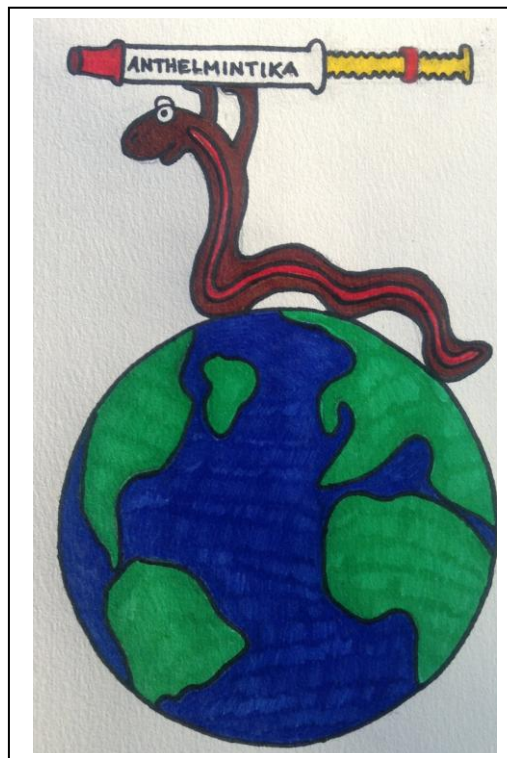


Cytokrom P450-systemets betydelse för anthelmintikaresistens

Ylva Lagervall



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 82

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Cytokrom P450-systemets betydelse för anthelmintikaresistens

The Cytochrome P450 system's significance in anthelmintic resistance

Ylva Lagervall

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: Ylva Lagervall

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 82
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

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

Nyckelord: anthelmintika; resistens; cytokrom; P450; CYP; helminter; inhibering

Key words: anthelmintics; resistance; cytochrome; P450; CYP; helminths; inhibition

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	4
Litteraturoversikt.....	4
Helminter.....	4
Nematoder	4
Trematoder	5
Cestoder.....	5
Anthelmintika och dess verkningsmekanismer.....	5
Bensimidazoler (BZ)	5
Makrocycliska laktoner (ML)	6
Tetrahydropyrimidiner	6
Kinolderivat.....	6
Farmakologisk effekt – upptag hos helminter.....	6
Resistensmekanismer	7
Xenobiotikametabolism hos värdjur och parasiter.....	7
Xenobiotikametabolismens olika faser	7
CYP-systemet.....	8
CYP hos helminter – vara eller inte vara	9
Inhibering av CYP-systemet	10
Diskussion	12
Litteraturförteckning	14

SAMMANFATTNING

Läkemedelsresistenta parasiter är ett allvarligt globalt problem. Läget är framför allt kritiskt inom gruppen gastrointestinala nematoder hos små idisslare, vilka ofta uppvisar resistens mot bredspektrumverkande anthelmintika. Resistensproblematiken resulterar i en försämrad djurvälstånd och lägre produktionsnivåer. Det har visat sig vara svårt att reda ut de exakta orsakerna till läkemedelsresistens då flera olika mekanismer ofta samverkar. Cytokrom P450-systemet (CYP) ingår som en del av xenobiotikametabolismen på cellnivå hos både värdjur och parasiter och kan ha betydelse för såväl utveckling som undvikande av anthelmintika-resistens.

För att optimera anthelmintikaanvändningen och utveckla hållbara behandlingsstrategier krävs kunskap om värdjurets metabolism av xenobiotika samt vävnadsdistribution av aktiva metaboliter. Det krävs även kunskap om helminternas livscykel, predilektionsställen och xenobiotikametabolism. Hos helminter av veterinärmedicinsk betydelse, vilka uppvisar resistens eller minskad känslighet mot anthelmintiska preparat, kan befintliga läkemedels effekter potentiellt förbättras genom inhibering av CYP-systemet.

Det är idag svårt att utröna hur stor del av metabolismen av anthelmintika som beror på värdjuret eller på parasiten avseende möjligheten att inhibera CYP. Effekterna av CYP är artberoende och varierar även på individnivå. Mer forskning krävs på området för att öka kunskapen om läkemedelsinteraktioner och synergieffekter hos helminter. Eftersom utvecklingen av nya anthelmintiska preparat går långsamt är det viktigt att värna om de läkemedel som finns idag. Ett sätt att bibehålla den antiparasitära effekten hos befintliga läkemedel kan vara genom att inhibera CYP-systemet. Möjligen är det en snabbare och effektivare väg att gå i jämförelse med att utveckla nya preparat och därmed också ett sätt att kringgå eller åtminstone fördröja resistensutvecklingen.

SUMMARY

Drug-resistant parasites are a serious global problem. The situation is particularly critical within the group of gastrointestinal nematodes in small ruminants that often show resistance against broad-spectrum anthelmintics. Anthelmintic resistance (AR) results in impaired animal welfare and lower production levels. It has proven to be difficult to find out the exact cause of AR, as several different mechanisms often interact. Cytochrome P450-system (CYP) is included as a part of the xenobiotic metabolism at a cellular level in both host and parasites, and may play a major role in the development as well as the avoidance of AR.

To optimize the use of anthelmintic drugs and develop sustainable treatment strategies, knowledge of the host animal's metabolism of xenobiotics and tissue distribution of active metabolites is required, as well as information of the helminthic life cycle, preferred sites and xenobiotic metabolism. In helminths of veterinary importance, that exhibit resistance or reduced susceptibility to anthelmintic drugs, existing drug effects may be potentiated by inhibition of the CYP-system.

