



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

P-glykoproteins betydelse vid metabolism och resistensutveckling mot makrocycliska laktoner

Caroline Linderholt

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 05

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

P-glykoproteins betydelse vid metabolism och resistensutveckling mot makrocycliska laktoner

The significance of P-glycoprotein in metabolism and resistance development to macrocyclic lactones

Caroline Linderholt

Handledare:

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

Examinator:

Eva Tydén, 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: 2013

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 05
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

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

Nyckelord: P-glykoprotein, nematoder, makrocycliska laktoner, resistens, ivermektin

Key words: P-glycoprotein, nematodes, macrocyclic lactones, resistance, ivermectin

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	2
Summary	3
Inledning.....	4
Material och metoder	4
Litteraturoversikt.....	4
Makrocycliska laktoner.....	4
Distribuering av makrocycliska laktoner	5
P-glykoprotein hos däggdjur	6
P-glykoprotein hos nematoden.....	7
P-glykoprotein modulerande substanser	8
P-glykoproteins betydelse vid resistensutveckling	8
Diskussion	9
Slutsats	11
Referenslista	11

SAMMANFATTNING

Parasiter i magtarmkanalen och framför allt nematoder, orsakar världsomfattande produktionsförluster hos lantbrukets djur. För att kontrollera nematodinfektioner används anthelmintika. En överanvändning av anthelmintika har resulterat i att vissa nematoder utvecklat resistens. Därför är det väsentligt att vi tillämpar en sund användning av anthelmintika som inte gynnar vidare resistans utveckling. Makrocycliska laktoner är den substansgrupp som används flitigast. Hur nematoderna har utvecklat resistens är ännu inte helt klarlagt men det spekuleras kring att P-glykoprotein är en viktig orsak. P-glykoprotein är en typ av transportörer i cellmembran tillhörande gruppen ABC-transportörer inom subfamilj B. P-glykoprotein består av två homologa kassetter som har vardera sex transmembrana delar med vardera intracellulärt ATP bindande peptider. P-glykoprotein fungera som en efflux pump och transporterar kroppsfrämmande ämnen ut ur cellerna hos både däggdjur och nematoder.

I detta kandidatarbete undersöks den naturliga funktionen av P-glykoprotein och dess interaktion med avmaskningsmedel (anthelmintika). Även effekten av P-glykoprotein modulerande substanser avhandlas. Genom att jämföra olika studier har jag kommit fram till att P-glykoprotein är en viktig orsak till resistensutveckling mot makrocycliska laktoner. Det kan konstateras att mer forskning krävs för att kunna fastställa P-glykoproteins exakta betydelse vid resistens utveckling mot makrocycliska laktoner.

SUMMARY

Gastrointestinal parasites, and in particular nematodes, cause worldwide production losses in grazing livestock. In order to control nematode infections anthelmintics are frequently used. An extensive use of anthelmintics has resulted in the selection of resistant nematodes. Therefore it is of importance that we use anthelmintics responsibly in order to avoid further resistance development. Macrocyclic lactones are the anthelmintic that are used most frequently today. How nematodes develop resistance is not fully confirmed. There are speculations about which factors that contribute to the development of resistance, such as P-glycoprotein. P-glycoprotein is a cell membrane transporter belonging to the ABC transporter subfamily B. P-glycoprotein consists of two homological cassettes, with six trans membrane units each, and an intracellular ATP binding peptide. P-glycoprotein functions as an efflux pump that transports substances out of mammalian and nematode cells.

In this thesis, I have investigated the basic function of P-glycoprotein and its interaction with anthelmintics. The effect of P-glycoprotein modulating substances is also discussed. By comparing results from different publications, I have found that P-glycoprotein is involved in the development of resistance against macrocyclic lactones by functioning as an efflux pump. However more research is required in order to confirm the exact roll of P-glycoprotein in nematodes that develop resistance against macrocyclic lactones.

