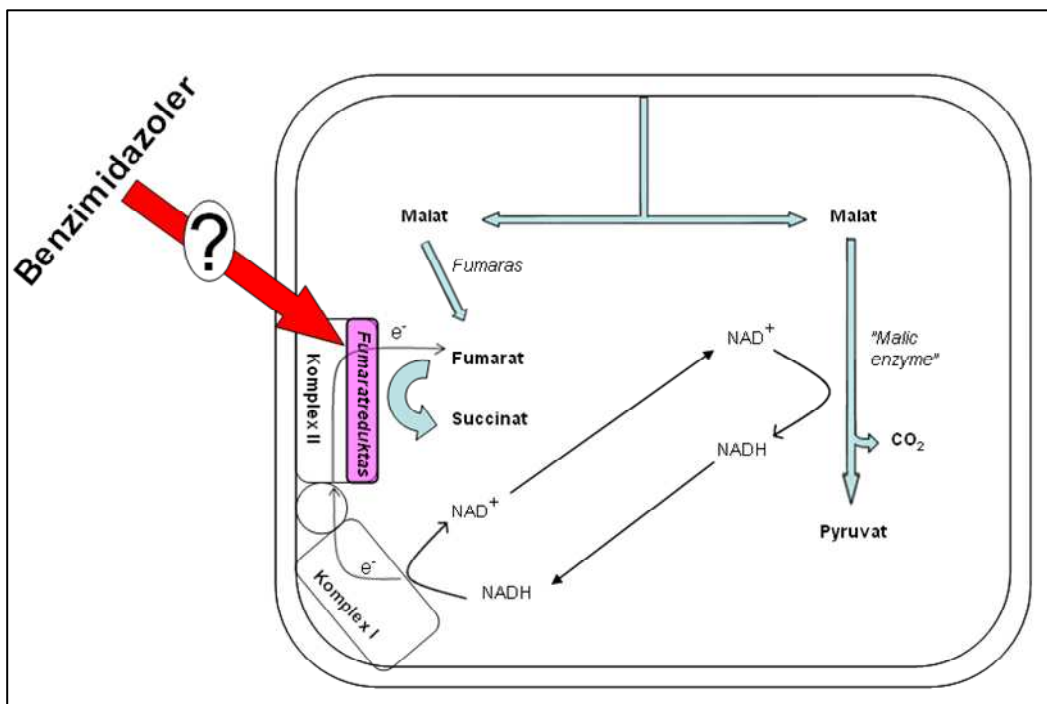


Fumaratreduktas som möjlig verkningsplats för benzimidazoler

Rebecca Oldenburg



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 52

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2012



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Fumaratreduktas som möjlig verkningsplats för benzimidazoler

Fumarate reductase as a possible site of action for benzimidazoles

Rebecca Oldenburg

Handledare:

Johan Höglund, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2012

Omslagsbild: Rebecca Oldenburg

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 52
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: benzimidazoler, fumaratreduktas, verkningsmekanism, verkningsplats, anaerob respiration

Key words: benzimidazoles, fumarate reductase, mechanism of action, site of action, anaerobic respiration

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Summary.....	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturöversikt.....	4
Fumaratreduktas och den anaeroba respirationen.....	4
Studier på hur benzimidazoler påverkar fumaratreduktas.....	12
Undersökningsmetoder som har använts i studierna.....	12
Resultat från studierna.....	13
Diskussion.....	18
Referenser.....	21

SAMMANFATTNING

Många parasiter, framförallt arter som lever som endoparasiter i syrefattiga miljöer som värdjurets tarm, har anaerob respiration under vissa eller flera av sina utvecklingsstadier. Den anaeroba respirationen hos parasiten skiljer sig på många sätt ifrån värdjurets aeroba respiration och dessa skillnader utgör potentiella mål vid anthelmintikabehandling.

Enzymet fumaratreduktas är ett exempel på ett sådant mål. Fumaratreduktas finns inte hos värdjuret men hos många parasiter fyller detta enzym en nyckelfunktion dels i den anaeroba elektrontransportkedjan och dels då glukos kataboliseras i den anaeroba kolhydratmetabolismen via fosfoenolpyruvatkarboxykinas-succinat-vägen. Hos benzimidazolerna, som är en flitigt använd grupp av anthelmintika (avmaskningsmedel) hos många djurslag, är den huvudsakliga verkningsmekanismen att det sker en inhibering av mikrotubulipolymeriseringen, men flera studier tyder även på att fumaratreduktas utgör ytterligare en potentiell verkningsplats.

Samtliga studier som redovisas i detta arbete visar på att benzimidazoler har en inhiberande effekt på fumaratreduktasaktiviteten hos de undersökta parasiterna. Den hämmande effekten som uppmättes varierade emellertid kraftigt mellan olika benzimidazolpreparat. Även effekten för samma preparat varierade i vissa fall i olika studier. Att resultaten varierar för de olika benzimidazolpreparaten är väntat då det trots allt rör sig om olika preparat med olika potens. Att resultatet också varierar för samma preparat i olika studier kan eventuellt bero på skillnader i hur försöken genomfördes, men också på genetiska skillnader mellan de parasiter som användes i de olika studierna. Även om den uppmätta effekten skiljer sig en del mellan studierna pekar trots allt resultaten från samtliga studier som redovisas i detta arbete ändå i samma riktning, nämligen att benzimidazoler uppvisar en inhibitorisk effekt på aktiviteten hos fumaratreduktas. Huruvida det rör sig om en direkt hämmande effekt på själva fumaratreduktaset eller om den inhiberande effekten uppstår sekundärt som en följd av inhiberingen av mikrotubulipolymeriseringen är dock oklart. Oklart är också om den effekt som uppmätts *in vitro* också uppstår hos parasiten *in vivo*. För att svara på dessa frågor behövs mer forskning.

SUMMARY

Many parasites, especially species living as endoparasites in low oxygen environments such as the host animal's intestine, have an anaerobic respiration during one or more stages of their life cycle. The anaerobic respiration of the parasite differs in many ways from the host's aerobic respiration and these differences represent potential targets for anthelmintic attack.

The enzyme fumarate reductase is an example of such a target. The host doesn't have fumarate reductase but in many parasites this enzyme has a key function both in the anaerobic electron transport chain and in the phosphoenolpyruvatecarboxykinase-succinate-pathway in anaerobic glucose catabolism. The main mechanism of action of the benzimidazoles, which is a widely used group of anthelmintics, is by inhibition of the microtubule polymerization, but several studies also indicate that fumarate reductase is an additional site of action.

In all of the studies presented in this work, the benzimidazoles showed an inhibitory effect on the activity of fumarate reductase in the parasites examined. However, the measured inhibitory effect varied considerably between different benzimidazole drugs. In some cases the effect also varied for the same drug in different studies. That the result varies between the different benzimidazole drugs was expected since they after all are different drugs with different potency. That the result also varies for the same drug in different studies could possibly be due both to differences in how the experiments were carried out and to genetic differences between the parasites that were used. Even though the measured effect differs somewhat between the studies, it is nonetheless still so that the results from the studies presented in this work all point in the same direction, namely that the benzimidazoles really would seem to have an inhibitory effect on the activity of fumarate reductase. It is, however, unclear whether the measured inhibitory effect on the fumarate reductase activity is due to a direct inhibition of the enzyme itself or whether it is a secondary effect that arises as a consequence of the inhibition of the polymerization of microtubule. It is also unclear whether or not the effect that has been measured *in vitro* also happens in the parasite *in vivo*. To answer these questions, more research is needed.

INLEDNING

År 1961 lanserades tiabendazol som den första benzimidazolen. Man hade då inte klart för sig *hur* detta bredspektrumantelmintikum verkade utan man visste helt enkelt bara *att* det hade effekt. I tiabendazols fotspår följde sedan under 60- och 70-talet en hel rad nya benzimidazolpreparat. Det var då fortfarande ännu inte känt hur benzimidazolerna verkade utan dessa preparat togs fram genom s.k. "trial-and-error"; man genomförde helt enkelt en *in vivo* parasitologisk screening av tusentals olika molekylära kombinationer och tittade på vilka kombinationer som hade effekt och vilka som inte hade det (Lacey, 1988).

Under årens lopp har flera olika verkningsplatser och verkningsmekanismer föreslagits för benzimidazolerna. Ett spår som många forskare var inne på framförallt i slutet av 70- och början av 80-talet var att åtminstone vissa av benzimidazolerna verkade genom att störa energimetabolismen hos parasiten via inhibering av vissa reaktionssteg som saknas hos värdjurets energimetabolism. Framförallt lades mycket fokus på enzymet fumaratreduktas, ett enzym som är viktigt i den anaeroba respirationen hos många olika parasiter.

Idag verkar forskarvärlden dock vara ense om att benzimidazolerna huvudsakligen verkar genom att binda till β -tubulin och därmed inhibera polymeriseringen av mikrotubuli. Dock finns det studier som tyder på att benzimidazoler, utöver inhiberingen av mikrotubuli, också har en hämmande effekt på enzymet fumaratreduktas. Detta arbete är fokuserat på fumaratreduktas och den huvudsakligen äldre forskning som har gjorts på detta enzym som en potentiell *ytterligare* verkningsplats för benzimidazolerna.