In present time it is difficult to determine to what extent the metabolism of anthelmintics are due to the host or to the parasite regarding the possibility to inhibit CYP. The effects of CYP are highly species dependent and even vary at an individual level. More research is required in this area to increase the knowledge of drug interactions and synergies in helminths. Since the development of new anthelmintic drugs is slow, it is important to protect the drugs that are currently working. One way to maintain the antiparasitic efficiency of existing drugs may be to inhibit the CYP-system. It might be a faster and more efficient way to go in comparison to the development of new drugs and thus also a way to circumvent or at least delay the development of resistance in the longer term.

INLEDNING

Cytokrom P450-systemet (CYP) ingår som en del av xenobiotikametabolismen på cellnivå hos både värddjur och parasiter och antas spela en stor roll för anthelmintikaresistensutvecklingen (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009). Denna litteraturöversikt fokuserar på metabolismen av anthelmintika både hos olika parasiter och dess värddjur. Fas I-reaktioner på cellnivå, där CYP-systemet ingår, kommer att beskrivas liksom dess inblandning vid utvecklingen av anthelmintikaresistens hos olika parasiter av veterinärmedicinsk betydelse. Frågeställningen riktar in sig på vad CYP-systemet är, vad det gör och var det finns samt hur det fått sitt namn och kan utnyttjas för att optimera effekten av befintliga anthelmintiska preparat.

När tidigare effektiva läkemedel upphör att avdöda parasitiska maskpopulationer vid terapeutiskt rekommenderade doser sägs anthelmintikaresistens vara etablerad (Jabbar, Iqbal, Kerboeuf, Muhammad, Khan, & Afaq, 2006). Läkemedelsresistenta parasiter är ett allvarligt globalt problem och läget är framför allt kritiskt för gastrointestinala nematoder hos små idisslare, vilka ofta uppvisar resistens mot bredspektrumverkande anthelmintika (von Samson-Himmelstjerna & Blackhall, 2005). Resistensproblematiken resulterar i en försämrad djurvälstånd och lägre produktionsnivåer.

Utvecklingshastigheten av anthelmintikaresistens varierar med geografi, klimat, parasitart och behandlingsstrategier i respektive region. Generellt går resistensutvecklingen långsammare i tempererade zoner på norra halvklotet jämfört med den snabbare utvecklingstakten på södra halvklotet (Jabbar, Iqbal, Kerboeuf, Muhammad, Khan, & Afaq, 2006). De viktigaste identifierade orsakerna som bidrar till anthelmintikaresistens är behandlingsintensiteten, där frekvent och ensidig användning av avmaskningsmedel ur samma grupp leder till selektion av läkemedelsresistenta maskpopulationer. Detta innebär att de starkaste parasiterna överlever, sprider sina resistensgener vidare till nästkommande generation (Jabbar, Iqbal, Kerboeuf, Muhammad, Khan, & Afaq, 2006).

Biotillgängligheten hos olika värddjur spelar in när det gäller dosering av anthelmintika. Utöver behandlingsintensiteten är suboptimal dosering en starkt bidragande faktor till ökat selektionstryck och resistensutveckling. Den individuella läkemedelsmetabolismen hos respektive djurart, ända ner på individnivå, är av stor betydelse (Jabbar, Iqbal, Kerboeuf, Muhammad, Khan, & Afaq, 2006). Exempelvis har både bensimidazoler och levamisol lägre biotillgänglighet hos getter än hos får. Det är dessutom en mer utspridd anthelmintikaresistens hos getter än hos får, vilket förmodligen beror på skillnader i läkemedelsmetabolismen hos dessa djurslag (Jabbar, Iqbal, Kerboeuf, Muhammad, Khan, & Afaq, 2006).

MATERIAL OCH METODER

Informationssökning via databaserna Scholar Google, sökord anthelmintic+resistance+P450; Science Direct, sökord anthelmintic* and resistance and P450 och Primo Central, sökord anthelmintic resistance P450. Vid sökningar i Science Direct har även förslag till relaterade artiklar använts. Kursböcker i parasitologi och farmakologi, FASS 2012 och FASS VET. 2012 har också utnyttjats samt muntlig och skriftlig information från handledarna Johan Höglund och Eva Tydén.

LITTERATURÖVERSIKT

Helminter

Nematoder

Nematoder delas in i bursogena och icke bursogena, vilka kan ha direkt eller indirekt livscykel och kallas vardagligt för rundmaskar. Det finns många arter som är av stor veterinärmedicinsk betydelse, såsom exempelvis *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Dictyocaulus*, *Strongyloides* och *Ascaris*. Nematoderna lever antingen av innehållet i värdjurets mag-tarmsystem, av den intestinala mukosan eller av kroppsvätskor. För att kunna oxidera kolhydrater krävs ett elektrontransportsystem som hos nematoder utgörs av cytokrom och flavoproteiner. Syre tas upp antingen genom diffusion över kutikulan och/eller via tarmen för vidare transport ut i nematodens olika vävnader. Energimetabolismens olika restprodukter utsöndras via anus/kloak eller genom diffusion över kroppsväggen. Maskarnas oxidativa metabolism av kolhydrater skiljer sig en del från värdjurens energiomsättning och är ett av målen för anthelmintiska läkemedel.

