Thesis Title In Vitro Metabolism of Permethrin in Cytochrome P450 Enzyme from Pyrethroid Resistant and Susceptible *Aedes aegypti* Strains

Author Miss Puckavadee Somwang

Degree Doctor of Philosophy (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-advisor
Dr. La-aied Prapanthadara	Co-advisor

ABSTRACT

Control of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue virus, by using insecticides has led to resistance throughout the world. Previous studies have shown that permethrin resistance in selected PMD-R strain of *Ae. aegypti* from Chiang Mai, Thailand, was associated with a homozygous mutation in the knockdown resistance (*kdr*) gene and other mechanisms. In this study, the metabolic mechanism of resistance of this strain was compared to the PMD strain which is susceptible to permethrin. The permethrin susceptibility of larvae was determined by dose-response bioassay. Two synergists, namely piperonyl butoxide (PBO) and bis-(4-nitrophenyl)-phosphate (BNPP), were also added to determine if the resistance is conferred by oxidase or esterase enzymes, respectively. The LC_{50} value for PMD-R (25.42 ppb) was ~25-fold higher than for PMD (1.02 ppb). The LC_{50} was reduced 3.03-fold in PMD-R and 2.27-fold in PMD when the oxidase inhibitor (PBO) was added, but little or no reduction was observed in the presence of BNPP, indicating that oxidase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

enzymes play an important role in resistance. However, the LC_{50} previously observed in the heterozygous mutation form was reduced ~8-fold, indicating that metabolic resistance is inferior to *kdr*. The levels of cytochrome P450 (P450) extracted from fourth instar larvae were similar in both strains and were about 2.3-fold greater in microsomal fractions than in crude supernatant and cytosol fractions. Microsome oxidase activities were determined by incubation with each of three substrates, i.e., permethrin, phenoxybenzyl alcohol (PBOH) and phenoxybenzaldehyde (PBCHO), in the presence or absence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), PBO, and BNPP. It is known that hydrolysis of permethrin produces PBOH which is further oxidized to PBCHO by alcohol dehydrogenase (ADH) and then to phenoxybenzoic acid (PBCOOH) by aldehyde dehydrogenase (ALDH). When incubated with permethrin, a small amount of PBCOOH was detected in both strains (about 1.1-1.2 nmole/min/mg protein), regardless of the addition of NADPH. The addition of PBO resulted in about 70% and 50% reduction of PBCOOH in PMD and PMD-R, respectively. The addition of BNPP reduced PBCOOH about 50% and 35% in PMD and PMD-R, respectively. Using PBOH as substrate increased PBCOOH ~16-fold and ~40-fold in PMD and PMD-R, respectively. Using PBCHO as substrate increased PBCOOH ~26-fold and ~50-fold in PMD and PMD-R, respectively. The addition of NADPH, and particularly NAD^+, increased the level of PBCOOH. Together, the results have indicated the presence of a metabolic mechanism involving P450, ADHs, and ALDHs in both PMD and PMD-R strains, with greater enzyme activity in the latter.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เมแทบอลิซึมของเพอร์เมธรินในหลอดทดลองในเอนไซม์ไซโตโครม พี450 จากยุงลายสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อไพรีทรอยด์