En stor del av fokusen i detta arbete ligger också på att ge en bild av vad fumaratreduktas är och hur det passar in i den anaeroba respirationen. För att arbetet inte ska bli alltför spretigt har författaren valt att begränsa sig till bara helminter.

MATERIAL OCH METODER

De databaser som användes för att söka vetenskapliga artiklar var främst PubMed och ScienceDirect. För att hitta artiklar med studier på om benzimidazoler påverkar fumaratreduktas kombinerades söktermer som "benzimidazoles", "thiabendazole", "cambendazole", "albendazole" o.s.v. med söktermer som t.ex. "fumarate reductase", "carbohydrate metabolism", "energy metabolism", "anaerobic respiration", "enzyme activity", "electron transport chain", "complex II", "site of action" och "mechanism of action". En del av dessa söktermer användes också för att söka efter fakta om fumaratreduktas och anaerob respiration. Även en del böcker i cellbiologi och parasitologi har använts för att få en bild av ämnet.

LITTERATURÖVERSIKT

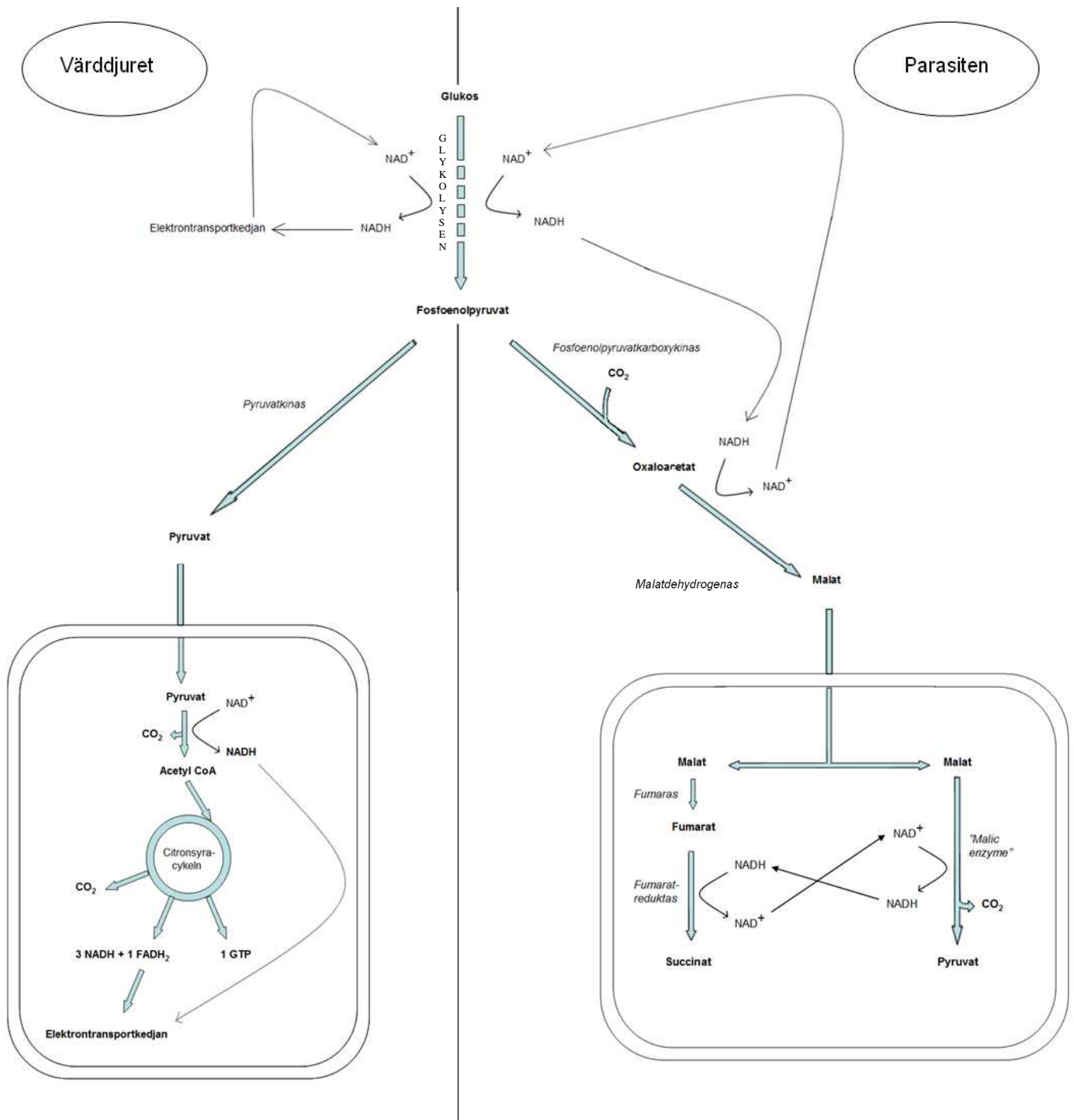
Många parasitarter, framförallt de som lever i syrefattiga miljöer som t.ex. värddjurets tarm, uppvisar anaerob (syrefattig) respiration under vissa stadier av sin utveckling. Den anaeroba respirationen skiljer sig på många sätt ifrån värddjurets aeroba respiration och det går därmed att hos dessa parasiter hitta en del reaktionsvägar och enzymer som inte finns hos värddjuret. Dessa utgör potentiella mål vid anthelmintikabehandling (Saz, 1981). Vissa benzimidazoler har i studier (Malkin & Camacho, 1972; Prichard, 1973; Romanowski et al., 1975; Rahman & Bryant, 1977; Barrowman et al., 1984; Criado-Fornelio et al., 1990; Armson et al., 1995) visat sig inhibera enzymet fumaratreduktas som ingår som nyckelenzym i den anaeroba respirationen hos många parasiter.

Fumaratreduktas och den anaeroba respirationen

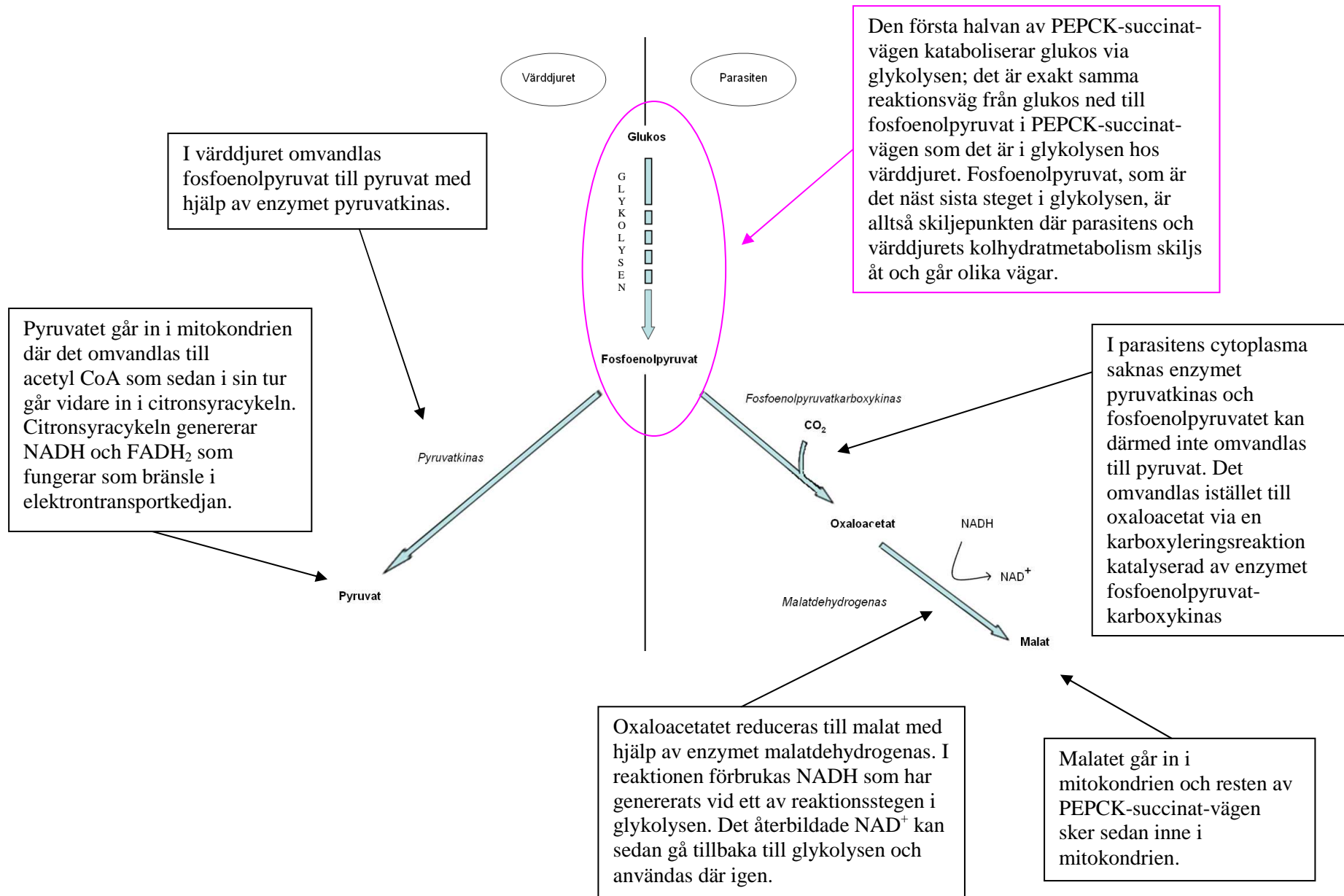
Fumaratreduktas är ett enzym som katalyserar reduktionen av fumarat till succinat i fosfoenolpyruvatkarboxykinas-succinat-vägen (se figur 1, 2 och 3), förkortat PEPCK-succinat-vägen, som är den väg som glukos kataboliserar i den anaeroba kolhydratmetabolismen hos många olika parasiter (Saz, 1981; Kita et al., 2002).