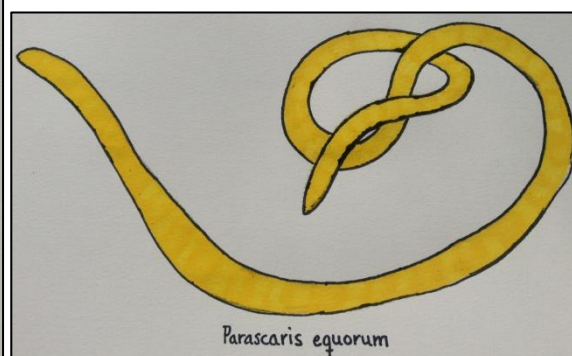
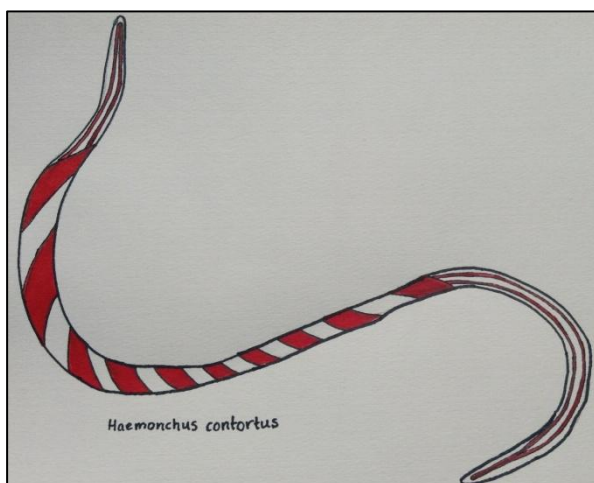


Fig. 1 Foto: Ylva Lagervall

Fig. 2 Foto: Ylva Lagervall

Anthelmintikaresistens påvisas mestadels hos strongylida maskar (framförallt *Haemonchus*), hästens små blodmaskar (*Cyathostominae*) och spolmaskar (*Parascaris*) (Höglund, 2011).

Trematoder

Digena trematoder, eller sugmaskar, är av stor veterinärmedicinsk betydelse. De adulta maskarna kallas vanligen för flundror, tack vare sitt tillplattade utseende. Exempel på digena trematoder är *Fasciola*, *Dicrocoelium* och *Schistosoma*. Det är i synnerhet stora leverflundran (*Fasciola hepatica*) ur denna maskgrupp som uppvisar resistens mot anthelmintika (Höglund, 2011). Flundrorna lever framförallt i gallgångar och mag-tarmkanalen samt i det vaskulära systemet hos värdjuren där de livnär sig på blod- och vävnadsdebris. Digestionssystemet är enkelt uppbyggt och slutar blint i grenade intestinala ceaca och energimetabolismen antas i första hand vara anaerob. Exkretionen sker genom ett tubulisystem som strålar samman i en gemensam öppning till utsidan av parasiten.

Cestoder

Cestoder kallas även för bandmaskar och har en tillplattad, segmenterad kropp och är vanligtvis känsliga för anthelmintika (Höglund, 2011). Kedjan av proglottider (segment) kallas strobila och huvudregionen för scolex. De har en indirekt livscykel, vanligen med en mellanvärd och återfinns oftast i tunntarmen hos slutvärdet. Exempel på cestoder av veterinärmedicinsk betydelse kan nämnas *Taenia* och *Echinococcus*. De saknar mag-tarmkanal och all näring tas upp transtegmentellt. Exkretionen sker via efferenta kanaler genom strobila och utsöndras från det terminala segmentet.

Anthelmintika och dess verkningsmekanismer

I Sverige används vanligen avmaskningspreparat ur någon av de fyra stora kemiska grupperna bensimidazoler (BZ; albendazol, febantel, triklabendazol med flera), makrocykliska laktoner (ML; doramektin, eprinomektin, ivermektin och moxidektin), tetrahydropyrimidiner (morantel och pyrantel) och kinolderivat (prazikvantel) eller kombinationer av dessa. Samtliga grupper har mer eller mindre breda spektrumeffekt och varierande verkningsmekanismer (Höglund, 2011).

Bensimidazoler (BZ)

Hos värdjuret metaboliseras bensimidazoler (BZ) i levern av bland annat CYP (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005) och elimineras till allra största delen via avföringen samt till en liten del via urin och mjölk (FASS VET. 2012, 2011). BZ binder till β -tubulin hos parasiten, vilket interfererar med polymerisation av mikrotubuli i absorberande celler och förstör dess struktur. Hos nematoder är det framför allt tarmcellerna som påverkas medan det hos bandmaskar och flundror är de tegmentella cellerna som påverkas. BZ blockerar celldelning hos utvecklande maskägg genom interferens av mikrotubuli-uppbyggnaden precis som hos vuxna maskar. BZ hämmar också enzym som påverkar glukosupptaget vilket ger näringsbrist hos parasiten som till slut dör. Gastrointestinala nematoder är den primära måltavlan för BZ med undantag för albendazol, som har effekt på alla helminter och triklabendazol som endast har effekt mot flundror (*F. hepatica*) (FASS VET. 2012, 2011).

Makrocykliska laktoner (ML)

Makrocykliska laktoner (ML) metaboliseras i levern hos värdjuret av bland annat CYP (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005). Substansen distribueras systemiskt, elimineras långsamt och har effekt mot endoparasiter (eg. nematoder) samt även effekt mot vissa ektoparasiter (endektocid) (FASS VET. 2012, 2011). Hos parasiten interagerar ML med GABA och glutamatreglerade kloridjonkanaler, vilket öppnar kanalerna postsynaptiskt varvid kloridjoner strömmar in i cellerna. Det uppstår då ett irreversibelt vilotillstånd och förlamning hos parasiten som dör (FASS VET. 2012, 2011).

Tetrahydropyrimidiner

Pyrantelpamoat är en relativt olöslig substans som absorberas i ringa omfattning av värdjuret. Det som absorberas metaboliseras och elimineras snabbt (FASS VET. 2012, 2011). Tetrahydropyrimidiner verkar som potent acetylkolinagonist på kolinerga neuron vilket ger en depolariserande neuromuskulärt blockerande effekt och därmed en utdragen spastisk paralis hos parasiten (FASS VET. 2012, 2011).