INLEDNING

Infektioner med olika parasitiska maskar (helminter) är en av de främsta anledningarna till världsomfattande produktionsförlust hos våra produktionsdjur (Alvarez et al., 2007). Genom en sund användning av anthelmintika kan vi åtgärda problemet. Den vanligaste anthelmintika gruppen på marknaden idag är makrocycliska laktoner som introducerades i början av 1980-talet (Lifschitz et al., 2010b) och som sedan dess har använts flitigt. Till följd av en ökad användning av makrocycliska laktoner har flera nematoder utvecklat resistens. Det är i dagsläget inte fullständigt utrett hur denna resistens uppstått men det finns tecken som tyder på att P-glykoproteins (P-gp) har betydelse vid resistensutveckling (Kerboeuf & Guégnard, 2011). En ökad resistens mot vår vanligaste anthelmintika är ett betydande problem världen över och därför centreras det här litteraturarbetet kring vilken betydelse P-gp kan ha för resistensutvecklingen mot makrocycliska laktoner. Fokus ligger på ivermektin då det är den mest använda substansen inom anthelmintikagruppen makrocycliska laktoner (Lifschitz et al., 2010b).

I det här arbetet har jag tittat närmare på och därigenom ökat min förståelse för vad P-gp är. Viktiga frågor är vilken betydelse P-gp har för nematoden och vad P-gp har för betydelse vid resistensutveckling.

MATERIAL OCH METODER

Med hjälp av tips och idéer från mina handledare kom jag fram till ämnesområdet för mitt arbete. De gav mig en artikel av Lloberas et al (2013) som jag senare använde för att välja ut mina sökord. Jag läste även i av Fass vet. 2013 för att få idéer till flera sökord.

I min sökning efter vetenskapliga artiklar använde jag mig främst av databaserna PubMed, Web of Knowledge samt Google Scholar. Vid användningen av dessa databaser använde jag mig av sökorden macrocyclic lactones, nematode, P-gp, P-glycoprotein, ivermectin och anthelmintic resistance. Sedan gav även de använda artiklarnas referenslistor relevanta källor till flera artiklar och då även författare som forskat mycket inom ämnet. Avgränsningar jag använde mig av var bl.a. språk och veterinärmedicin.

LITTERATURÖVERSIKT

Makrocycliska laktoner

Makrocycliska laktoner är så kallade endektocider. Detta innebär att de är verksamma mot såväl ektoparasiter som endoparasiter. Makrocycliska laktoner är stora, lipofila substanser (Lifschitz et al., 2010a), som fördelas i kroppen via blod- och lymfcirkulationen (Lifschitz et al., 2000). Genom sin höga affinitet för vävnader såsom lungor, lever och tarm (Lifschitz et al., 2010a), och därmed en bred distribution (Lifschitz et al., 2000), finns anthelmintikan i höga koncentrationer på de vanligaste predilektionsställena för många helminter (Lifschitz et al., 2010a). Detta är en fördel då substansens effekt avgörs av den koncentration som uppnås under en viss tid i målvävnaden där parasiten befinner (Lifschitz et al., 2000). Makrocycliska laktoner utövar sin anthelmintiska effekt huvudsakligen genom att binda till

glutamatreglerade kloridkanaler vilket ökar permeabiliteten för kloridjoner (Demeler et al., 2013). Influxen av kloridjoner via glutamatreglerade kloridkanalerna i cellmembranet leder vidare till en hyperpolarisering av neuromuskulära celler. Kloridjonerna sänker den normala membranpotentialen från -70mV vilket förhindrar förmedlingen av nervimpulsen hos parasiten (fig. 2). Då membranpotentialen är sänkt kommer en aktionspotential som går igenom neuronet inte ha tillräckligt kraftig depolarisering för att nå sin normala höga spänningshöjning, ca $+40\text{mV}$. Utebliven spänningshöjning medför att spänningsreglerade kanaler förblir opåverkade. Därmed fortlöper inte aktionspotentialen varvid nervimpulsen upphör och responsen i muskelceller stoppas (fig. 1). Detta ger bland annat paralytisk av nematodens svalg muskulatur vilket förhindrar parasitens födointag (Xu et al., 1998; Ardelli & Prichard, 2013; Alvarez et al., 2007). Hyperpolariseringen hämmar även nematodens motilitet (Ardelli & Prichard, 2013; Alvarez et al., 2007).

