



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

ABC-trasportörens betydelse för resistensutvecklingen mot anthelmintika hos nematoder

Linda Hulling

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp
Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:83
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

ABC-transportörens betydelse för resistensutvecklingen mot anthelmintika hos nematoder

The role of ABC-transporters in the development of resistance to anthelmintics in nematodes

Linda Hulling

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. 2013:83
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

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

Nyckelord: Ivermektin, ABC-transportörer, P-gp, resistens, reversering, inhibering, nematoder

Key words: Ivermectin, ABC-transporters, P-gp, resistance, reversing, inhibition, nematodes

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	2
SUMMARY	3
INLEDNING.....	4
ABC-transportörer.....	4
MATERIAL OCH METODER	4
LITTERATURÖVERSIKT	5
P-glykoproteiner	5
Makrocycliska laktoner	5
Resistens	6
Rollen hos P-gp vid resistensutveckling hos nematoder	6
<i>Lokalisering av P-gp i nematoder</i>	7
<i>Genuttryck av P-gp hos resistent isolat</i>	7
Inhibering av P-gp	8
<i>Loperamid</i>	8
<i>Verapamil</i>	9
<i>Pluronic 85 och ketokonazol</i>	9
DISKUSSION	10
REFERENSER.....	12

SAMMANFATTNING

Parasiter som utvecklats resistens mot maskmedel (anthelmintika) är ett utbrett problem över hela världen. De preparat som används idag har funnits länge på marknaden och endast ett fåtal nya preparat finns under utveckling. Det är därför angeläget att på sikt finna hållbara lösningar för att hantera den allt mer växande resistensproblematiken. För detta krävs både utökad kunskap och fortsatt forskning om hur resistens hos parasiter uppkommer och vilka möjligheter som finns att häva den.

Ett flertal teorier kring resistensutveckling hos parasiter kretsar kring effluxproteiner som till exempel P-glykoproteiner (P-gp). En teori är att det hos resistenta parasiter har utvecklats övertryck av de effluxproteiner som har till uppgift att pumpa ut anthelmintika ur parasiten varvid effekten av läkemedlet uteblir. Möjligheten att hämma P-gp har rent teoretiskt en följdverkan som innebär ett minskat efflux, vilket i sin tur nedsätter parasitens förmåga att eliminera läkemedlet. Detta resulterar i att koncentrationen av läkemedel i parasiten ökar och att anthelmintikan får ökad effekt.

I mitt kandidatarbete har jag via litteraturstudier undersökt ABC-transportörernas roll i resistensutvecklingen hos parasiter samt försökt identifiera vilka metoder som idag används i syfte att inhibera effluxproteinernas funktion. I redovisningen har jag valt att koncentrera mig på den forskning som specifikt rör nematoder.

Jämförelser av olika studier har lett till att jag har dragit slutsatsen att P-gp spelar en betydande roll i resistensutvecklingen mot anthelmintika hos nematoder samt att det tycks finnas möjligheter att öka mottagligheten hos resistenta nematoder genom administration av P-gp inhibitorer i samband med avmaskning. Dock har de flesta substanser med en sådan effekt på P-gp också flertalet biverkningar i form av toxiska effekter på värdjuret.

SUMMARY

Resistance against anthelmintics is a world wide problem, where the drugs we use today are the same as we used 20 years ago and only a few new drugs are being developed. Therefore it is of great importance that we can find sustainable methods for the use of anthelmintics so that the problems we have with resistance today don't get worse. To do this we need more knowledge about how parasites develop anthelmintic resistance and how we can reverse it.

One of the theories concerning the development of anthelmintic resistance is related to efflux proteins like P-gp. According to this theory overexpression of the genes encoding for these proteins causes a higher efflux of the drug from the parasite, which reduces the effectiveness of the drug. If there is a possibility to reduce the efflux caused by these proteins the drug concentration in the parasite would rise and also cause a rise of the anthelmintic effectivity.

In this review I have studied possibilities to inhibit these membrane bound transport proteins and a selection of the research made in this field will be presented. I have chosen to focus on nematodes. In my studies I have found that these efflux proteins play a great part in the development of anthelmintic resistance and that there may be good possibilities to increase the receptiveness in resistant nematodes by co-administration of P-gp inhibitors. Sadly many of the substances with this effect on P-gp also has a great number of toxic effects to the host.

INLEDNING

ABC-transportörer

ABC-transportörer (ATP-binding cassette proteins), är ett samlingsnamn för en stor grupp av proteiner som har till uppgift att transportera olika substanser över lipidmembran på cellulär nivå. Detta sker genom en energikrävande process vars energi utvinns vid hydrolys av ATP. Ett gemensamt drag hos alla ABC-proteiner är att de består av två skilda domäner dels en transmembran domän (TMD), dels en nukleotidbindande domän (NBD) (Jones et al., 2009).

TMD består av en α -helix struktur som är integrerad i cellmembranet. TMD har förmåga att känna igen en stor mängd substrat och de genomgår konformationsändringar som möjliggör substratens transport över membranet. Substraten inkluderar alltifrån lipider, sockerarter, aminosyror, peptider, proteiner men även främmande substanser (xenobiotika) som exempelvis läkemedel. TMD har stor förmåga att variera i struktur mellan olika transportörer vilket förklarar antalet substrat som kan hanteras. NBD däremot är konserverad hos olika ABC-transportörer och återfinns på insidan av cellmembranet i cytosolen. ATP binder in till NBD och frigör den energi som orsakar en konformationsändring i TMD. En komplett ABC-transportör består av vardera två TMD och två NBD domäner. (Jones et al., 2009, Lin, 2003).

ABC-transportörer delas in i två grupper baserat på förmågan att antingen kunna föra substrat in (influx) eller ut (efflux) ur olika celler. Hos eukaryota celler är de allra flesta ABC-transportörer så kallade effluxproteiner vilket innebär att de pumpar ut substrat ur cellen (Lin, 2003).

Större delen av den forskning som gjorts kring ABC-transportörer är riktat mot P-gp, som också är den transportör som är i fokus för detta kandidatarbete. Jag har dels undersökt vilken betydelse P-gp har för resistensen hos nematoder, dels om det är möjligt att utnyttja P-gp för att minska resistensproblematiken i framtiden. En sammanfattning av resultaten från några av dessa forskningsstudier redovisas nedan.

MATERIAL OCH METODER

Under arbetet med denna uppsats har jag använt databaserna Google scholar, Web of knowledge och Pubmed för artikelsökning. Sökord som jag använde mig av var *Cooperia onchophora*, reversing, anthelmintic resistance, cattle, *Haemonchus* samt P-gp inhibitor. Från de träffar jag fick i mina sökningar så kunde jag också söka mig vidare med hjälp av referenslistor och förslag på liknande artiklar för att hitta fakta relevant för mitt kandidatarbete.

Jag har också använt mig av FASS VET 2013, Veterinary Therapeutics 9:ed samt Veterinary Parasitology 3:ed för att läsa in mig på ämnet.

LITTERATURÖVERSIKT

P-glykoproteiner

P-gp orsakar efflux av xenobiotika ut ur cellerna med en bred repertoar av olika substrat. Hos däggdjur finns P-gp framförallt uttryckt hos celler i levern, bukspottkörteln, njurar och magtarmkanalen där de på ett effektivt sätt skyddar individen för exponering av xenobiotika (Kerboeuf et al., 2003). P-gp återfinns även i blod-hjärnbarriären som ett skydd för CNS (Riviere et al., 2009). Många läkemedel är substrat för P-gp vilket stärker antagandet att de har en betydande roll vid resistensutveckling och de kallas därför också för multi drug resistant transportörer (MDR).

P-gp anses vara det viktigaste proteinet inom gruppen av effluxproteiner eftersom många läkemedel är substrat för just P-gp. P-gp påverkar därmed hur olika läkemedel distribueras och metaboliseras vilket inverkar på den slutgiltiga effekten av läkemedlet (Kerboeuf et al., 2003).

Forskning inom området har utförts i stor omfattning hos däggdjur. Rollen hos P-gp hos nematoder är däremot fortfarande ett relativt outforskat område. De flesta forskare tycks dock vara överens om att P-gp har en betydande roll vid resistensutvecklingen mot anthelmintika framförallt hos nematoder. Detta då P-gp hos nematoder precis som hos däggdjur har som främsta uppgift att fungera som ett effluxprotein (Lespine et al., 2007 & 2008, Kerboeuf et al., 2003). Eftersom anthelmintika resistens är ett utbrett problem är forskningen inriktad på hur man på bästa sätt kan utnyttja P-gp för att öka mottagligheten för anthelmintika hos olika nematoder. I teorin kan en hämning av P-gp aktiviteten leda till en ökad koncentration av anthelmintika hos nematoden vilket därmed skulle ge ökad effekt av läkemedlet.

Makrocycliska laktoner

Makrocycliska laktoner (ML) är namnet på en grupp av närbesläktade endektocider, det vill säga läkemedel som är verksamma mot både endo- och ectoparasiter. ML delas in i två huvudgrupper (avermektiner och milbemyciner) och där båda grupperna i sin tur består av flera olika substanser. Alla ML består av 16 cirkulärt anordnade kolatomer. Avermektiner har till skillnad från milbemyciner även en sidokedja av disackarider, som varierar mellan olika preparat med olika farmakokinetiska egenskaper (Rivier et al., 2009).