Kinolderivat

Kinolderivat (eg. prazikvantel) metaboliseras i levern hos värdjuret och elimineras framför allt via urin och till viss del via avföring (FASS VET. 2012, 2011). Hos parasiten förändras Ca^{2+} -permeabiliteten i membran och substansen fördelas jämt över parasitens yta. Ytterhöljet skadas vilket ger sammandragningar och förlamning hos parasiten samt stör energimetabolismen genom att hämma glukosupptaget, vilket i sin tur leder till näringsbrist och död. Endast cestoder och trematoder påverkas (FASS VET. 2012, 2011).

Farmakologisk effekt – upptag hos helminter

För att uppnå en farmakologisk effekt krävs att de anthelmintiska läkemedelsmolekylerna når till receptorer i målparasiten (Alvarez, Mottier, & Lanusse, 2006). Detta sker antingen genom oral ingestion av värdjurets blod och/eller gastrointestinalinnehåll och/eller genom transtegmentell diffusion, som hos cestoder och trematoder, samt genom transkutikulär diffusion hos nematoder. Både oral ingestion och diffusion kan förekomma samtidigt och i varierande grad mellan olika parasitarter (Mottier, Alvarez, Ceballos, & Lanusse, 2005). Speciella energikrävande transportprocesser över cellmembran är relativt selektiva för läkemedelsmolekylernas kemiska egenskaper och är en mättnadsbar process. Hur stor del av upptaget som sker via aktiva respektive passiva transportmekanismer finns än så länge inte definierat i litteraturen (Mottier, Alvarez, Ceballos, & Lanusse, 2005).

Omfattningen av den passiva diffusionen av små läkemedelsmolekyler över cellmembran hos helminter beror dels på den diffunderande ytans utseende, koncentrationsgradienten över membranet, pH/pK-relationen och hur pass lipofila molekylerna är. Detta regleras av lipoproteiner eller filtration genom aquaporer i membranet (Mottier, Alvarez, Ceballos, & Lanusse, 2005). Läkemedlets effekt beror även på exponeringstiden och dess koncentration. Tiden som parasiten exponeras för läkemedlet är avgörande för den anthelmintiska effekten.

Resistensmekanismer

Det finns två typer av resistensutveckling hos helminter:

1) Farmakokinetiskt medierade – innebär ett minskat upptag av anthelmintika, accelererande läkemedelsefflux och/eller ökande läkemedelsinaktivering. Den intracellulära koncentrationen av aktiva läkemedelssubstanser i parasiten sjunker vilket gör att färre läkemedelsmolekyler kan binda till målmolekylerna och läkemedlets effekt minskar därmed. Detta kan motverkas genom att administrera högre läkemedelsdoser (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

2) Farmakodynamiskt medierade – innebär bildande av ett ökat antal målmolekyler, förändring i målmolekylernas struktur och/eller reduktion av läkemedlets effektivitet. Fler målmolekyler eller med en förändrad struktur gör att läkemedelsmolekylerna inte kan binda in och utöva sin effekt i normal omfattning. I detta fall av resistens är högre läkemedelsdoser ineffektivt (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009). BZ-resistens anses framförallt bero på förändringar i målmolekylernas struktur (Sangster, 1996). Det är i regel svårt att reda ut en exakt orsak till läkemedelsresistens då flera olika mekanismer ofta samverkar (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

Xenobiotikametabolism hos värddjur och parasiter

Xenobiotika är främmande ämnen som tas upp i kroppen, exempelvis anthelmintika som är lipofila. Xenobiotikametaboliserande enzymer (XMEs) fungerar som ett effektivt cellförsvår och verkar genom att skapa polära (vattenlösliga) metaboliter av lipofila ämnen som då lättare elimineras från kroppen. Till XME räknas oxidas, reduktas, hydrolas och transferas (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009). Xenobiotikametabolismen är inte enbart detoxifierande då det ibland skapas reaktiva intermediära metaboliter som i vissa fall är mer toxiska än modersubstansen. Effekten på värddjuret och/eller parasiten beror på metaboliternas molekylära stabilitet (Nebbia, 2001). Avmaskningsmedlets effektivitet påverkas både av värddjurets och de infekterande parasiternas XMEs. Vid ökad kontakt med anthelmintika ökar exempelvis XME-uttrycket, vilket resulterar i förhöjd metabolism och sjunkande plasmanivåer hos värddjuret. Detta leder i sin tur till att den dos som parasiterna exponeras för blir verkningslös och därigenom överlever parasiterna behandlingen. Induktion av värdens XMEs bidrar således indirekt till utveckling av anthelmintikaresistens hos parasiter (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

Xenobiotikametabolismens olika faser

Fas I) Funktionella reaktioner

Vid fas I-reaktioner tillförs funktionella grupper till xenobiotikamolekylerna genom exempelvis oxidation, reduktion och/eller hydrolys (Nebbia, 2001). De funktionella grupperna fungerar sedan som fästpunkter för endogena substanser vid fas II. Syftet med fas I är att minska modersubstansens lipofilitet, genom att öka ämnets polaritet och därigenom dess vattenlösligheten, vilket underlättar eliminering från cellen. Ibland skapas toxiska intermediärer under detta steg. CYP-systemet är en viktig del av fas I-metabolismen (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

Fas II) Konjugeringsreaktioner

Vid fas II konjugeras fas I-metaboliter med endogena substanser som exempelvis glutation, glukuronsyra, aminosyror och sulfater, (Nebbia, 2001). Genom att koppla på dessa ämnen skapas stabila vattenlösliga molekyler som oftast är inaktiva och därmed kan utsöndras via urin eller galla från värdjuret samt genom aktiv eller passiv uttransport från parasiten (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