Fumaratreduktas är inte bara ett viktigt enzym i PEPCK-succinat-vägen utan fyller också en funktion i den anaeroba (syrefattiga) elektrontransportkedjan. Fumaratreduktas utgör nämligen en del av quinol:fumarate reductase (QFR) som är den anaeroba elektrontransportkedjans version av elektrontransportkomplex II. QFR är närbesläktad med succinate:ubiquinone reductase (SQR) som är den aeroba elektrontransportkedjans version av komplex II (Kita et al., 2002). Den aeroba elektrontransportkedjan beskrivs i figur 4 och den anaeroba elektrontransportkedjan beskrivs i figur 5. Figur 6 förtydligar hur aktiviteten hos den anaeroba elektrontransportkedjans version av komplex II, QFR, skiljer sig från den aeroba elektrontransportkedjans version av komplex II, SQR.

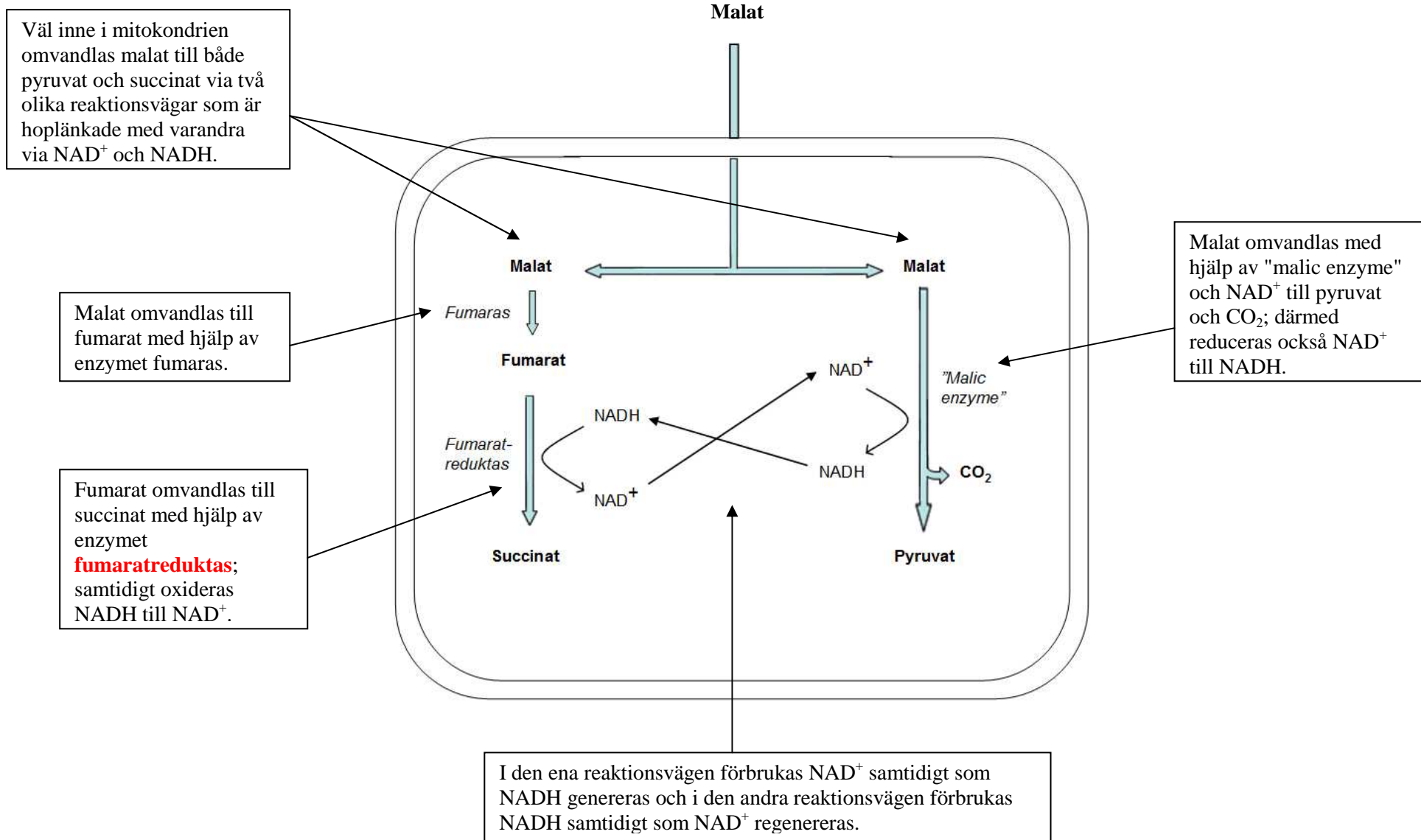
Den anaeroba elektrontransportkedjan och PEPCK-succinat-vägen hänger ihop med varandra vid steget där fumarat reduceras till succinat samtidigt som NADH oxideras till NAD^+ . Fumaratreduktas, som en del av komplex II i elektrontransportkedjan, katalyserar detta steg (figur 7). Utan ett fungerande fumaratreduktas avstannar följaktligen både elektrontransportkedjan och PEPCK-succinat-vägen (Kita et al., 2002).



Figur 1. Översiktsbild över likheter och skillnader mellan värdjurets aeroba metabolism och parasitens anaeroba. I parasiten kataboliseras glukos via PEPCK-succinat-vägen och den anaeroba elektrontransportkedjan. Värdjuret kataboliserar istället glukos via glykolysen och den aeroba elektrontransportkedjan. Den första halvan av PEPCK-succinat-vägen, från glukos ned till fosfoenolpyruvat, är gemensam med värdjurets glykolys (Saz, 1981; Kita et al., 2002; Alberts et al., 2009). För mer detaljer på PEPCK-succinat-vägen se figur 2 och 3.



Figur 2. Första halvan av PEPCK-succinat-vägen. Samtliga reaktioner som visas i figuren äger rum i cytoplasman (Saz, 1981; Kita et al., 2002; Alberts et al., 2009)



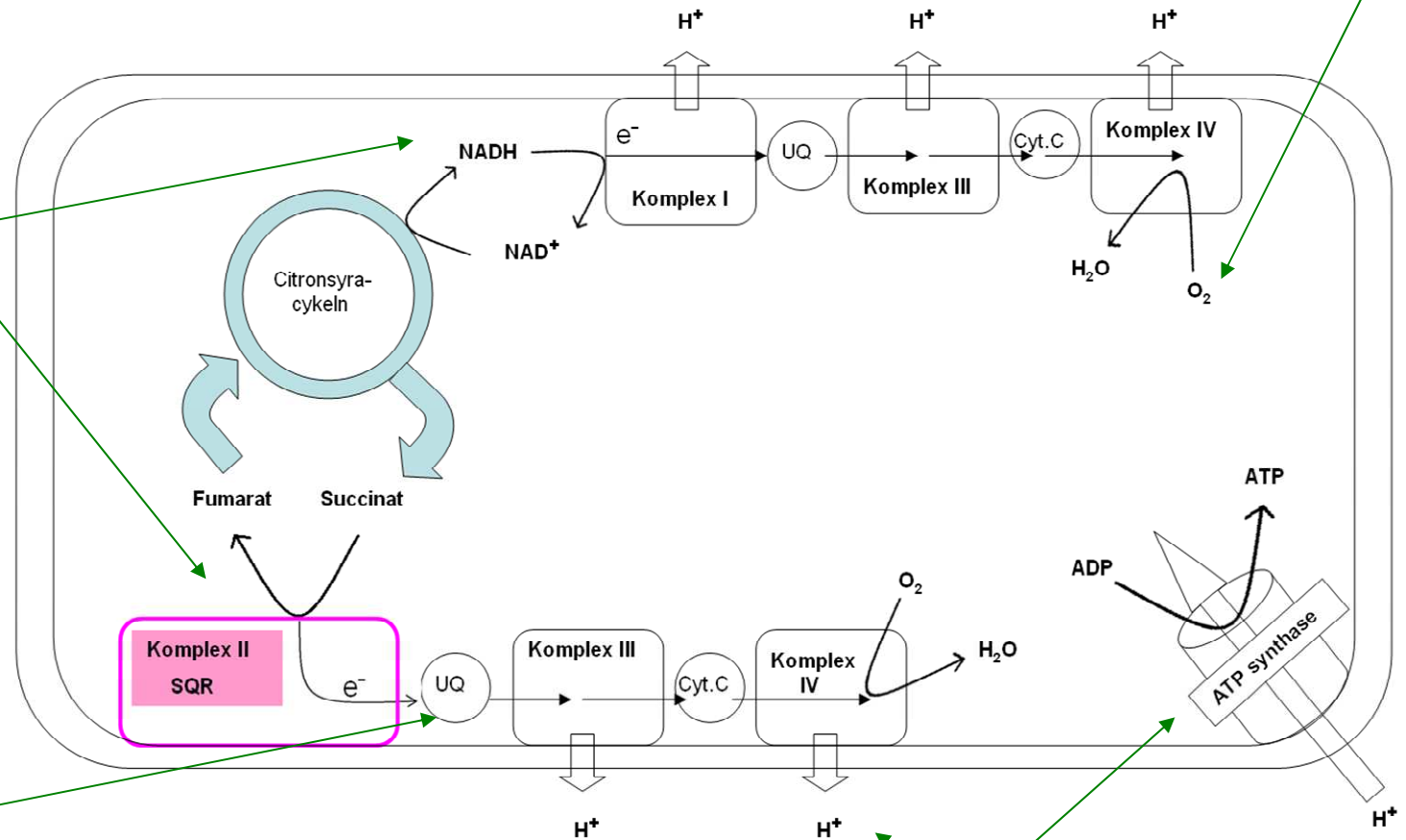
Figur 3. Andra halvan av PEPCK-succinat-vägen. Samtliga reaktioner som visas i figuren äger rum inuti mitokondrien (Saz, 1981; Kita et al., 2002).