ML verkar genom att binda in till GABA-receptorer och specifika glutamatreglerande kloridjonkanaler (GluCl-kanaler). GABA-receptorer finns även i hjärnan hos däggdjur, men de är normalt skyddade av blod-hjärnbarriären vilket gör ML säkra att använda. GluCl-kanaler däremot förekommer endast hos vissa invertebrater. Detta innebär att ML normalt sett endast är verksamt mot artropoder och nematoder, men inte mot cestoder och trematoder som i likhet med däggdjur saknar GluCl-kanaler (Lespine et al., 2007, Riviere et al., 2009).

Irreversibel inbindning av ML till GluCl-kanalen ger en ökad permeabilitet för kloridjoner över cellmembranet vilket resulterar i en hyperpolarisering av nerv- och muskelcellerna. Denna hyperpolarisering paralyserar svalgmuskulaturen vilket avdödar parasiten (James et al.,

2009). Det breda verkningspektrat hos ML och den breda säkerhetsmarginalen hos värdjuren har gjort att ML utgör en hörnsten i dagens moderna parasitbekämpning (Lespine et al., 2007, Bartley et al., 2009)

Det ML preparat som har används mest frekvent är ivermektin (IVM). Det är också IVM som är den äldsta substansen inom ML (Lifschitz et al, 2010a, Bartley et al., 2009). Större delen av den forskning som utförts med hänseende till resistensutveckling har baserats på IVM. Följaktligen är denna substans också den som huvudsakligen tas upp i detta arbete.

Resistens

Begreppet anthelmintikaresistens innebär att det i parasitpopulationen finns individer som har förmågan att överleva doser av anthelmintika som normalt skulle vara dödliga. Eftersom de resistenta individerna i större utsträckning överlever avmaskningsprocessen kan de föra sina gener vidare och därmed bidra till en fortsatt förökning av antalet resistenta parasiter (Riviere et al., 2009).

Rollen hos P-gp vid resistensutveckling hos nematoder

I jämförelse med hos däggdjur har nematoder en betydligt större uppsättning av gener som kodar för olika typer av ABC-transportörer. Hos exempelvis den frilevande modellnematoden *C. elegans* har sextio olika ABC-transportörer identifierats (Zhao et al., 2004). En stor andel av dessa antas vara inblandade i transporten av endogena metaboliter och dessa anses därför inte ha något med resistensutveckling mot anthelmintika att göra (Zhao et al., 2004). Samtliga ABC-transportörer finns dock inte uttryckta i alla livsstadier hos *C. elegans*. Man har dessutom sett könsrelaterade skillnader i genuttryck (Zhao et al., 2004). Bland sextio olika ABC-transportörer som identifierats hos *C. elegans* kodar åtta gener för multiresistens associerade proteiner (MRP) och nio gener kodar för "half-transporters" (HAF) (Lespine et al., 2012). Dessutom kodar fjorton gener för funktionella P-gp och ytterligare en är en pseudogen (Lifschitz et al., 2010a). Hittills har man funnit färre gener som kodar för olika typer av ABC-transportörer hos parasitiska nematoder än hos *C. elegans*. Hos till exempel *H. contortus* har man endast funnit nio P-gp gener en HAF gen och två som kodar för MRP (Williamson et al., 2011).

Den breda repertoaren av transportörer talar för att många av dessa transportörers substratspektra överlappar i funktion med varandra (Lifschitz et al., 2010a). Denna bredd antas vara den bakomliggande orsaken till att användningen av olika läkemedel genererar olika resistensfenotyper (James et al., 2009). Vid ett försök att framkalla resistens hos *C. elegans* användes enbart IVM, men efter avslutat försök påvisades korsresistens mot både pyrantel och levamisol. Resultatet tyder på att P-gp har stor betydelse vid resistensutveckling eftersom dessa tre anthelmintika utövar sin effekt på nematoden på olika sätt (James et al., 2009).

Genom att använda *C. elegans* kan man utnyttja fördelarna med att denna art går att odla i petriskålar och man kan dessutom enkelt studera effekten hos olika livsstadier. Då man vet

att GluCl-kanalen hos *C. elegans* är funktionellt homolog med den hos *H. contortus* och att IVM dödar *C. elegans* är den en bra modell för att kunna studera den generella P-gp funktionen hos nematoder (James et al., 2009).