Fas III) Aktiv transport

Vid fas III sker en aktiv transport av metaboliter, konjugat och substrat genom cellmembran. Transporten medieras av speciella proteintransportörer och kräver energi i form av adenosintrifosfat (ATP) (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

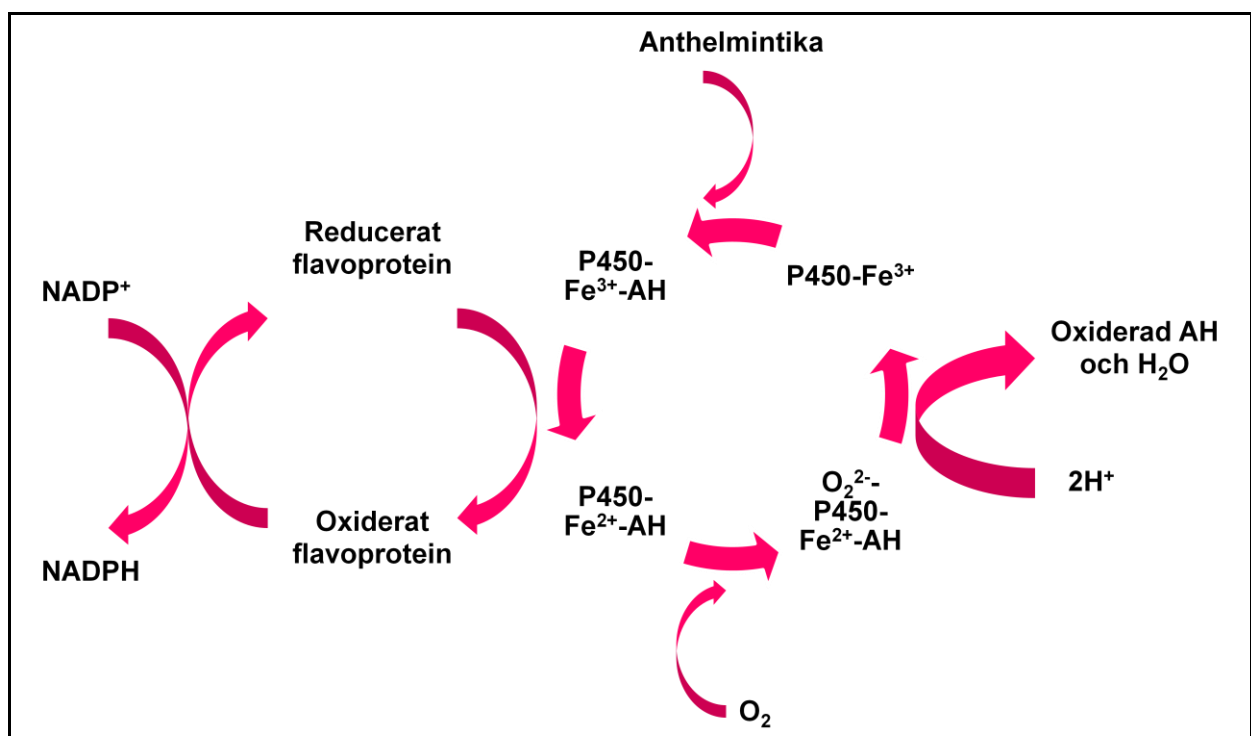


Fig. 3 Figur av: Ylva Lagervall, källa; www.biology-online.org, Cytochrome P450
Exempel på Fas I -metabolism av xenobiotika hos däggdjur.

CYP-systemet

Cytokrom P450 (CYP) är ett så kallat hemoprotein som finns hos ett stort antal levande organismer (Nebbia, 2001) (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009). Fler än tusen varianter av CYP är identifierade, vilka delas in i familjer och subfamiljer baserat på gensekvenshomologi (Nebbia, 2001). Varje djurart har sin specifika CYP-numrering (Riviere, 2009). CYP anger det enzym eller den gen som det kodar för och följs av en eller flera siffror som indikerar genfamilj (Nebbia, 2001). En versal indikerar den subfamilj som avses och ytterligare en siffra anger den enskilda genen (Nebbia, 2001). Ett exempel är enzymet CYP2E1 som är inblandat i paracetamolmetabolismen hos däggdjur (Sjöqvist, 2011) (Nebbia, 2001).

Namngivningen cytokrom P450 betyder fritt översatt från latin ”färg i cell” och P:et står för ”pink” eftersom enzymet tillsammans med koloxid bildar en rosafärgad förening (Rang, Dale, Ritter, Flower, & Henderson, 2012). Benämningen 450 kommer från den reducerade järnatomen i proteinet som absorberar ljus av våglängden 450 nm (Rang, Dale, Ritter, Flower, & Henderson, 2012). Vanligen katalyserar CYP fas I-reaktioner i form av monooxygenation av substrat, där en syreatom från molekylärt syre infogas till ett organiskt substrat medan den andra syremolekylen reduceras till en vattenmolekyl. Enzymet kan också agera som peroxidas eller reduktas beroende på tillgången av molekylärt syre (Nebbia, 2001). CYP-systemet ingår även som en del i den endogena metabolismen av steroider, fettsyror och prostaglandiner (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

Primärt är CYP membranbundna proteiner i det endoplasmatiska nätverket men finns även i viss utsträckning i mitokondrier. CYP är NADPH/NADH-beroende och kan i allmänhet metabolisera olika substrat genom sin relativt ospecifika bindningsförmåga (Nebbia, 2001). Vanligen förknippas CYP med levermetabolism hos däggdjur, men det finns i stort sett i alla vävnader som kan metabolisera främmande substanser (inklusive huden, olika vävnader i mag-tarmkanalen, luktslemhinnor, hjärta, lungor, hjärna, njurar, gonader och benmärgen) (Nebbia, 2001). CYP-funktionen anses essentiell för normal cellmetabolism hos alla levande organismer (Brophy, Mackintosh, & Morphew, 2012). Även hos helminter har CYP-kodande gener identifierats (Brophy, Mackintosh, & Morphew, 2012). I vilken omfattning systemet används vid metabolism av anthelmintika hos veterinärmedicinskt betydelsefulla maskar är dock oklart i dagsläget (Cvilink, Lamka, & Skalova, 2009).