Makrocycliska laktoner binder även till GABA-receptorn i parasiternas nervsystem (Demeler et al., 2013). Hos däggdjur, som saknar glutamatreglerade kloridkanaler, kan makrocycliska laktoner endast påverka GABA receptorer (Prichard & Roulet, 2013). Eftersom däggdjurens GABA-receptorer bara finns i neuron som är skyddade av blodhjärnbarriären saknar makrocycliska laktoner effekt hos de flesta däggdjur och de är därmed säkra att använda.

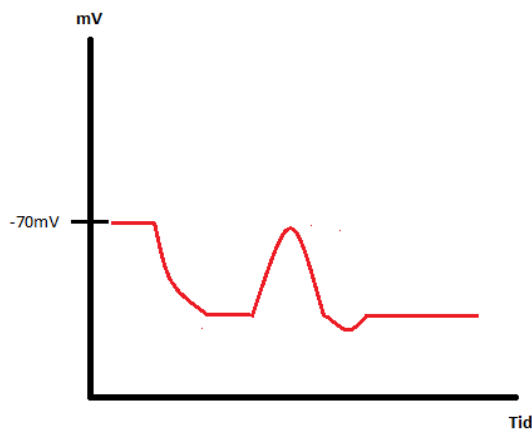


Fig.1 membranpotentialen hyperpolariseras på grund av kloridjons influx och muskelrespons uteblir

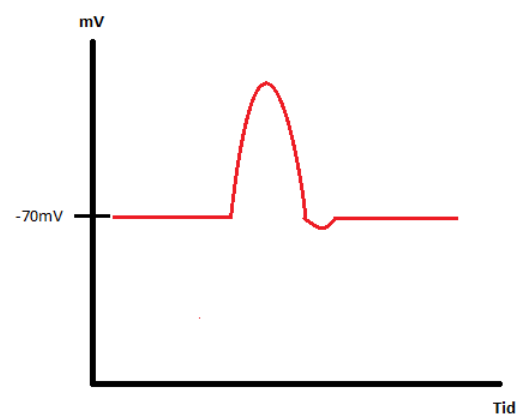


Fig.2 opåverkad membranpotential ger en normal nervimpuls och muskelrespons.

Distribuering av makrocycliska laktoner

Administreringssättet har stor påverkan på vilken effekt anthelmintika har på parasiten. Vid subkutan administrering uppnås till exempel höga plasmakoncentrationer medan betydligt lägre koncentrationer nås ute i vävnaderna (Lloberas et al., 2012). Motsvarande mönster ses vid oral och intraruminal administrering, då koncentrationerna i magtarmkanalen i allmänhet är högre än plasmanivåerna (Lloberas et al., 2012). Detta medför att makrocycliska laktoner har sämre eller utebliven effekt vid subkutan administrering jämfört med samma dos vid oral administrering. Detta beror på att olika nematoder är olika känsliga anthelmintika, desto högre koncentration av anthelmintika ju färre nematoder som uppvisar resistens, med det menas att om koncentrationen inte är tillräckligt hög kommer färre maskar att avdödas. Det är klarlagt att

effekten av makrocycliska laktoner beror på substansens affinitet för glutamatreglerade kloridjonskanaler och dess koncentration i vävnaden (Alvarez et al., 2007). Forskning har visat att koncentrationerna av makrocycliska laktoner i tarmen under de första två till tre behandlingsdagarna har stor betydelse för anthelmintikans effekt mot nematoder (Lloberas et al., 2012).