Aerob elektrontransportkedja

Består av fyra elektrontransportkomplex (I-IV)

Elektronerna kommer in i kedjan på två ställen: komplex I och komplex II. Vid komplex I är det NADH som donerar elektroner och vid komplex II är det succinat (via FADH_2). Både NADH och succinat genereras genom citronsyracykeln.

Ubikinon (UQ) överför elektroner mellan komplex II och komplex III.



Vid komplex IV överförs elektronerna till den slutgiltiga elektronmottagaren som är syre. Syre omvandlas till vatten.

I samband med elektronöverföringen vid komplex I, III och IV pumpas protoner, H^+ , ut ur mitokondrien och på så vis byggs det upp en protongradient över mitokondriemembranet. Denna protongradient kan sedan driva ATP-syntesen vid det membranbundna komplexet ATP synthase

Figur 4. Den aeroba elektrontransportkedjan (Alberts et al., 2009)

Anaerob elektrontransportkedja

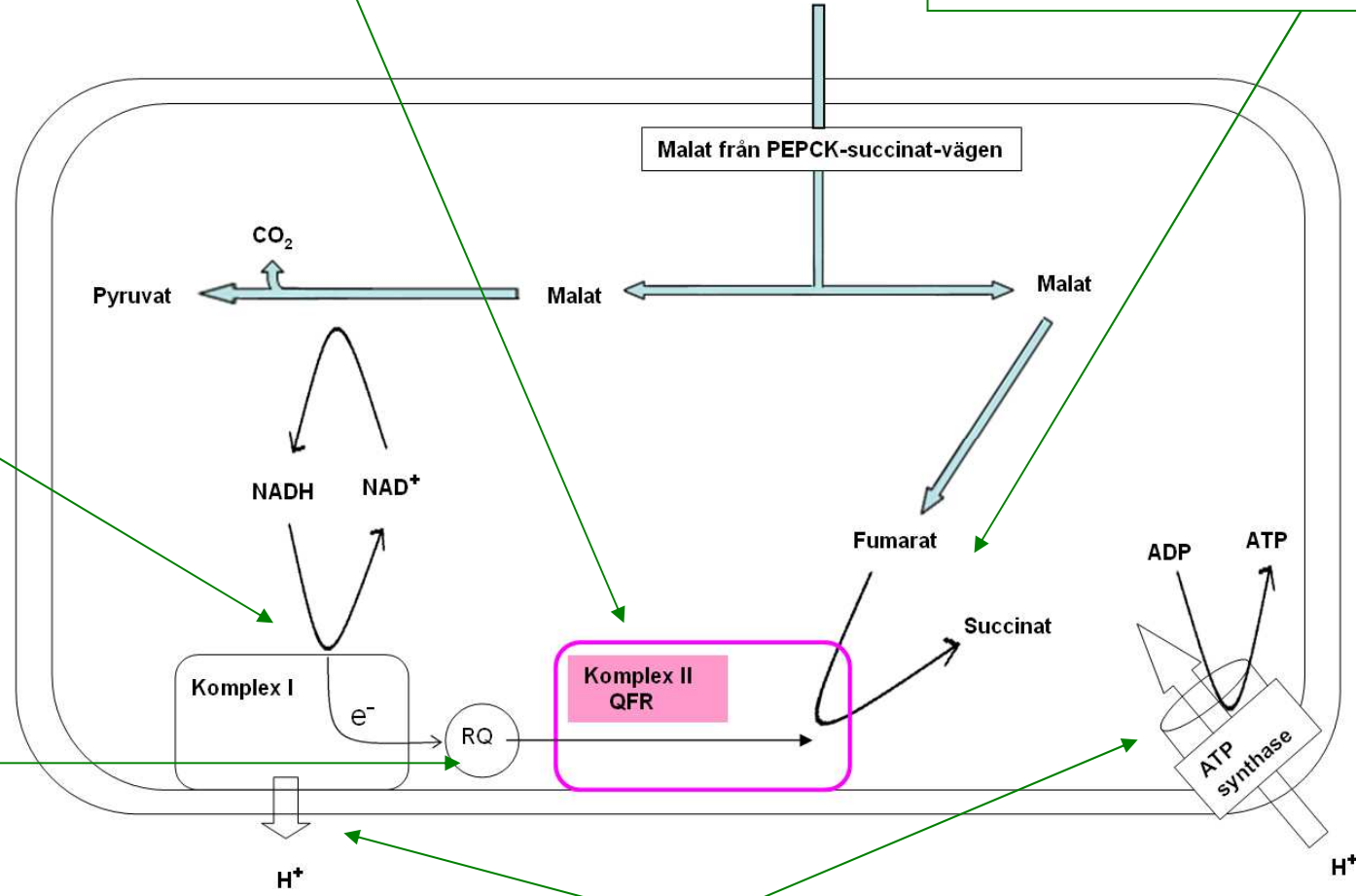
Består av bara två elektrontransportkomplex (I-II)

Elektronerna kommer in i kedjan vid komplex I. De doneras av NADH som genereras i reaktionen när malat omvandlas till pyruvat i PEPCK-succinat-vägen.

Rhodokinon (RQ) överför elektroner mellan komplex I och komplex II

Fumaratreduktas ingår som en del av komplex II

Vid komplex II överförs elektronerna till den slutgiltiga elektronmottagaren som är fumarat. Fumaratet bildas från malat i PEPCK-succinat-vägen.

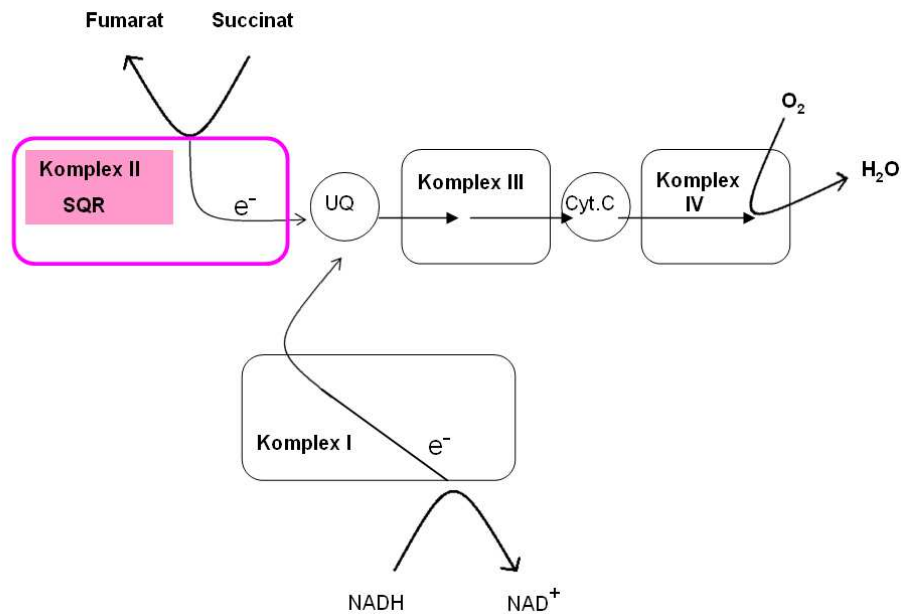


Figur 5. Den anaeroba elektrontransportkedjan (Kita et al., 2002)

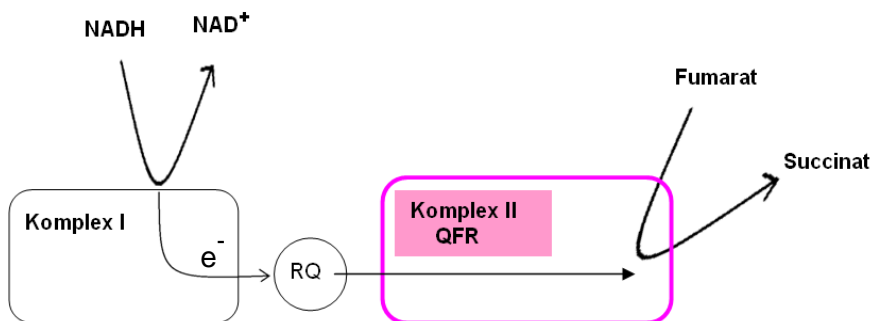
I samband med elektronöverföringen vid komplex I pumpas protoner, H⁺, ut ur mitokondrien och på så vis byggs det upp en protongradient över mitokondriemembranet. Denna protongradient kan sedan driva ATP-syntesen vid det membranbundna komplexet ATP synthase.