CYP hos helminter – vara eller inte vara

Enligt äldre litteratur saknas CYP-systemet hos helminter (Precious & Barrett, 1989) vilket är anmärkningsvärt då det utöver däggdjur har identifierats hos de flesta organismer inklusive svampar, bakterier och protozoer (Precious & Barrett, 1989). Evolutionen från ett gemensamt ursprung skulle enligt artikelförfattarna då kunna ifrågasättas för helminter. Möjligen kunde den skenbara avsaknaden av CYP-system tillskrivas otillräckliga detektionsmetoder (Precious & Barrett, 1989).

Samma författare (Precious & Barrett, 1989) presenterar några olika teorier om varför helminter skulle ha en annorlunda xenobiotikametabolism än övriga organismer. Enligt en teori skulle dessa parasiter ha adapterats till att vara beroende av värddjurets XME-system istället för att ha utvecklat ett eget. Alternativt skulle den intestinala miljön vara för syrefattig för att helminter skulle kunna utnyttja CYP, vilket kräver tillgång till syre, alternativt att CYP-systemet skulle vara till nackdel genom sin medverkan vid bildandet av instabila intermediärmolekyler som kan skada parasiten. Avsaknaden av CYP skulle alltså vara ett slags skydd både för att undvika värddjurets immunförsvarsreaktioner och för att förebygga eventuella toxiska skador vid nedbrytning av xenobiotika (Precious & Barrett, 1989). Författarna konstaterar dock att ingen av dessa teorier på ett tillfredsställande sätt förklarar varför CYP-systemet och dess oxidationsreaktioner skulle saknas hos helminter (Precious & Barrett, 1989).

Parasiternas xenobiotikametabolism intresserade artikelförfattarna då ökad kunskap skulle kunna leda till en långsammare resistensutveckling mot anthelmintika jämfört med motsvarande läkemedelsresistensen hos insekter, som ofta är kopplad till en ökning i CYP-systemets kapacitet (Precious & Barrett, 1989). Ett sätt att potentiära anthelmintikans effekt skulle kunna vara genom att inhibera parasiternas XMEs selektivt (Precious & Barrett, 1989).

I en artikel från slutet av nittiotalet skriver Kotze (1997) att man genom genetiska analyser, funnit bevis för CYP-geners existens hos den frilevande nematoden *Caenorhabditis elegans* (Kotze, a, 1997) och att man även lyckats demonstrera monooxygenas-aktivitet hos den parasitiska nematoden *Heligmosomoides polygyrus* (Kotze, a, 1997). Dessutom har författaren detekterat CYP-aktivitet i mikrosomer hos L1 och L3-stadier av *Haemonchus contortus* liksom en lägre aktivitetsgrad hos aduler (Kotze, a, 1997). *H. contortus* är den mest patogena nematoden hos får en av de arter som uppvisar resistens. Skillnaden i CYP-aktivitet mellan frilevande och parasitiska stadier tillskrivs syretillgången. Paralleller dras mellan grisens spolmask *Ascaris suum* som uppvisar både aerob och anaerob energimetabolism, där CYP-aktiviteten är lägre utan tillgång till syre (Kotze, a, 1997).

I en senare skriven artikel från 2000-talet, där hela genomet för *C. elegans* har sekvenserats, visar det sig att uppåt 80 olika CYP-kodande gener finns representerade och att det i olika grad är möjligt att inducera mätbar CYP-aktivitet (Menzel, Bogaert, & Achazi, 2001). Genom att utsätta *C. elegans* för kända CYP-inducerande xenobiotika som till exempel β -naftoflavon, PCB52 och fenobarbital lyckades författarna, med hjälp av olika mätmetoder samt märkning av celler med grönt flourecerande protein (GFP), påvisa intestinal CYP-aktivitet under kontrollerade laboratorieförhållanden hos nematoden (Menzel, Bogaert, & Achazi, 2001). HelminTERS CYP-aktivitets vara eller inte vara beror således på artiklarnas ålder och den slutsats som kan dras med dagens kunskap är att systemet verkar finnas – om än i oklar omfattning.

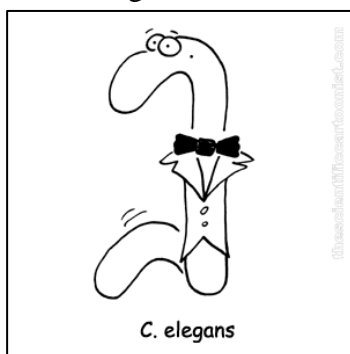


Fig. 4 *C. elegans*, källa: www.thescientificcartoonist.com

Inhibering av CYP-systemet

Det finns flera olika CYP-inhibitorer där exempelvis piperonylbutoxid (POB) är ett välkänt preparat. POB är ett semisyntetiskt derivat från safrol vilket är en naturligt förekommande del av essentiella oljor från olika växter, som till exempel *Sassafras albidum* (Svensk Kulturväxtdatabas (SKUD), 2012) och har ingen anthelmintisk effekt i sig (Benchaoui & McKellar, 1996). Däremot används POB ofta tillsammans med olika insekticider, exempelvis rotenon, för att potentiära den insekticida effekten via inhibering av insekternas CYP-system (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005).