Det finns två sätt för anthelmintika att ta sig in i nematoden och därmed utöva effekt, dels transkutikulärt, över huden, dels oralt. Transkutikulärt anses vara den mest betydande vägen för makrocycliska laktoner (Alvarez et al., 2007). Eftersom makrocycliska laktoner förhindrar nematodens födointag genom att paralysera svalg muskulaturen leder detta till att det orala intaget upphör och den passiva transkutikulära transporten blir då ännu viktigare (Alvarez et al., 2007). Nematodens kutikula är till för att skydda masken från omgivningen och att förhindra större molekyler från att ta sig in i dess kroppshåla. Kutikulan främjar därigenom den osmotiska regleringen, men ger även strukturellt stöd och verkar skyddande mot värdjurets immunsystem. Kutikulan hos flertalet nematoder är veckad vilket gör att upptaget av anthelmintikan underlättas. Transport genom kutikulan kan ske på två sätt, antingen aktivt genom en energikrävande process eller passivt genom diffusion (Alvarez et al., 2007).

P-glykoprotein hos däggdjur

P-gp är en typ av transportörer i cellmembran tillhörande gruppen ABC-transportörer inom subfamilj B (Ardelli & Prichard, 2013; Demeler et al., 2013). P-gp består av två homologa kassetter som vardera har sex transmembrana delar med intracellulärt ATP bindande peptider (fig. 3) (Lin, 2003). P-gp identifierades först hos däggdjur i mitten av 1970 talet (Juliano & Ling, 1976). När ABC transportörer binder till ATP utförs en energikrävande uttransport av främmande ämnen på cellnivå (Demeler et al., 2013; Lespine et al., 2007). Ett annat namn för dessa transportörer är ”Multi Drug Resistant” (MDR) transportörer eftersom läkemedel många gånger är substrat för dessa transportproteiner. P-gp fungerar som en skyddande membrantransportör genom att pumpa ut kroppsfrämmande xenobiotika ur cellen. Detta innebär att P-gp har en betydande roll vid utveckling av resistens mot olika typer av läkemedel (Demeler et al., 2013) som till exempel mot tumörläkemedel och leder till att behandlingen misslyckas (Kerboeuf & Guégnard, 2011; Ardelli & Prichard, 2013).

Även om P-gp bara är en bland flera ABC-transportörer är det en mycket viktig grupp som makrocycliska laktoner är substrat för. När jag i fortsättningen pratar om xenobiotika syftar jag på de som är substrat för P-gp. Eftersom P-gp fungerar som en effluxpump har de en extra betydelse för omsättning av olika läkemedel, vilket i sin tur kan påverka farmakokinetiken, det vill säga hur läkemedel fördelas och tas upp i kroppen. I vilka vävnader läkemedlet ansamlas har naturligtvis stor betydelse för läkemedelsmetabolismen (Lifschitz et al., 2010a). Det är viktigt att P-gp har en fullgod funktion för att kroppen ska kunna eliminera olika P-gp substrat i kroppen och kunna hålla nere de intracellulära halterna av läkemedel (Ardelli & Prichard, 2013). Det finns höga koncentrationer av P-gp bland annat i värdjurets tarmepitel och gallgångar, vilket leder till höga eliminationshalter av läkemedel framförallt i magtarmkanalen (Lespine et al., 2007).

Makrocycliska laktoner är substrat för P-gp hos däggdjur (Xu et al., 1998). Hos däggdjur sitter P-gp i blod-hjärnbarriären som ett skydd för CNS och som transporterar tillbaka olika ämnen till blodet. Makrocycliska laktoner kan alltså inte passera blod-hjärnbarriären hos däggdjur vilket gör att de är säkra att använda hos dessa (Xu et al., 1998). Ett undantag är collieraser som är överkänsliga mot makrocycliska laktoner. Detta beror på att collieraser har en mutation i P-gp sekvensen som kodar för proteinet vilket leder till att makrocycliska laktoner kan ta sig över blodhjärnbarriären och binda GABA receptorerna och ge biverkningar i CNS hos dessa raser (Kerboeuf & Guégnard, 2011).