Den anaeroba elektrontransportkedjan är mindre energigivande än den aeroba då H⁺ bara pumpas ut vid ett komplex istället för vid tre.

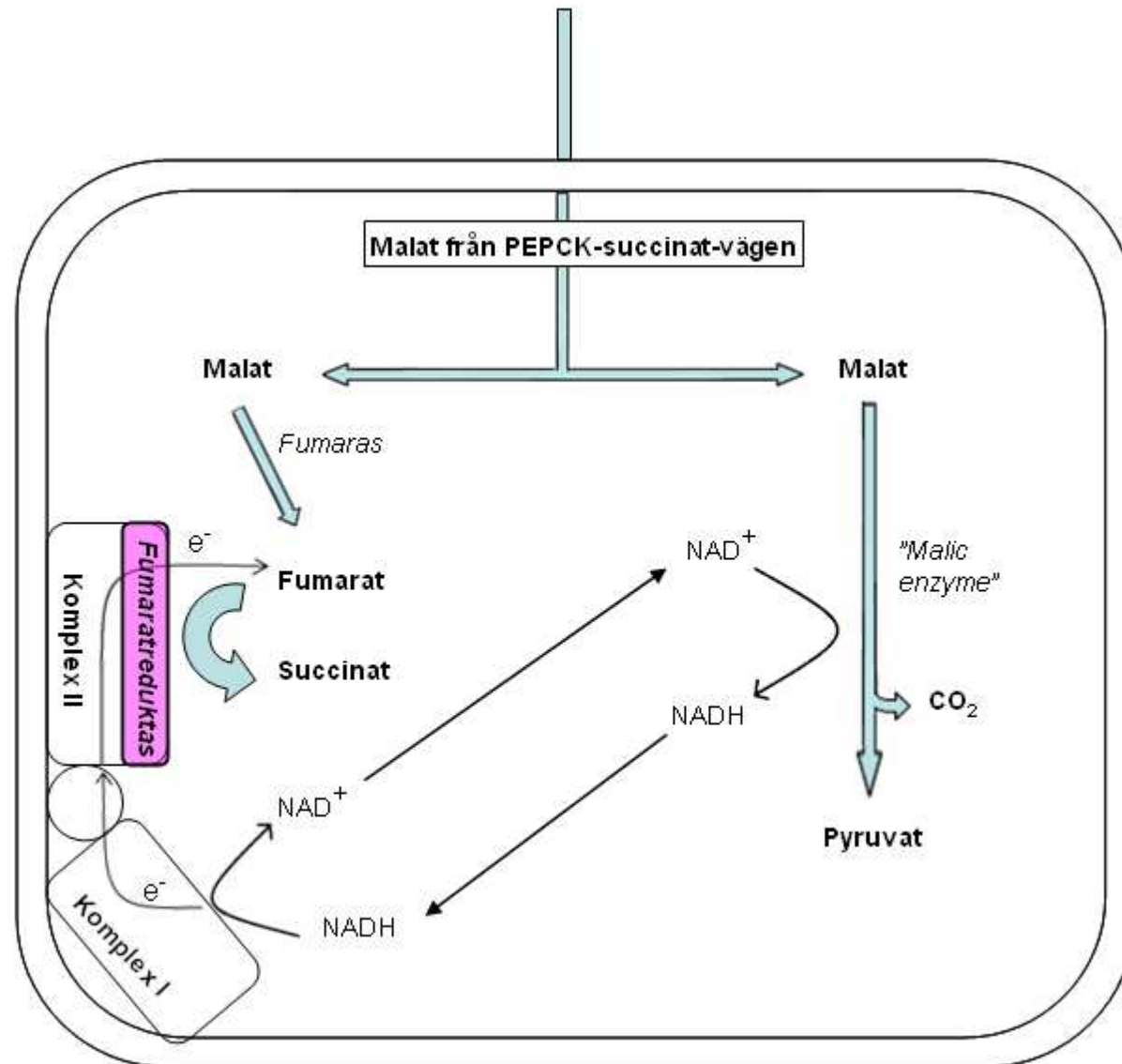
Aerob elektrontransportkedja



Anaerob elektrontransportkedja



Figur 6. I den aeroba elektrontransportkedjan katalyserar komplex II elektronöverföringen från succinat till ubikinon (UQ) varpå succinat oxideras till fumarat och den frigjorda elektronen fortsätter vidare i elektrontransportkedjan via komplex III och IV bort till den slutgiltiga elektronmottagaren som är syre. I den anaeroba elektrontransportkedjan katalyserar komplex II det omvända elektronflödet, dvs. från rhodokinon (RQ) till fumarat; fumarat fungerar som slutgiltig elektronmottagare och reduceras till succinat. Anledningen till att komplex II kan katalysera elektronflödet i två motsatta riktningar beroende på om det sitter i den aeroba eller i den anaeroba elektrontransportkedjan är att det finns två olika former av detta komplex: SQR som finns i den aeroba elektrontransportkedjan och QFR som finns i den anaeroba elektrontransportkedjan. Fumaratreduktas ingår som en del av QFR (Kita et al., 2002).



Figur 7. Den anaeroba elektrontransportkedjan och PEPCK-succinat-vägen hänger ihop med varandra vid steget där fumarat reduceras till succinat samtidigt som NADH oxideras till NAD^+ . Fumaratreduktas, som en del av komplex II i elektrontransportkedjan, katalyserar detta steg (Kita et al., 2002).

Studier på hur benzimidazoler påverkar fumaratreduktas

Detta arbete kommer att ta upp sju olika studier där en eller flera benzimidazolers påverkan på aktiviteten av fumaratreduktas har undersökts:

- Tre av studierna – Malkin och Camacho (1972), Prichard (1973) samt Romanowski et al. (1975) – har undersökt effekten av tiabendazol (TBZ) och cambendazol (CBZ) på fumaratreduktas i benzimidazol(BZ)-resistenta och benzimidazol(BZ)-känsliga isolat av adulta *Haemonchus contortus*. Prichard undersökte också effekten av mebendazol (MBZ).
- Rahman och Bryant (1977) studerade effekten av CBZ och MBZ på fumaratreduktas och andra delar av energimetabolismen hos bandmasken *Moniezia expansa*.
- Barrowman et al. (1984) undersökte hur fumaratreduktasaktiviteten hos adulta *Ascaris suum* påverkas av benzimidazolerna albendazol (ABZ), albendazolsulfoxid (ABZSO), MBZ, fenbendazol (FBZ), oxfendazol (OFZ) och TBZ samt probenzimidazolen febantel. Även en del av de anthelmintiskt inaktiva metaboliterna till dessa benzimidazoler samt ämnet colchicine testades
- Criado-Fornelio et al. (1990) undersökte vilka biokemiska effekter luxabendazol (LBZ) har i muskelstadiumlarver av *Trichinella spiralis*. Bland annat undersöktes effekten på fumaratreduktas.
- Armson et al. (1995) genomförde en studie av hur olika elektrontransportinhibitorer och TBZ påverkar fumaratreduktas i L3-larver av *Strongyloides ratti*.

Undersökningsmetoder som har använts i studierna

Fumaratreduktas katalyserar, som tidigare nämnts, reduktionen av fumarat till succinat; samtidigt oxideras också NADH till NAD⁺. För att mäta aktiviteten av fumaratreduktas kan man antingen mäta mängden succinat som produceras eller så kan man mäta oxidationshastigheten av NADH (nmol NADH som oxideras per min per mg protein).

I de studier som tas upp i det här arbetet har författarna i de flesta fall valt att mäta oxidationshastigheten av NADH. I samtliga fall har då en spektrofotometrisk analys använts. NADH har ett absorptionsmaximum vid 340 nm medan NAD⁺ saknar absorbans vid denna våglängd; detta betyder att oxidationen av NADH kan följas med hjälp av en spektrofotometer eftersom absorbansen vid 340 nm minskar i takt med att NADH omvandlas till NAD⁺. Grundreaktionsmixen som man i allmänhet har utgått ifrån i dessa försök har sett aningen olika ut i de olika studierna, men gemensamt har varit att mixen har innehållit framrenade mitokondrier från parasiten. I flera av studierna har mitokondrierna brutits upp till s.k. submitokondriella partiklar med hjälp av sonikering. För att undersöka om en vald benzimidazol verkar inhiberande på fumaratreduktas har oxidationshastigheten för när enbart NADH och natriumfumarat tillsatts till reaktionsmixen jämförts med oxidationshastigheten för när man, utöver NADH och natriumfumarat, även tillsatt benzimidazolen. Man har alltså räknat oxidationshastigheten som uppmäts för när bara NADH och natriumfumarat tillsatts som full enzymaktivitet hos fumaratreduktaset, d.v.s. 100 % aktivitet, och

oxidationshastigheten som blir när man också tillsätter benzimidazolen som en procent av detta. Ett litet räkneexempel för att förtydliga: om oxidationshastigheten är 80 nmol/min/mg protein för när enbart NADH och natriumfumarat har tillsatts till reaktionsmixen och oxidationshastigheten är 60 nmol/min/mg protein för när man, utöver NADH och natriumfumarat, också har tillsatt en benzimidazol, räknar man att fumaratreduktasaktiviteten har sjunkit från 100 % i frånvaro av benzimidazolen till 75 % ($60/80 = 0,75$) i närvaro av benzimidazolen, d.v.s. benzimidazolen har inhiberat enzymaktiviteten hos fumaratreduktas med 25 % ($100 \% - 75 \%$).