Effekt av CYP-inhibering hos värdjuren

I en engelsk studie behandlades getter samtidigt med POB och fenbendazol (ett BZ-preparat) vilket resulterade i att biotillgänglighet av fenbendazol ökade i jämförelse med enbart behandling med fenbendazol (Benchaoui & McKellar, 1996). Även andra farmakokinetiska parametrar såsom C_{max} och mean residue time (MRT) ökade signifikant vid samadministrering med POB, vilket indikerar en potentierad anthelmintisk effekt då parasiterna exponeras för större läkemedelsdoser under en längre tidsperiod jämförelsevis med enbart behandling med fenbendazol (Benchaoui & McKellar, 1996).

I samma studie avmaskades får som var infekterade med BZ-resistenta *Teldorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta* och *H. contortus* med enbart fenbendazol, vilket resulterade i en minskning av antalet *T. circumcincta* med 7,9% och *H. contortus* med 84,8% (låg grad av resistens). Vid samtidig behandling med POB och fenbendazol minskade antalet *T. circumcincta* med 97,8% och *H. contortus* med 99,0% (Benchaoui & McKellar, 1996). Administrering av enbart POB hade ingen anthelmintisk effekt vilket tolkades som att CYP-systemet medverkade i metabolismen (Benchaoui & McKellar, 1996). Då CYP-systemet ännu inte har bekräftats hos helminter var det enligt författarna oklart om det endast var värdjurets xenobiotikametabolism som inhiberats eller om sambehandlingen även påverkade parasiternas metabolism (Benchaoui & McKellar, 1996). Slutsatsen var att samadministrering av POB och fenbendazol hade en signifikant effekt på den farmakokinetiska dispositionen av anthelmintika och gav en potentiering av den antinematoda aktiviteten (Benchaoui & McKellar, 1996).

Effekt av CYP-inhibering hos parasiterna

Rotenon är ett naturligt förekommande växtgift som är toxiskt för insekter och fiskar. Substansen inhiberar mitokondrie-respirationen och metaboliseras av CYP (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005). I Australien används rotenon mot ektoparasiter såsom flugor och löss (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005). I en studie (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005) undersöktes dels den anthelmintiska effekten av rotenon hos larver och adulta *H. contortus* samt *Trichostrongylus colubriformis* och dels rotenons synergieffekt med CYP-inhibitorn POB. Rotenon visade sig vara toxiskt för larver av båda parasiterna samt nedsatte motiliteten hos adulta *H. contortus*. De toxiska effekterna av rotenon ökade signifikant vid sambehandling med POB, vilket enligt artikelförfattarna visar på att CYP-systemet används av dessa nematoder för att detoxifiera rotenon. Jämfört med övriga anthelmintiska preparat, som exempelvis thiabendazol, levamisol och ivermektin, uppvisade dock rotenon 10^3 - 10^4 gånger lägre grad av toxicitet för parasiterna. Säkerheten för värdjuret är otillräcklig för att utnyttja preparatet som avmaskningsmedel då riskerna för att rotenon kommer ut i värdjurets blod och orsakar skador anses vara för stora (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005).

I en studie *ex vivo* uppvisade triklabendazolresistenta leverflundror (*F. hepatica*) överuttryck av CYP (Devine, o.a., 2010). Flundrorna var dock känsliga för enzyminhibering vid sambehandling med POB och triklabendazol (TCBZ) (Devine, o.a., 2010). Med hjälp av elektronmikroskop studerades flundrornas tegment för att avgöra graden av ytförändringar, vilket kopplades samman med effekten av behandlingen. Allvarligare ytförändringar syntes

vid samadministration av POB och TCBZ i jämförelse vid enbart behandling med TCBZ (Devine, o.a., 2010). Hos känsliga *F. hepatica*-stammar sågs endast en begränsad anthelmintisk potentiering vid sambehandling av POB och TCBZ, vilket enligt artikel-författarna visar på att en ökad läkemedelsmetabolism är en del av de multifaktoriella mekanismerna vid anthelmintikaresistens (Devine, o.a., 2010).

DISKUSSION

För att optimera anthelmintikaanvändningen krävs kunskap om värdjurets metabolism av avmaskningsmedel och vävnadsdistribution av aktiva metaboliter. Det behövs också ökade kunskaper om helminternas xenobiotikametabolism. Dessa faktorer är avgörande för att minimera resistensutvecklingen och bibehålla djurvälståndet. Genom att inhibera CYP-systemet hos värdjuret så utsätts parasiterna för en större dos anthelmintika under en längre tid, vilket ger en ökad antiparastär effekt. Även om parasiterna utvecklat en farmakokinetiskt medierad resistens är det rimligt att anta, i enlighet med genomgångna resultat i litteraturstudien, att den anthelmintiska effekten går att potentiella genom sambehandling med en CYP-inhibitor och de avmaskningsmedel som idag finns att tillgå. Resultaten från de få studier som finns publicerade på området visar att även inhibering av parasiternas eget CYP-system leder till en ökad antiparastär effekt. Möjligen är det en snabbare och effektivare väg att inhibera CYP-systemet i jämförelse med att utveckla nya anthelmintiska preparat. På så sätt kan resistensutvecklingen kringgås eller åtminstone fördröjas, ungefär på liknande sätt som gjorts med samadministrering av insekticider och CYP-inhibitorer mot resistenta artropoder.