Makrocycliska laktoner verkar hämmande på P-gp efflux pumparna hos däggdjur vilket i sin tur leder till en ackumulering av verksamt substans i olika vävnader. Samtidigt är effekten av makrocycliska laktoner den motsatta på P-gp hos nematoder, det vill säga stimulerande. Det enda undantaget är ivermektin som har en hämmande effekt både hos nematoder och däggdjur (Kerboeuf & Guégnard, 2011)

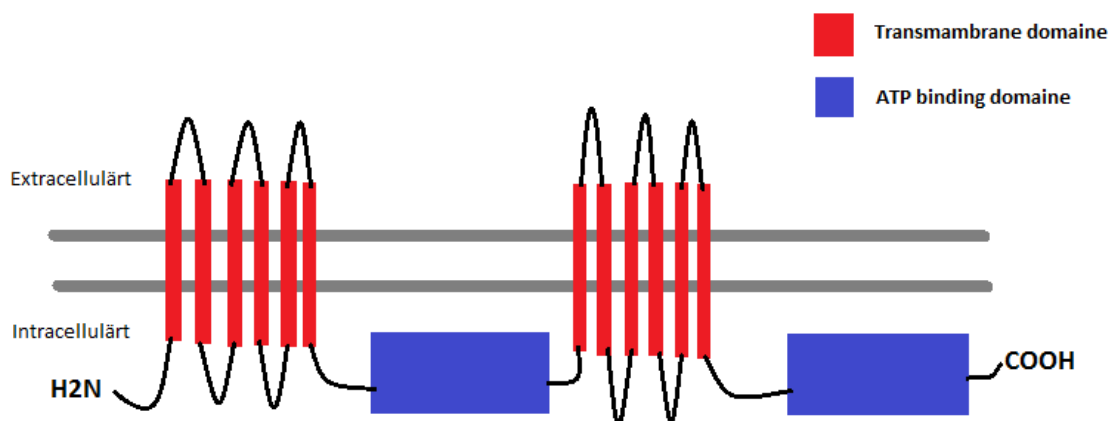


Fig. 3 En P-gp molekyll hos däggdjur

P-glykoprotein hos nematoden

Det har inte utförts så mycket forskning på P-gp hos nematoder, men man har kommit fram till att P-gp har en betydande roll för nematodens utveckling av resistens mot anthelmintika (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Hos nematoden fungerar P-gp som hos värddjuret som en effluxpump (Xu et al., 1998; Lifschitz et al., 2010a). Vid studier av P-gp på aminosyranivå har man fastställt likheter med P-gp hos däggdjur och nematoder vid bindningsytan (Xu et al., 1998), men förövrigt finns få likheter (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Det är känt att makrocycliska laktoner är substrat för P-gp hos nematoder och att de stimulerar vissa P-gp isotyper (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Detta är till skillnad från den hämmande effekt som de har på P-gp hos däggdjur. Stimuleringen kan vara i form av ett ökat antal aktiverade P-gp transportörer som rekryterats till nematodens cellmembran antingen på grund av en uppreglering av P-gp genuttrycket, eller genom att befintliga P-gp transportörer i

cellmembranet plötsligt får en förhöjd effektivitet (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Kerboeuf & Guégnard (2011) har utfört studier som indikerar att befintliga P-gp stimuleras vid avmaskning med ivermektin så fort som endast några minuter efter administrering av läkemedlet. Eftersom proverna togs strax efter exponering medför detta att P-gp transportörerna inte kan ha hunnit att rekryterats, utan man tolkar det som om redan befintliga transportörer stimulerades till ökad effekt (Kerboeuf & Guégnard, 2011).