Försöket med MBZ i Prichards studie (1973) och försöken med MBZ och CBZ i Rahman och Bryants studie (1977) är de enda undantagen i de studier som redovisas i detta arbete där man inte har mätt oxidationshastigheten av NADH. I dessa försök använde man sig istället av en radioisotopmetod i vilken ^{14}C -fumarat tillsattes och bildandet av ^{14}C -succinat mättes. Kortfattat går metoden ut på att fumarat märks genom att byta ut vissa av de stabila kolatomerna i molekylerna mot den radioaktiva isotopen ^{14}C . Sedan inkuberas det isotopmärkta fumaratet tillsammans med framrenade mitokondrier från parasiten och NADH. Under inkubationstiden kommer, om fumaratreduktas är aktivt, det isotopmärkta fumaratet att omvandlas till succinat. Eftersom det succinat som bildas också kommer att innehålla de radioaktiva kolisotoperna är det möjligt att räkna ut hur många succinatmolekyler som bildats. Detta förfarande upprepas därefter med en reaktionsmix som, utöver de övriga ämnena, också innehåller den benzimidazol som man vill testa. Antalet bildade succinatmolekyler i de båda försöken kan sedan jämföras och man kan på detta vis få en uppfattning om huruvida benzimidazolen har inhiberat fumaratreduktaset eller inte och i så fall med ungefär hur många procent.

Resultat från studierna

Alla de sju olika studierna fann i nästan samtliga försök en tydlig inhiberande effekt för benzimidazolerna på fumaratreduktasaktiviteten i de undersökta parasiterna. Det enda försök där ingen inhiberande effekt kunde uppmätas var försöket med MBZ i Prichards studie (1973) av *Haemonchus contortus*. I denna studie kunde ingen signifikant inhibering av fumaratreduktas påvisas för MBZ hos vare sig BZ-känsliga eller BZ-resistenta isolat. Prichard skriver emellertid att den uteblivna effekten inte behöver betyda att MBZ inte har någon effekt på fumaratreduktas utan att resultatet istället skulle kunna bero på att MBZ, till skillnad från de övriga två benzimidazolerna i hans studie, var för svårlöst för att användas som en lösning och istället måste undersökas i suspensionsform. I övriga studier där MBZ testades fann man en tydlig inhibitorisk effekt på fumaratreduktas även för denna benzimidazol; Rahman och Bryant (1977) påvisade en inhibering på 38 % för MBZ och Barrowman et al. (1984) påvisade en inhibering på 32 % för MBZ.

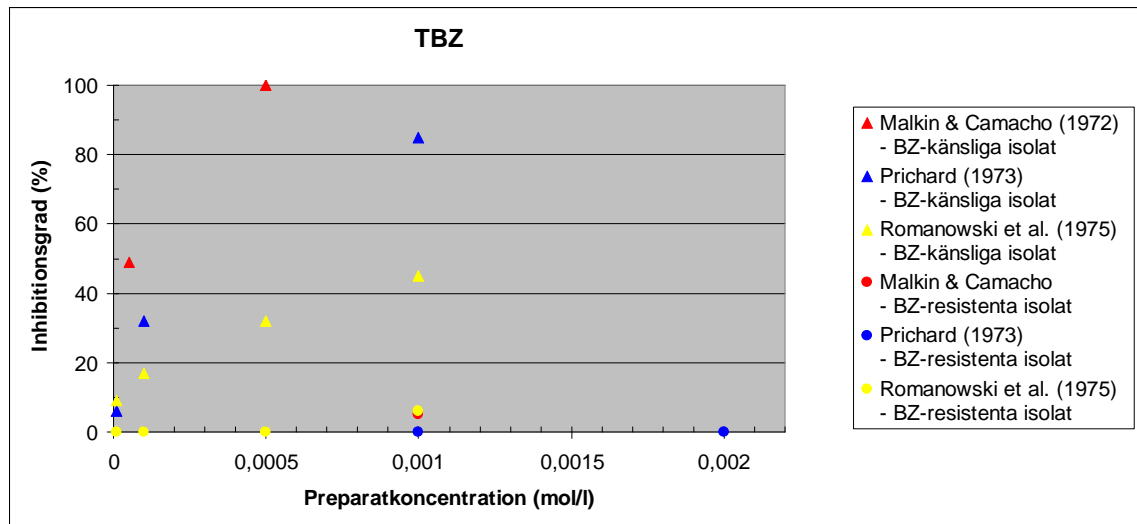
I de studier där flera olika preparatkoncentrationer har testats för de olika benzimidazolerna sågs en positiv korrelation mellan preparatkoncentration och uppmätt inhibitionsgrad. Resultaten skiljer sig dock en del mellan olika studier både vad gäller den grad av inhibition som uppmättes för de olika benzimidazolerna och den preparatkoncentration som krävdes. I tabell 1 på nästa sida har resultaten från de olika studierna sammanfattats.

Tabell 1. Sammanfattning av resultaten från de olika studierna. Inhibitionsgraden definieras som det antal procent som aktiviteten av fumaratreduktas minskade i närvaro av det testade preparatet jämfört med frånvaro av preparatet. Observera att preparatkoncentrationerna för studierna Rahman och Bryant (1977) och Barrowman et al. (1984) har räknats om från procent respektive µg/ml till mol/l. Benzimidazolernas molmassor hämtades från <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

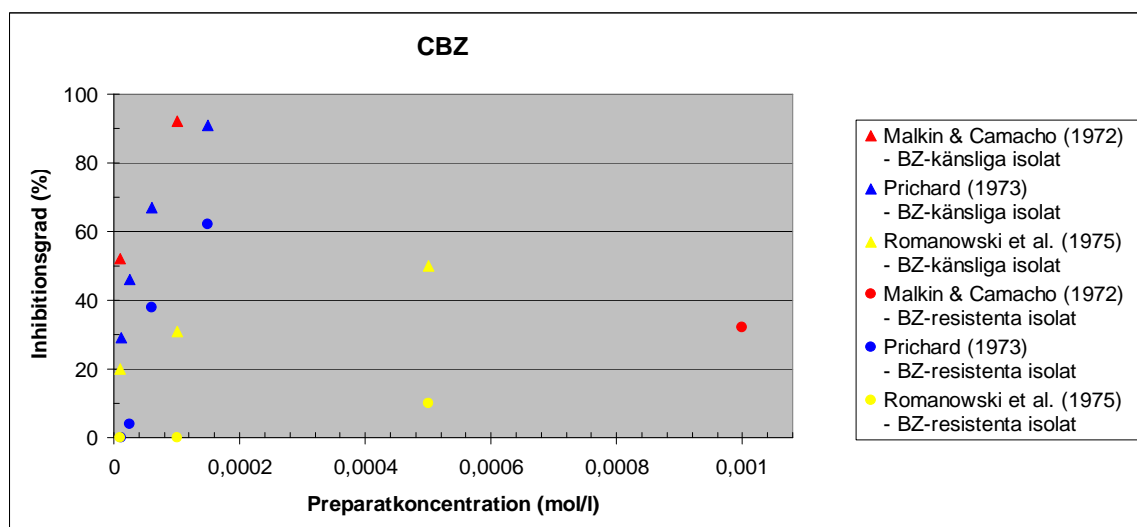
	Preparat och koncentration M = mol/l	Inhibitionsgrad
Malkin och Camacho (1972)		
BZ-känsliga <i>Haemonchus contortus</i> (adulta)	TBZ – 5,0 x 10 ⁻⁵ M	49 %
	TBZ – 5,0 x 10 ⁻⁴ M	100 %
	CBZ – 1,0 x 10 ⁻⁵ M	52 %
	CBZ – 1,0 x 10 ⁻⁴ M	92 %
BZ-resistenta <i>Haemonchus contortus</i> (adulta)	TBZ – 1,0 x 10 ⁻³ M	5 %
	CBZ – 1,0 x 10 ⁻³ M	32 %
Prichard (1973)		
BZ-känsliga <i>Haemonchus contortus</i> (adulta)	TBZ – 1,0 x 10 ⁻⁵ M	6 %
	TBZ – 1,0 x 10 ⁻⁴ M	32 %
	TBZ – 1,0 x 10 ⁻³ M	85 %
	CBZ – 1,2 x 10 ⁻⁵ M	29 %
	CBZ – 2,5 x 10 ⁻⁵ M	46 %
	CBZ – 6,0 x 10 ⁻⁵ M	67 %
	CBZ – 1,5 x 10 ⁻⁴ M	91 %
	MBZ – 2,5 x 10 ⁻³ M	Ingen signifikant effekt
BZ-resistenta <i>Haemonchus contortus</i> (adulta)	TBZ – 1,0 x 10 ⁻³ M	0 %
	TBZ – 2,0 x 10 ⁻³ M	0 %
	CBZ – 1,2 x 10 ⁻⁵ M	0 %
	CBZ – 2,5 x 10 ⁻⁵ M	4 %
	CBZ – 6,0 x 10 ⁻⁵ M	38 %
	CBZ – 1,5 x 10 ⁻⁴ M	62 %
MBZ – 2,5 x 10 ⁻³ M	Ingen signifikant effekt	
Romanowski et al. (1975)		
BZ-känsliga <i>Haemonchus contortus</i> (adulta)	TBZ – 1,0 x 10 ⁻⁵ M	9 %
	TBZ – 1,0 x 10 ⁻⁴ M	17 %
	TBZ – 5,0 x 10 ⁻⁴ M	32 %
	TBZ – 1,0 x 10 ⁻³ M	45 %