Tidigare studier har inte varit så inriktade på oxidativa XMEs (CYP) hos helminter då deras existens inte gick att påvisa (Brophy, Mackintosh, & Morphew, 2012). Det har därmed varit svårt att hitta information om CYP-systemets betydelse för resistensutvecklingen hos parasiter. De studier som finns publicerade visar också på brister med att använda experimentella laboratoriemodeller istället för kliniska försök. Genom att jämföra xenobiotikametabolismen hos den vävnadslevande parasiten *Brugia malayi* och den frilevande nematoden *C. elegans* har det visat sig att den förstnämnda har svårare att oskadliggöra toxiska ämnen (Brophy, Mackintosh, & Morphew, 2012). Detta skulle kunna härledas till det naturliga urvalet där en frilevande nematod är i större behov av ett brett detoxifieringsförsvar i jämförelse med en som lever i en mikromiljö inom ett värdjur (Brophy, Mackintosh, & Morphew, 2012). Dessutom är syretillgången ytterst begränsad för intestinala parasiter vilket kan vara en bidragande faktor till att det finns skillnader i uppmätt CYP-aktivitet mellan frilevande larvstadier och adulta maskar av samma art (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005). Blodlevande nematoder som exempelvis *H. contortus* kan möjligen utnyttja syre från värdjurets hemoglobin och på så vis utnyttja aerob metabolism (Kotze, Dobson, & Chandler, b, 2005). Frilevande helminter som *C. elegans* skulle således inte vara en hållbar modell för hur anthelmintika metaboliseras av parasitiska helminter och eventuell resistens som utvecklingsföljd (Brophy, Mackintosh, & Morphew, 2012).

Enligt min mening är det i dag svårt att bringa klarhet i hur stor del av xenobiotika-metabolismen hos veterinärmedicinskt betydelsefulla helminter som utförs av CYP-enzym. Med hjälp av DNA-analyser har man kommit en bit på väg då flera CYP-syntetiserande gener har identifierats, men eftersom både artvariationen och den individuella variationen är stor avseende CYPs effekter är det svårt att avgöra vad detta har för konsekvenser på klinisk nivå. Den slutsatsen som jag har kunnat dra är att det finns möjlighet att inhibera CYP-systemet på olika nivåer och på så sätt uppnå en bättre anthelmintisk effekt. Vilket av alternativen, på värdjurs- eller parasitnivå eller en kombination av båda, som ger bäst effekt av de anthelmintiska preparaten vid inhibering av CYP återstår att forska i.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alvarez, L., Mottier, M., & Lanusse, C. (2006). Drug transfer into target helminth parasites. *TRENDS in parasitology* , 23 (3), ss. 97-104.
- Benchaoui, H., & McKellar, Q. (1996). Interaction between fenbendazole and piperonyl butoxide: pharmacokinetic and pharmacodynamic implications. *J. Pharm. Pharmacol* (48), ss. 753-759.
- Brophy, P., Mackintosh, N., & Morpew, R. (2012). Anthelmintic metabolism in parasitic helminths: proteomic insights. *Parasitology* , 139, pp. 1205-1217.
- Cvilink, V., Lamka, J., & Skalova, L. (2009). Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Informa* , 41 (1), ss. 8-26.
- Devine, C., Brennan, G., Lanusse, C., Alvarez, L., Trudgett, A., Hoey, E., o.a. (2010). Inhibition of cytochrome P450-mediated metabolism enhances ex vivo susceptibility of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Parasitology* , 137, ss. 871-880.
- FASS VET. 2012.* (2011). Stockholm, Sverige: Läkemedelsindustriföreningens Service AB, LIF.
- Höglund, J. (2011). Avmaskningsmedel. i *FASS VET. 2012* (ss. 946-957). Stockholm, Sverige: Läkemedelsindustriföreningens Service AB, LIF.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M., & Afaq, M. (den 14 8 2006). Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Science* , 79, ss. 2413-2431.
- Kotze, A. (1997). Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (nematoda). *International Journal for Parasitology* , 27 (1), ss. 33-40.
- Kotze, A., Dobson, R., & Chandler, D. (den 1 11 2005). Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro: Potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Veterinary Parasitology* , 136, ss. 275-282.
- Menzel, R., Bogaert, T., & Achazi, R. (2001). A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 395 (2), ss. 158-168.
- Mottier, L., Alvarez, L., Ceballos, L., & Lanusse, C. (den 9 12 2005). Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Experimental parasitology* , 113, ss. 49-57.
- Nebbia, C. (2001). Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *The Veterinary Journal* , 161, ss. 238-252.

Precious, W. Y., & Barrett, J. (1989). Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today* , 5 (5), ss. 156-160.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Flower, R., & Henderson, G. (2012). Chapter 9, Section 1, Drug metabolism and elimination. i H. Rang, M. Dale, J. Ritter, R. Flower, & G. Henderson, *Rang and Dale's Pharmacology* (Vol. 7, ss. 115-122). London, UK: Elsevier Inc.

Riviere, J. (2009). Chapter 1, Section 2, Absorption, distribution, metabolism and elimination. i J. Riviere, & M. Papich, *Veterinary Pharmacology & Therapeutics* (Vol. 9, ss. 11-46). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.

Sangster, N. (1996). Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology* , 113, ss. 201-216.

Sjöqvist, F. (2011). Interaktion mellan läkemedel. i *FASS 2012* (ss. 11-18). Stockholm, Sverige: Läkemedelsindustriföreningens Service AB, LIF.

Svensk Kulturväxtdatabas (SKUD). (den 28 09 2012). Hämtat från SLU: <http://www.slu.se/sv/centrumbildningar-och-projekt/skud/> den 17 04 2013

von Samson-Himmelstjerna, G., & Blackhall, W. (2005). Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths? *Veterinary Parasitology* , 132, ss. 223-239.