P-glykoprotein modulerande substanser

Forskning har visat på att det finns ett samband mellan P-gp aktivitet hos nematoder och effekten av anthelmintika (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Man känner också till att det finns vissa substanser som kan hämma P-gp aktiviteten *in vivo* hos både däggdjur och nematoder (Lifschitz et al., 2010a; Xu et al., 1998; Lifschitz et al., 2010b). Dessa preparat kallas gemensamt för P-gp modulerande substanser. En teori är att det med hjälp P-gp modulerande substanser skulle vara möjligt att höja den farmakologiska effekten av makrocycliska laktoner *in vivo* eftersom nematodens intracellulära koncentration av anthelmintika ökar. (Xu et al., 1998; Lifschitz et al., 2010a). På så sätt kan även nematoder som uppvisar resistans avdödas. Genom att samtidigt behandla med en P-gp modulerande substans och makrocycliska laktoner kan alltså den systemiska biotillgängligheten av anthelmintika stimuleras att öka (Kerboeuf & Guégnard, 2011; Lloberas et al., 2012). Verapamil är ett bland flera exempel på P-gp hämmare av däggdjursceller (Lifschitz et al., 2010a; Xu et al., 1998). När P-gp modulerande substanser ges i samband med substanser som är substrat för P-gp, som till exempel makrocycliska laktoner, måste man tänka på att P-gp aktiviteten även hämmas hos värdjuret, vilket i sin tur kan påverka skyddet mot läkemedel i blodhjärnbarriären (Lin, 2003). Detta leder till att det vid höga koncentrationer kan ske en excitering via GABA-receptorn i neuronerna hos behandlade däggdjur (Lin, 2003).

P-glykoproteins betydelse vid resistensutveckling

Eftersom man har sett en påverkan på P-gp vid behandling med makrocycliska laktoner så kan man med säkerhet säga att glutamatreglerade kloridkanaler inte är enda orsaken till resistensutveckling hos nematoder (Ardelli & Prichard, 2013). Den senaste teorin är att P-gp och andra ABC transportörer spelar en stor, om än ospecifik, roll vid utveckling av resistens mot anthelmintika hos nematoder (Demeler et al., 2013). Eftersom makrocycliska laktoner även är substrat för P-gp kan man anta att P-gp har en extra stor roll för kinetiken av dessa avmaskningsmedel inne i masken (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Man anser därför att en förklaring till resistensutveckling hos nematoder mot makrocycliska laktoner är kopplat till ett förstärkt P-gp medierat efflux system (Xu et al., 1998; Alvarez et al., 2007). Studier har även visat att då P-gp inaktiveras blir nematoden känsligare för makrocycliska laktoner och paralyseringen går fortare vilket är en indikation på att P-gp har en viss betydelse vid resistensutveckling (Ardelli & Prichard, 2013).

Vid studier av nematoder som utvecklade resistens mot makrocycliska laktoner har man även observerat att det sker en uppreglering av genuttrycket för vissa P-gp isotyper (Xu et al., 1998; Prichard & Roulet, 2013; Ardelli & Prichard, 2013). Man har även kunnat observera att

olika preparat dvs. typer av makrocycliska laktoner ger i olika utsträckning upphov till olika modifieringar (Ardelli & Prichard, 2013). Detta beror sannolikt på att olika substansgrupper av makrocycliska laktoner uppvisar olikheter i sin kemiska struktur.

Studier har visat att P-gp modulerande substanser, exempelvis verapamil, har effekt på resistentia nematoder men avsaknad av effekt hos icke resistentia nematoder, sannolikt beroende på att resistentia nematoder har ett överuttryck av P-gp (Lifschitz et al., 2010a; Lifschitz et al., 2010b). Överuttrycket av P-gp är en följd av en förändring i P-gp genuttrycket på predilektionsstället (Xu et al., 1998; Prichard & Roulet, 2013) vilket ger en resistensmekanism likt den hos däggdjurens blodhjärnbarriär (Xu et al., 1998). Denna typ av resistens anses även kunna ge upphov till korsresistens med benzimidazolier som också är ett P-gp substrat (Prichard & Roulet, 2013).

DISKUSSION

P-gp är en ABC transportör som finns i cellmembranet hos nematoder och däggdjur. Transportören består av två identiska kassetter med vardera en ATP bindande domän och som utför en energiberoende uttransport av ämnen över cellmembranet (Ardelli & Prichard, 2013; Demeler et al., 2013; Lin, 2003). P-gp transportörer påverkas av flera substrat och fungerar som en effluxpump som ospecifict binder olika hydrofoba ämnen, däribland läkemedel och dess metaboliter, och som med hjälp av dessa transporteras ut över cellmembranet (Ardelli & Prichard, 2013; Lifschitz et al., 2010a).