ผู้เขียน นางสาวภควดี สมหวัง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. นพ. คม สุคนธสรรพ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวังโกศล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. ละเอียด ประพันธดารา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การควบคุมยุงลาย *Aedes aegypti* พาหะนำเชื้อไวรัสเดงกี่โดยการใช้สารเคมีฆ่าแมลง ทำให้เกิดการดื้อต่อสารเคมีขึ้นทั่วโลก จากการศึกษาที่ผ่านมาถึงกลไกการดื้อต่อเพอร์เมธรินในยุงลายสายพันธุ์ PMD-R จากจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์แบบจับคู่เหมือน (homozygous) ของ *kdr* (knockdown resistance) ยีน และมีกลไกอื่นร่วม ในการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบเมแทบอลิซึมต่อการย่อยสลายเพอร์เมธรินในยุงลายสายพันธุ์ PMD-R กับสายพันธุ์ PMD ซึ่งไวต่อเพอร์เมธริน โดยการวัดระดับความไวต่อเพอร์เมธรินของลูกน้ำโดยวิธี dose-response bioassay และใส่สาร piperonyl butoxide (PBO) และ bis-(4-nitrophyenyl)-phosphate (BNPP) เพื่อทดสอบดูว่ากลไกการดื้อเกี่ยวข้องกับเอนไซม์อ๊อกซิเดสหรือเอสเทอร์เรสตามลำดับ พบว่าค่า LC_{50} ของสายพันธุ์ PMD-R (25.42 ppb) สูงกว่าสายพันธุ์ PMD (1.02 ppb) ประมาณ 25 เท่า เมื่อเติม PBO ค่า LC_{50} ของสายพันธุ์ PMD-R ลดลง 3.03 เท่า และของสายพันธุ์ PMD ลดลง 2.27 แต่พบการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเติม BNPP แสดงว่าเอนไซม์อ๊อกซิเดสมีบทบาทสำคัญต่อการดื้อเพอร์เมธริน อย่างไรก็ตามในการศึกษาที่ผ่านมาค่า LC_{50} ของยุงที่มี *kdr* ยีนแบบจับคู่ต่าง (heterozygous) ลดลงประมาณ 8 เท่าแสดงว่ากลไกการดื้อโดยเมแทบอลิซึม มีประสิทธิภาพด้อยกว่า จากการวัดปริมาณไซโตโครม พี 450 ที่สกัดจากลูกน้ำยุงระยะที่สี่ของยุงทั้งสองสายพันธุ์พบว่ามีปริมาณพอๆกัน โดยมีในส่วนไมโครโซมมากกว่าส่วนสกัดหยาบและ ไซโทซอล 2.3 เท่า สารสกัดไมโครโซมจึงถูกนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์อ๊อกซิเดสต่อการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมแทบอลิซึมเพอร์เมธรินในหลอดทดลองโดยให้ทำปฏิกิริยากับสารเพอร์เมธริน, phenoxybenzyl alcohol (PBOH) และ phenoxybenzaldehyde (PBCHO) กับการเติมหรือไม่เติม nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), PBO และ BNPP เนื่องจากเป็นที่รู้กันว่ากระบวนการเมแทบอลิซึมเพอร์เมธรินในขั้นแรกจะถูกไฮโดรไลซิสได้ PBOH และถูกอ๊อกซิไดซ์ต่อโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) ได้ PBCHO และ phenoxybenzoic acid (PBCOOH) โดยเอนไซม์แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase, ALDH)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มเพอร์เมธรินกับไมโครโซมแล้ววัดผลิตผลจากการเมแทบอลิซึม (PBCOOH) พบว่ายุงทั้งสองสายพันธุ์ย่อยสลายเพอร์เมธรินได้เพียงเล็กน้อย (1.1-1.2 nmol/min/mg protein) ไม่ว่าจะมี NADPH หรือไม่ก็ตาม เมื่อเติม PBO พบว่า PBCOOH ลดลง 70% และ 50% ในยุงลายสายพันธุ์ PMD และ PMD-R และเมื่อเติม BNPP พบว่า PBCOOH ลดลง 50% และ 35% ในยุงลายสายพันธุ์ PMD และ PMD-R ตามลำดับ เมื่อใช้ PBOH เป็นสารตั้งต้นพบว่าเอนไซม์จากสารสกัดไมโครโซมสามารถย่อยสลายได้ดีกว่าเมื่อใช้เพอร์เมธรินเป็นสารตั้งต้น โดยวัด PBCOOH ได้มากขึ้น 16 และ 40 เท่าในยุงลายสายพันธุ์ PMD และ PMD-R เช่นเดียวกับเมื่อใช้ PBCHO เป็นสารตั้งต้นสามารถวัด PBCOOH ได้มากขึ้น 26 และ 50 เท่าในยุงลายสายพันธุ์ PMD และ PMD-R ตามลำดับ เมื่อเติมตัวเร่งปฏิกิริยา NADPH และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง NAD^+ พบว่าสามารถเร่งกระบวนการเมแทบอลิซึมได้มากขึ้น จากผลการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่าเอนไซม์ไซโตโครม พี 450, แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมเพอร์เมธรินในยุงลายทั้งสองสายพันธุ์ แต่การย่อยสลายเกิดขึ้นมากกว่าในสายพันธุ์ PMD-R

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved