده شدیدترین هیدرولیز ترانس پرمترین را نشان دادند در

کنترل و در نهایت نقش آن‌ها در ایجاد و گسترش مقاومت به حشره‌کش‌ها و روش‌های مدیریت آن و در نتیجه کنترل کارآمدتر ناقلین بیماری‌ها می‌کند.

حشراتی مثل مگس سرکه و آنوفل گامبیه رو به افزایش است. مطالعه جنبه‌های مختلف کمی و کیفی آنزیم‌های اکسیداز در حشرات کمک زیادی در شناخت ابعاد مختلف تولید، بیان،

فهرست منابع

1. French Constant R.H. Target site mediated insecticide resistance: what questions remain? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999; 29: 397-403.
2. Enayati A.A, H. Vatandoost, H. Ladonni, et al. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2003; 17: 138-144
3. Enayati A.A. Residue Analysis On And Efficacy Of Pyrethroid-Impregnated Bednets Against Resistant *Anopheles*, in Liverpool School of Tropical Medicine. 2002, Liverpool: Liverpool
4. Crawford M.J., A. Croucher, D.H. Hutson, The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats; excreted metabolites. *Pesticide Science*, 1981; 12: 399-411.
5. Leahey J.P. The metabolism and environmental degradation of the pyrethroid insecticides. *unknown*, 1980: 135-142.
6. Hodgson E., R.L. Rose, D.K. Goh, et al. Insect cytochrome P-450: metabolism and resistance to insecticides. *Biochem Soc Trans*, 1993; 21(4): 1060-5.
7. Hooper G.H.S. Metabolism of insecticides by *Culex pipiens quinquefasciatus* I. In vivo metabolism of DDT by larvae. *Journal of Economic Entomology*, 1967; 61: 490-493.
8. Hemingway J., J. Miyamoto, P.R.J. Herath, A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1991; 39: 49-56.
9. Enayati, A.A. H. Ladonni, Mechanism of DDT and permethrin resistance in *Anopheles stephensi* from Bandar-Abbas, Iran. *MJMS*, 1997; 6(13): 31-37.
10. Ahmad M, A.R. McCaffery, Penetration and Metabolism of trans-Cypermethrin in a Susceptible and a Pyrethroid-Resistant Strain of *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 1999; 65: 6-14.
11. Chang C.K, T.W. Jordan, Penetration and metabolism of topically applied permethrin and cypermethrin in pyrethroid-tolerant *Wiseana cervinata* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1982; 17: 196-204.

12. Delorme R., D. Fournier, J. Chaufaux, et al. Esterase metabolism and reduced penetration are causes of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* HUB (Noctuidae: Lepidoptera). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1988; 32: 240-246.
13. Eldefrawi M.E, W.M. Hoskins, Relation of the rate of penetration and metabolism to the toxicity of Sevin to three insect species. *Journal of Economic Entomology*, 1961; 54: 401-405.
14. Noppun V., T.Saito, T. Miyata, Cuticular penetration and metabolism of phenthoate in the resistant and susceptible diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Journal of Pesticide Science*, 1987; 12: 85-94.
15. Scott J.G., Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999; 29(9): 757-77.
16. Oppenoorth F.J., H.R. Smitsaert, W. Welling, et al. Insensitive acetylcholinesterase, high glutathione S-transferase, and hydrolytic activity as resistance factors in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1977; 7: 34-47.
17. Oppenoorth F.J., L.J.T. Van der Pas, N.W.H. Houx, Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1979; 11: 176-188.
18. Nebert D.W., D.R. Nelson, M.J. Coon, et al. The p450 superfamily-update on new sequences, gene-mapping, and recommended nomenclature. *Dna And Cell Biology*, 1991; 10: 1-14.
19. Nelson D.R., T. Kamataki, D.J.Waxman, et al. The p450 superfamily - update on new sequences, gene-mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *Dna And Cell Biology*, 1993; 12(1): 1-51.
20. Nelson D.R. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1998; 121(1-3): 15-22.
21. Feyereisen R. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 1999; 44: 507-533.
22. Nelson D.R, H.W. Strobel, Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol Biol Evol*, 1987; 4(6): 572-93.
23. Agosin M. Role of microsomal oxidations in insecticide degradation, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Physiology*, G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Editors. 1985, *Pergamon: Oxford*. p. 647-712.
24. Abdel-Aal Y.A.I, D.M. Soderlund, Pyrethroid hydrolyzing esterases in Southern armyworm larvae: tissue distribution, kinetic properties, and selective

- inhibition. Pesticide *Biochemistry and Physiology*, 1980; 14: 282-289.
25. Scott J.G., S.S. Lee, Tissue distribution of microsomal cytochrome P-450 monooxygenases and their inducibility by phenobarbital in the insecticide resistant LPR strain of house fly, *Musca domestica* L. *Insect Biochem Mol Biol*, 1993; 23(6): 729-3.
 26. Carino F., J.F. Koener, F.W. Plapp, et al. Expression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in the housefly, *Musca domestica*. *Molecular mechanisms of insecticide resistance*, 1992; CH3:p. 31-40.
 27. Feyereisen R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters*, 1995; 82/83: 83-90.
 28. Liu N, T. Tomita, J.G. Scott, Allele-specific PCR reveals that CYP6D1 is on chromosome 1 in the house fly, *Musca domestica*. *Experientia*, 1995;51: 164-167.
 29. Matsumura F. *Toxicology of Insecticides*. 2 ed. 1985, New York, USA: Plenum Press. 1-598.
 30. Guengerich F. The chemistry of cytochrome P450 reactions. *Cytochromes P450*, ed. C. Ioannides. 1996: CRC Press, Inc.
 31. Rendic S, F.J. Di Carlo, Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev*, 1997; 29(1-2): 413-580.
 32. Lindberg R.L, M. Negishi, Alteration of mouse cytochrome P450c₁ substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature*, 1989; 339(6226): 632-4.
 33. Shono T., T. Unai, J.E. Casida, Metabolism of permethrin isomers in American cockroach adults, housefly adults, and cabbage looper larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1978; 9: 96-106.
 34. Ray J.W. The epoxidation of aldrin by housefly microsomes and its inhibition by carbon monoxide. *Biochem. Pharmacol.*, 1967; 16: 99-107.
 35. Feyereisen R. Insect cytochrome-p450- new look at an old target. *Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society*, 1989; 197: 108.
 36. Friedberg T., W. Kissel, M. Arand, et al. Production of site-specific P450 antibodies using recombinant fusion proteins as antigens. *Methods Enzymol*, 1991; 206: 193-201.
 37. Synder M.J., J.A. Scott, J.F. Andersen, et al. Sampling P450 diversity by cloning polymerase chain reaction products obtained with degenerate primers. *Methods in enzymology*, 1996; 272: 304-312.
 38. Scott J.A., F.H. Collins, R. Feyereisen, Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito, *Anopheles albimanus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994; 205: 1452-1459.

39. Tijet N., C. Helvig, R. Feyereisen, The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: *annotation, intron-exon organization and phylogeny*. *Gene*, 2001; 262(1-2): 189-98.
40. Georghiou G.P, R.L. Metcalf, The absorption and metabolism of 3-isopropylphenyl N-methylcarbamate by susceptible and carbamate-selected strains of houseflies. *Journal of Economic Entomology*, 1961; 54: 231-233.
41. Scott J.G., Uptake distribution of ¹⁴C-permethrin in *Blattella germanica* by surface contact and topical application routes of exposure. *Journal of Pesticide Science*, 1990; 15: 453-455.
42. Scott J.G, G.P. Georghiou, Rapid development of high level permethrin resistance in a field collected strain of the housefly (Diptera: Muscidae) under laboratory selection. *Journal of Economic Entomology*, 1985; 78: 316-319.
43. Scott J.G., Preparation of microsomes from insects and purification of CYP6D1 from house flies. *Methods Enzymol*, 1996; 272: 287-92.
44. Liu N, J.G. Scott, Genetics of resistance to pyrethroid insecticides in the house fly, *Musca domestica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1995. 52: p. 116-124.
45. Liu N, J.G. Scott, Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450 mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998; 28: 531-535.
46. Tate L.G., F.W. Plapp, E. Hodgson, Genetics of cytochrome P450 in two insecticide resistant strains of the housefly, *Musca domestica* L. *Biochemical Genetics*, 1974; 11: 49-64.
47. Feyereisen R., J.F. Andersen, F.A. Carino, et al. Cytochrome P450 in the house fly: structure, catalytic activity and regulation of expression of CYP6A1 in an insecticide resistant strain. *Pesticide Science*, 1995; 43: 233-239.
48. Liu N, X. Yue, Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol*, 2000; 93(4): 1269-75.
49. Jao L.T, J.E. Casida, Insect pyrethroid-hydrolysing esterases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1974; 4: 465-472.
50. Anspaugh D.D., R.L. Rose, P.G. Koehler, et al. Multiple Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the German Cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1994; 50: 138-140.
51. Wu D., M.E. Scharf, J.J. Neal, et al. Mechanisms of Fenvalerate Resistance in the German Cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1998; 61: 53-62.
52. Valles S.M., K. Dong, R. Brenner, Mechanisms Responsible for Cypermethrin Resistance in a Strain of German Cockroach, *Blattella germanica*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 2000; 66: 195-205.

53. Valles S.M. Toxicological and Biochemical Studies with Field Populations of the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 1998; 62: 190-200.
54. Ladonni H. Genetics and biochemistry of insecticide resistance in *Anopheles stephensi*, in *School of Tropical Medicine*. 1988, Liverpool: Liverpool.
55. Vatandoost H. The functional basis of pyrethroid resistance in the malaria vector, *Anopheles stephensi*., in *School of Tropical Medicine*. 1996, Liverpool: Liverpool.
56. Enayati A.A. Cross resistance between DDT and permethrin in *Anopheles stephensi* from Iran, in *Faculty of Medicine*. 1992, *Tarbiat Modarress*: Tehran. p. 213.
57. Jianhua S, J. Jialiang, Studies on the insecticide-binding spectrum of microsomal cytochrome P-450 from larvae of mosquitoes (*Culex pipiens pallens* Coq). *Kexue Tongbao*, 1987; 32: 988-992.
58. Jianhua S, J. Jialiang, Difference spectral characterisation of microsomal cytochrome P-450 from larvae of mosquitoes (*Culex pipiens pallens* Coq). *Kexue Tongbao*, 1987; 32: 408-412.
59. Amin A.M, J. Hemingway, Preliminary investigation of the mechanisms of DDT and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae) from Saudi Arabia. *Bulletin of Entomological Research*, 1989; 79: 361-366.
60. Kumar S., A. Thomas, M.K. Pillai, Involvement of mono-oxygenases as a major mechanism of deltamethrin-resistance in larvae of three species of mosquitoes. *Indian J Exp Biol*, 1991; 29(4): 379-84
61. Kasai S., I.S. Weerasinghe, T. Shono, P450 Monooxygenases Are an Important Mechanism of Permethrin Resistance in *Culex quinquefasciatus* Say Larvae. *Arch.Insect Biochem.& Physiol.*, 1998; 37: 47-56.
62. Kasai S, S.J. G., Overexpression of Cytochrome P450 CYP6D1 Is Associated with Monooxygenase-Mediated Pyrethroid Resistance in House Flies from Georgia. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 2000; 68: 34-41.
63. Vulule J.M., R.F. Beach, F.K. Atieli, et al. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, 1994; 8: 71-75.
64. Vulule J.M., R.F. Beach, F.K. Atieli, et al. Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. *Med Vet Entomol*, 1996; 10(1): 71-9.
65. Vulule J.M., R.F. Beach, F.K. Atieli, et al. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in

- Anopheles gambiae from Kenyan villages using permethrin-impregnated bednets. *Med. Vet. Ent.*, 1999; 13: 239-244.
66. Brogdon W.G., J.C. McAllister, A.M. Corwin, et al. Oxidase-based DDT-pyrethroids cross-resistance in Guatemalan Anopheles albimanus. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 1999; 64: 101-111.
67. Ranson H., N. Nikou, M. Hutchinson, et al. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 from the malaria vector, Anopheles gambiae. *Insect Molecular Biology*, 2002; 11(5): 409-418.
68. Gunning R.V., G.D. Moores, A.L. Devonshire, Esterase Inhibitors Synergise the Toxicity of Pyrethroids in Australian Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 1999; 63: 50-62
69. Berge J., R. Feyereisen, M. Amichot, Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1998; 353: 1701-1705.
70. Scott J.G., S. Kasai, Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004; 78: 171-178.
71. Hassall K.A. The biochemistry and use of pesticides: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. 1990, *London: Mac Millan*. -536.
72. Abernathy C.O., J. Casida, Pyrethroid insecticides: esterase cleavage in relation to selective toxicity. *Science*, 1973; 179: 1235-1236.
73. Nobuyoshi M., J. Yoshimura, A. Kaneko, et al. Metabolism in Rats of 3-Phenoxybenzyl Alcohol and 3-Phenoxybenzoic Acid Glucosid Conjugates Formed in Plants. *Pesticide Science*, 1985; 16: 33-45.
74. Crawford M.J., A. Croucher, D.H. Hutson, Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1981; 29: 130-135.
75. Hutson D.H., L.C. Gaughan, J.E. Casida, Metabolism of the cis- and trans-isomers of cypermethrin in mice. *Pesticide Science*, 1981; 12: 385-398.
76. Soderlund D.M., J.E. Casida, Effects of pyrethroid structure on rates of hydrolysis and oxidation by mouse liver microsomal enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1977; 7: 391-401.
77. Casida J.E., L.C. Gaughan, L.O. Ruzo, Comparative Metabolism of Pyrethroids. Comparative Metabolism of Pyrethroids Derived from 3-Phenoxybenzyl and α -Cyano-3-Phenoxybenzyl Alcohols. 1997; 182-189.
78. Shono T., K. Ohsawa, J.E. Casida, Metabolism of trans- and cis-permethrin, trans and cis-cypermethrin and decamethrin by microsomal enzymes. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 1979;
27: 316-325.

79. Shono T, J.E. Casida, Species-specificity
in enzymatic oxidation of pyrethroid
insecticides: 3-phenoxybenzyl and a-cyano-

3-phenoxybenzyl 3-(2,2-dihalovinyl)- 2,2-
dimethylcyclopropanecarboxylates.

Journal of Pesticide Science, 1978. 3: p.
165- 168.