Hos däggdjuren har man konstaterat att P-gp utgör ett viktigt skydd mot olika toxiska substanser i kroppen. Liknande forskning har ännu inte gjorts på nematoder, eller andra parasiter, vilket gör att det saknas kunskap om vilken funktion P-gp har utöver att vara en viktig komponent vid resistensutveckling mot makrocycliska laktoner. Eftersom såväl makrocycliska laktoner (Demeler et al., 2013) som verapamil (Lifschitz et al., 2010a; Xu et al., 1998) fungerar som substrat för P-gp både hos däggdjur och hos nematoder är det troligt att P-gps ursprungliga funktion hos nematoden är lik den hos däggdjur, där P-gp medverkar i skyddet mot en rad toxiska substanser som de kan utsättas för. För att kunna förstå hur P-gp fungerar under normala förhållanden hos nematoden krävs mer forskning. Självklart skulle det vara till fördel för resistensforskning om man kunde ta reda på den mer exakta funktionen hos P-gp även under normala förhållanden hos isolat som är mottagliga för läkemedel. Forskningen tyder på att man kan dra paralleller från den kunskap som finns om P-gp hos däggdjur till nematoder. Likväl är det intressant med mer forskning om interaktioner mellan P-gp och makrocycliska laktoner hos nematoder.

Det är känt att både specifika och ospecifika mekanismer ingår vid resistensutvecklingen mot makrocycliska laktoner hos nematoder (Demeler et al., 2013). Ett exempel på en specifik mekanism är en mutation i bindningsstället till glutamatreglerade kloridkanalen. Det har diskuterats huruvida de glutamatreglerade kloridkanalerna har betydelse vid resistensutveckling, men då det fortfarande endast finns ett fåtal studier som styrker detta förefaller det osannolikt att de spelar en mer betydande roll (Demeler et al., 2013). Ett

exempel på en ospecifik mekanism är ABC-transportörer, med fokus på P-gp. I dagsläget har man ur forskningssynpunkt inte klarlagt exakt vilken betydelse P-gp har för resistensutvecklingen mot makrocycliska laktoner hos nematoder. Dock är det konstaterat att det finns tydliga tecken på att P-gp har betydelse för nematodernas resistensutveckling då samtidig behandling med verapamil visade effekt på resistent nematoder men inte på icke-resistent (Lifschitz et al., 2010b; Lifschitz et al., 2010a). Det finns tecken som tyder på att det sker en uppreglering av P-gp hos resistent maskar, vilket leder till minskande koncentration av makrocycliska laktoner i nematoden varvid effekten av anthelmintikan uteblir. Det faktum att det sker förändringar i genuttrycket för P-gp har identifierats vid behandling med makrocycliska laktoner (Xu et al., 1998; Prichard & Roulet, 2013; Ardelli & Prichard, 2013), vilket är ytterligare ett tecken på betydelsen av P-gp vid resistens utveckling. Mer forskning krävs för att identifiera resistensmarkörer, som skulle vara till hjälp vid övervakningen av resistensläget (Demeler et al., 2013) och vid tillämpning av riktad behandling och för att undvika selektion för resistent maskar genom felaktig behandling. Resistens bestämning sker i dagsläget fortfarande i huvudsak genom att mäta parasitens äggutskiljning, vilket kan vara missvisande (Xu et al., 1998).

En metod som åtminstone teoretiskt sett skulle kunna vara en möjlighet vid behandling av resistent nematoder är samtidig behandling med makrocycliska laktoner och ett P-gp modulerande medel. Tanken är att den P-gp modulerande substansen hämmar effluxmekanismen och nematoden kan på så sätt inte pumpa ut anthelmintikan. Den stora nackdelen är att även däggdjurens P-gp i blodhjärnbarriären kan hämmas varvid anthelmintika kan nå GABA receptorerna hos värddjuret och orsaka toxiska biverkningar i CNS. Detta skulle innebära att säkerheten vid användningen av makrocycliska laktoner hos däggdjuren skulle minska och de skulle kunna gå samma öde till mötes som de mottagliga nematoderna. Detta skulle kunna bidra till att makrocycliska laktoner blir ett avsevärt mindre attraktivt preparat vid avmaskning.

En annan metod för att avdöda resistent parasiter är att använda olika substansgrupper av anthelmintika. Då måste man dock ha i åtanke att resistens mot makrocycliska laktoner även kan ge korsresistens mot exempelvis bensimidazoler (Prichard & Roulet, 2013), det kan även fungera att ge en högre dos. Men även om dessa alternativa metoder finns är det viktigt att se till att resistens inte uppstår. Detta kan man göra genom att inte bara avmaska slentrianmässigt utan istället behövspröva alla avmaskningar. Vid träckprov får man dessutom reda på vilken parasit djuret är infekterad av och man kan rikta avmaskningen till specifika parasiter.

Trots att många studier har gjorts och därigenom möjliggjort flertalet antagningar krävs vidare forskning för att kunna avgöra exakt hur betydande roll P-gp har vid resistensutveckling eftersom mycket fortfarande är oklart i dagsläget. Fortsatt forskning om P-gp är viktigt eftersom det kan leda till en förlängd användningstid på våra makrocycliska laktoner såsom ivermektin som är ett av dagens viktigaste (Alvarez et al., 2007) och mest använda anthelmintika på våra lantbruksdjur (Lifschitz et al., 2010b).

SLUTSATS

I dagsläget saknas forskning som entydigt säkerhetsställer P-gps betydelse vid resistensutveckling mot makrocycliska laktoner hos nematoder. Något som alla forskare verkar överens om är att P-gp har en viss betydelse, men mer forskning krävs för att kunna fastställa den exakta mekanismen som orsakar resistens

REFERENSLISTA

- Alvarez, L., Mottier, L., & Lanusse, C. (2007). Drug transfer into target helminth parasites. *TRENDS in parasitology*, vol.23 no.3, 97-114.
- Ardelli, B.F. & Prichard, R.K. (2013). Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 191, 264-275.
- Demeler, J., Krücken, J., AlGusbi, S., Ramünke, S., De Graef, J., Kerboeuf, D., Geldhof, P., E. Pomroy, W. & von Samson-Himmelstjerna, G. (2013). Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, (under tryckning)
- Juliano, R. I. & Ling, V. (1997). A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica Acta* 455, 152-162
- Kerboeuf, D. & Guégnard, F. (2011). Anthelmintics Are Substrates and Activators of Nematode P Glycoprotein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, may 2011, 2224-2232.
- Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orłowski, S. & Alvinerie, M. (2007). Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure–affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical sciences*, 30, 84-94.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M. & Lanusse, C. (2000). Comparative distribution of ivermectin and doramectin to tissues of parasite location in cattle. *Veterinary Parasitology*, 87, 327-338
- Lifschitz, A., Suarez, V.H., Sallovitz, J., Cristel, S.L., Imperiale, F., Ahoussou, S., Schiavi, C. & Lanusse, C. (2010a). Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: Comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. *Experimental Parasitology*, 125, 172-178.
- Lifschitz, A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., Virkel, G., Borda, B. & Lanusse, C. (2010b). Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, 172, 291-298.
- Lin, J.H. (2003). Drug–drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 53-81.
- Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Lanusse, C. & Lifschitz, A. (2012). Measurement of ivermectin concentrations in target worms and host gastrointestinal tissues: influence of the route of administration on the activity against resistant *Haemonchus Contortus* in lambs. *Experimental Parasitology*, 131, 304-309.
- Lloberas, M., Alvarez L., Entrocasso, C., Virkel, G., Ballent, M., Mate, L., Lanusse, C. & Lifschitz, A. (2013). Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: impact of drug treatments on parasite P-

glycoprotein expression. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, 20-27.

Prichard, R.K. & Roulet, A. (2007). ABC transporters and b-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, 134, 1123-1132.

Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R. & Prichard, R. (1998). Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alternation of P-glycoprotein homolog. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91, 327-335.