	CBZ – $1,0 \times 10^{-5}$ M	20 %
	CBZ – $1,0 \times 10^{-4}$ M	31 %
	CBZ – $5,0 \times 10^{-4}$ M	50 %
BZ-resistenta <i>Haemonchus contortus</i> (adulta)	TBZ – $1,0 \times 10^{-5}$ M	0 %
	TBZ – $1,0 \times 10^{-4}$ M	0 %
	TBZ – $5,0 \times 10^{-4}$ M	0 %
	TBZ – $1,0 \times 10^{-3}$ M	6 %
	CBZ – $1,0 \times 10^{-5}$ M	0 %
	CBZ – $1,0 \times 10^{-4}$ M	0 %
	CBZ – $5,0 \times 10^{-4}$ M	10 %
Rahman och Bryant (1977)		
<i>Moniezia expansa</i>	CBZ – $2,6 \times 10^{-3}$ M	60 %
	MBZ – $2,7 \times 10^{-3}$ M	38 %
Barrowman et al. (1984)		
<i>Ascaris suum</i> (adulta)	TBZ – $5,0 \times 10^{-7}$ M	37 %
	ABZ – $3,8 \times 10^{-7}$ M	33 %
	ABZSO – $3,6 \times 10^{-7}$ M	44 %
	MBZ – $3,4 \times 10^{-7}$ M	32 %
	FBZ – $3,3 \times 10^{-7}$ M	40 %
	OFZ – $3,2 \times 10^{-7}$ M	38 %
	Febantel – $2,2 \times 10^{-7}$ M	30 %
	- efter 24 h inkubering	58 %
Criado-Fornelio et al. (1990)		
<i>Trichinella spiralis</i> (muskelstadiumlarver)	LBZ – $1,0 \times 10^{-3}$ M	24 %
Armson et al. (1995)		
<i>Strongyloides ratti</i> (L3-larver)	TBZ – $4,6 \times 10^{-4}$ M	50 %

Malkin och Camacho (1972), Prichard (1973) och Romanowski et al. (1975) visar att även resistensstatus hos parasiten verkar ha betydelse för inhibitionsgraden; både TBZ och CBZ hade i deras studier en betydligt sämre inhiberande effekt på fumaratreduktas i BZ-resistenta isolat jämfört med BZ-känsliga (figur 8 och 9).



Figur 8. Åskådliggör skillnaden i inhiberande effekt för TBZ på fumaratreduktas i de BZ-resistenta isolaten av *Haemonchus contortus* jämfört med de BZ-känsliga i studierna Malkin och Camacho (1972), Prichard (1973) och Romanowski et al. (1975).



Figur 9. Åskådliggör skillnaden i inhiberande effekt för CBZ på fumaratreduktas i de BZ-resistenta isolaten av *Haemonchus contortus* jämfört med de BZ-känsliga i studierna Malkin och Camacho (1972), Prichard (1973) och Romanowski et al. (1975).

I studien som genomfördes av Barrowman et al. (1984) testades förutom benzimidazolerna ABZ, ABZSO, MBZ, FBZ, OFZ och TBZ också några av deras anthelmintiskt inaktiva metaboliter samt probenzimidazolen febantel. Samtliga testade benzimidazolers liksom deras metaboliter visade sig kunna inhibera fumaratreduktas. Febantel uppvisade en relativt låg grad av inhibering, 30 %. Man testade därför att förlänga inkuberingsperioden för denna substans från 0,5 h vid 37°C till 24 h vid 4°C varpå inhiberingsgraden steg till 58 %. Författarna skriver att en möjlig förklaring till detta är att febantel under denna tid förmodligen hade hunnit omvandlats från probenzimidazol till benzimidazol. Något som är särskilt intressant att notera

för resultatet i denna studie är att det inte förelåg någon skillnad mellan anthelmintiskt aktiva och anthelmintiskt inaktiva substanser; båda typerna inhiberade fumaratreduktas i ungefär lika hög grad (tabell 2). En möjlig förklaring som anges är att de inaktiva metaboliterna bildas genom värdens levermetabolism och därför kanske inte ansamlas i parasiten *in vivo*; för de inaktiva metaboliterna uppnås alltså aldrig samma förhållanden *in vivo* som de som man hade *in vitro* i denna studie.

Tabell 2. Sammanfattning av resultaten för de testade benzimidazolerna och deras metaboliter samt probenzimidazolen febantel från studien Barrowman et al. (1984). Inhibitionsgraden definieras som det antal procent som aktiviteten av fumaratreduktas minskade i närvaro av preparatet jämfört med frånvaro av preparatet

	Terapeutiskt aktiv	Preparatkoncentration µg/ml	Inhibitionsgrad %
Albendazol	Ja	0,1	33
Albendazolsulfoxid	Ja	0,1	44
Albendazolsulfon	Nej	0,1	39
Albendazol 2-amino-sulfon	Nej	0,1	43
Mebendazol	Ja	0,1	32
Hydroxymebendazol	Nej	0,1	51
Fenbendazol	Ja	0,1	40
Oxfendazol	Ja	0,1	38
Fenbendazol 2-amino-sulfoxid	Nej	0,1	39
Fenbendazol 2-amino-sulfon	Nej	0,1	40
Tiabendazol	Ja	0,1	37
Febantel	Nej	0,1	30
- efter 24 h inkubering			58

För att ta reda på om benzimidazolernas inhibering av fumaratreduktas kan kopplas till deras inhibering av mikrotubulipolymerisering testade Barrowman et al. (1984) colchicine som är ett annat ämne som också binder till tubulin och inhiberar polymeriseringen av mikrotubuli (Alberts et al., 2009). Benzimidazoler antas binda till samma bindningsställe på tubulin som colchicine (Lacey, 1988). Då det visade sig att colchicine inte inhiberade aktiviteten hos fumaratreduktas talar detta för att den effekt som uppmätts för benzimidazolerna på fumaratreduktas inte är ett resultat av att benzimidazolerna binder till tubulin och inhiberar polymeriseringen av mikrotubuli.

DISKUSSION

Benzimidazoler har i flera olika studier visat sig uppvisa en inhibitorisk effekt på fumaratreduktas. Den grad av inhibition som uppmätts har emellertid varierat kraftigt både mellan olika preparat inom samma studie och mellan samma preparat i olika studier. Att resultaten varierar för olika benzimidazoler är väntat då det trots allt rör sig om olika preparat med olika potens. Att resultatet också varierar för samma preparat mellan olika studier känns inte heller helt oväntat och kan ha flera olika förklaringar. En möjlig förklaring är att det skulle kunna bero på genetiska skillnader mellan de parasiter (dels mellan olika arter men också mellan olika isolat inom samma art) som har använts i de olika studierna. En annan möjlig förklaring är att det helt enkelt skulle kunna bero på skillnader i hur försöken utfördes. I vissa fall skiljer det sig helt vilken detektionsmetod som har använts – spektrofotometrisk metod eller radioisotopmetod. I andra fall, när samma detektionsmetod har använts, finns det, trots att utförandena i stora drag är snarlika, ändå vissa skillnader t.ex. när det gäller vilka volymer som har använts, vad man har haft för temperatur och om försöket har genomförts under aeroba eller anaeroba förhållanden. Även när författarna anger att de har använt exakt samma metod så är det i praktiken ändå inte alltid så att försöken är identiskt utförda då det är olika personer som har genomfört försöken och det är olika laboratorier och olika utrustning som har använts.

Även om den uppmätta effekten skiljer sig mellan olika studier kan man likväl konstatera att de resultat som avhandlas i detta arbete trots allt ändå pekar i samma riktning, nämligen att benzimidazoler uppvisar en inhibitorisk effekt på fumaratreduktasaktiviteten. Att det rör sig om flera olika studier gjorda av olika forskare och med olika parasiter och med mer eller mindre överensstämmande resultat får mig att tro på att det faktiskt finns en effekt *in vitro* på fumaratreduktas för åtminstone vissa benzimidazoler. Huruvida dessa benzimidazoler sedan har en effekt på fumaratreduktas även *in vivo* är en annan fråga. Jag tror att svaret på denna fråga framförallt beror på hur mycket av preparatet som *in vivo* når fram till fumaratreduktaset i parasitens inre. *In vitro* har man inte genomfört försöken på hela parasiter utan istället på framrenade mitokondrier från parasiter. I flera av försöken har dessutom mitokondrierna brutits upp till s.k. submitokondriella partiklar med hjälp av sonikering. Man har därmed kunnat vara ganska säker på att det mesta av preparatet har nått fram till fumaratreduktaset. *In vivo* däremot är det osäkert dels hur väl benzimidazolerna tar sig in i intakta mitokondrier, men också hur mycket av preparatet som kommer att ta sig hela vägen fram till mitokondrierna istället för att binda sig till mikrotubuli längs vägen.

Om man nu utgår ifrån att den effekt som uppmätts *in vitro* också uppstår *in vivo* är det intressant att fråga sig hur mycket en sådan effekt i så fall bidrar till den terapeutiska effekten vid behandling med benzimidazoler. Då fumaratreduktas är ett centralt enzym både i PEPCK-succinat-vägen och i den anaeroba elektrontransportkedjan borde en hög grad av inhibering av detta enzym få stora negativa konsekvenser för den energiproduktion som sker via dessa två vägar. Energimetabolismen skiljer sig emellertid åt både mellan olika parasitarter och mellan olika livsstadier inom samma art; medan vissa parasiter helt förlitar sig på PEPCK-succinat-vägen och den anaeroba elektrontransportkedjan för sin energimetabolism så finns det andra parasiter som inte alls använder sig av dessa vägar i sin energimetabolism eller som kan nyttja

alternativa vägar vid ett eventuellt stopp (Saz, 1981). Inhibering av fumaratreduktas behöver därför inte betyda samma sak för en parasit som för en annan. Av detta följer att man, för att besvara frågan om hur stor betydelse en inhibering av fumaratreduktas har för parasiten, därför först måste besvara frågan om hur stor betydelse PEPCCK-succinat-vägen och den anaeroba elektrontransportkedjan (och därmed också fumaratreduktas) har för just den parasitens energimetabolism. Ju större betydelsen av dessa vägar är, desto större borde också effekten av en inhibering bli. Hur mycket en störning av energimetabolismen via inhibering av fumaratreduktas sedan betyder för den totala terapeutiska effekten vid benzimidazolbehandling jämfört med den effekt som uppnås genom inhibering av mikrotubulipolymeriseringen är det däremot svårt att svara på. Något som därför vore intressant att titta vidare på är om benzimidazolerna har en bättre terapeutisk effekt på de parasiter som har en fumaratreduktasberoende energimetabolism jämfört med de parasiter som saknar eller som inte är så beroende av fumaratreduktas.

En annan intressant fråga är huruvida benzimidazolerna har en direkt inhiberande effekt på fumaratreduktaset eller om den inhiberande effekten istället uppstår sekundärt som ett resultat av att benzimidazolerna inhiberar polymeriseringen av mikrotubuli. Lacey (1988) hävdar att samtliga effekter som man har kunnat notera för benzimidazoler, t.ex. en inhibering av glukosupptaget och en minskad fumaratreduktasaktivitet, kan spåras tillbaka till benzimidazolernas inhibering av mikrotubulipolymeriseringen, d.v.s. att dessa effekter alltså uppstår sekundärt som en följd av effekten på mikrotubuli. Enligt Lacey är mikrotubuli involverat, antingen på ett direkt eller indirekt sätt, i nästan allt som sker på cellnivå och en inhibering av uppbyggnaden av mikrotubuli leder därmed till vad han beskriver som "*a cascade of direct and indirect biochemical/physiological changes resulting in the loss of cellular homeostasis*" (fritt översatt: en kaskad av direkta och indirekta biokemiska/fysiologiska förändringar som resulterar i en förlorad cellhomeostas). Utifrån det jag har kunnat läsa under detta arbete så har det funnits saker som har talat både för och emot Laceys teori.

Något som talar emot Laceys teori är sättet som försöken har utförts på i de olika studierna. Om effekten på fumaratreduktas endast hade testats på hela, intakta celler från parasiten så hade jag accepterat Laceys teori utan att tveka. Jag finner det däremot svårt att se hur en inhibering av polymeriseringen av mikrotubuli skulle kunna ligga bakom den påverkan på aktiviteten av fumaratreduktas som man har uppmätt i sådana försök där inte hela celler utan istället submitokondriella partiklar har använts och där man dessutom har tillsatt både NADH och fumarat. I vilka processer skulle mikrotubuli under dessa förhållanden behövas för att upprätthålla aktiviteten av fumaratreduktas? Det är möjligt att mikrotubuli antingen direkt eller indirekt är av betydelse för aktiviteten av fumaratreduktas även under dessa förhållanden men inget av det som jag hittills har läst har tagit upp en sådan funktion. Ytterligare en sak som talar emot Laceys teori är att man i ett av försöken även testade colchicine, ett ämne som antas binda till samma ställe på tubulin som benzimidazolerna och som också utövar en inhiberande effekt på mikrotubulipolymeriseringen, utan att se någon som helst effekt på fumaratreduktas (Barrowman et al., 1984). Om effekten på fumaratreduktas hade varit sekundär till effekten på mikrotubuli så borde man ju då rimligtvis ha kunnat se en påverkan på fumaratreduktas även när colchicine användes.

Något som däremot skulle kunna tala för Lacey's teori är att man i flera försök har kunnat se en stor skillnad i inhiberande effekt för benzimidazoler på fumaratreduktas i BZ-resistenta isolat jämfört med BZ-känsliga. De enda mutationer som man hittills, till min vetskap, har hittat som förmedlar resistens mot benzimidazoler har varit i genen för β -tubulin (Gilleard, 2006; Beech et al., 2011). Jag utgår därför ifrån att BZ-resistensen även i dessa fall var knuten till mutationer i β -tubulin. Om det är så att Lacey's uppfattning är riktig, d.v.s. att effekten på fumaratreduktas uppstår som ett resultat av inhiberingen av mikrotubulipolymeriseringen, så skulle ju skillnaden som setts mellan resistent och känsliga isolat lätt kunna förklaras: i de resistent parasiterna förhindrar då mutationen i β -tubulin benzimidazolerna från att binda in till tubulinet och de kan därmed inte inhibera polymeriseringen av mikrotubuli varför också effekten på fumaratreduktas, som en konsekvens av detta, blir lägre för de resistent parasiterna. Om det istället är så att benzimidazolerna utövar en direkt effekt på fumaratreduktas går inte skillnaden mellan resistent och känsliga isolat att förklara med mutationen i β -tubulin utan det måste i så fall ha skett ytterligare en mutation i de resistent isolaten som gör fumaratreduktas mindre känsligt för påverkan från benzimidazoler. Att det i en och samma parasit skulle ha skett både en mutation i tubulingenen och en mutation i genen för fumaratreduktas och att detta dessutom skulle ha upprepat sig i alla de tre olika isolaten som användes i dessa försök är mindre troligt och talar därför för att effekten på fumaratreduktas skulle vara en sekundär effekt som uppstår till följd av inhiberingen av mikrotubulipolymeriseringen.

För att försöka avrunda arbetet ställer jag mig återigen frågan: *har benzimidazolerna, utöver mikrotubuli, också fumaratreduktas som en ytterligare potentiell verkningsplats?* Utifrån det jag har läst under detta arbete verkar det som om benzimidazolerna utövar en effekt på fumaratreduktas åtminstone *in vitro*. Däremot verkar det inte som om jag, bara utifrån den information som jag har lyckats leta upp till detta arbete, verkar kunna komma fram till om det rör sig om en direkt eller sekundär effekt och om effekten också uppstår *in vivo*. För att fullt ut besvara frågan skulle mer forskning behövas.

REFERENSER

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2009). *Essential Cell Biology*. 3. uppl. NY. Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Armson, A., Grubb, W. B. & Mendis, A. H. W. (1995). The effect of electron transport (ET) inhibitors and thiabendazole on the fumarate reductase (FR) and succinate dehydrogenase (SDH) of *Strongyloides ratti* infective (L3) larvae. *International Journal for Parasitology*, 25, 261-263.
- Barrowman, M. M., Marriner, S. E. & Bogan, J. A. (1984). The fumarate reductase system as a site of anthelmintic attack in *Ascaris suum*. *Bioscience Reports*, 4, 879-883.
- Beech, R. N., Skuce, P., Bartley, D. J., Martin, R. J., Prichard, R. K. & Gilleard, J. S. (2011). Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility?. *Parasitology*, 138, 160-174.
- Criado-Fornelio, A., de Armas-Serra, C., Jimenez-Gonzalez, A., Casado-Escribano, N. & Rodriguez-Cabeiro, F. (1990). Biochemical effects of luxabendazole on *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 76, 518-520.
- Gilleard, J. S. (2006). Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *International Journal for Parasitology*, 36, 1227-1239
- Kita, K., Hirawake, H., Miyadera, H., Amino, H. & Takeo, S. (2002). Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553, 123-139.
- Lacey, E. (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, 18, 885-936.
- Malkin, M. F. & Camacho, R. M. (1972). The effects of thiabendazole on fumarate reductase from thiabendazole-sensitive and resistant *Haemonchus contortus*. *The Journal of Parasitology*, 58, 845-846.
- Prichard, R. K. (1973). The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, 3, 409-417.
- Rahman, M. S. & Bryant, C. (1977). Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: effects of cambendazole and mebendazole. *International Journal for Parasitology*, 7, 403-409.
- Romanowski, R. D., Rhoads, M. L., Colglazier, M. L. & Kates, K. C. (1975). Effect of cambendazole, thiabendazole, and levamisole on fumarate reductase in cambendazole-resistant and -sensitive strains of *Haemonchus contortus*. *The Journal of Parasitology*, 61, 777-778.
- Saz, H. J. (1981). Energy metabolisms of parasitic helminths: adaptations to parasitism. *Annual Review of Physiology*, 43, 323-341.