Lokalisering av P-gp i nematoder

Att studera lokaliseringen av P-gp hos nematoder medför vissa svårigheter eftersom nematodernas olika livsstadier ger stora förändringar i både morfologi och biologi. Generellt kan sägas att P-gp främst uttrycks i nematodens svalgregion och tarmkanal och där det bidrar mest effektivt i skyddet mot xenobiotika (Kerboeuf et al., 2003, Zhao et al., 2004). Genom användning av prober i form av monoklonala antikroppar riktade mot specifika epitoper hos P-gp har man hos *C. elegans* även kunnat studera lokaliseringen av P-gp i elektronmikroskop (Zhao et al., 2004). Man har på liknande sätt också analyserat lokaliseringen av P-gp hos *H. contortus* (Kerboeuf et al., 2003). Hittills har man inte kunnat se några skillnader i lokalisering av P-gp hos mottagliga respektive resistent isolat, det kan dock bero på att de prober som använts hittills inte kan särskilja mellan olika P-gp eftersom att de är riktade mot konserverade proteinsekvenser (Kerboeuf et al., 2003, Zhao et al., 2004).

Genuttryck av P-gp hos resistent isolat

Flera studier har visat att olika isolat av *H. contortus* som är resistent mot IVM har ett ökat uttryck av P-gp jämfört med mottagliga isolat (Kerboeuf et al., 2003). Ökat uttryck av P-gp har även påvisats hos ägg från resistent *H. contortus* isolat (Demeler et al., 2013). Uppregleringen av P-gp ger ökad efflux av läkemedlet vilket i sin tur leder till ökad eliminering av läkemedlet från nematoden. Det innebär att nematodens möjligheter att överleva ökar vid behandling med anthelmintika (Kerboeuf et al., 2003). Detta stämmer överens med antagandet om att P-gp har en nyckelroll för utveckling av resistens (Lespine et al., 2008).

I en studie av James et al. (2009) beskrivs hur resistens kan utvecklas mot IVM hos *C. elegans*. I studien utsattes *C. elegans* för låga doser av IVM under flera veckor, därefter ökades gradvis dosen av IVM under en tidsperiod av flera månader. För att utreda exakt vilka transportörer som var viktiga för resistensutvecklingen så analyserades uttrycket av de gener som kodar för olika ABC-transportörer, denna analys utfördes både innan och efter resistensutvecklingen påbörjades. Efter varje ökning av läkemedelskoncentrationen inväntades en normalisering av tillväxthastighet och reproduktionsförmåga innan ytterligare ökning skedde. Resultaten av de båda analyserna jämfördes och man kunde konstatera en uppreglering av gener kodande för P-gp-1, P-gp-2 samt MRP-1 hos de resistent isolaten i jämförelse med de mottagliga isolaten (James et al., 2009). I studien gick man därefter vidare för att undersöka stabiliteten av resistensen hos dessa *C. elegans*. Detta gjordes genom att maskarna odlades på ett substrat fritt från IVM under 12 veckor varefter de utsattes för IVM på nytt. När denna stabilitetskontroll utförts så gjordes ännu en analys av genuttrycket. Man fann då att uttrycket av både P-gp-1 och P-gp-2 hade återgått till normala nivåer medan uttrycket av MRP-1 fortfarande var uppreglerat. Detta tolkades som att MRP-1 har en större betydelse för resistensstabiliteten än övriga transportörer hos *C. elegans* (James et al., 2009).

Inhibering av P-gp

Forskning inom området påvisar ett samband mellan resistens och ökat genuttryck för P-gp (Kerboeuf et al., 2003, Demeler et al., 2013, Lespine et al., 2008). Känt är också att aktiviteten hos P-gp från både däggdjur och nematoder påverkas av vissa substanser både *in vivo* och *in vitro* (Lifschitz et al., 2010a & 2010b, James et al., 2009).

Flera studier har utförts för att undersöka möjligheten att administrera en P-gp inhibitor tillsammans med läkemedel för att ta reda på om detta minskar aktiviteten hos P-gp och därmed också minska effluxen av läkemedel (James et al., 2009, Lifschitz et al. 2010a & 2010b, Demeler et al., 2013).

Loperamid

I ett *in vivo* försök med får som var naturligt infekterade med resistenta nematoder (*H. contortus* och *T. colubriformis*) co-administrerades IVM med P-gp inhibitorn loperamid (LPM). Efter behandlingen påvisades tydliga skillnader i antalet överlevande parasiter mellan den grupp där LPM co-administrerats i jämförelse med kontrollgruppen där endast IVM administrerats (Tabell 1). Resultaten stämmer väl överens med den förlängda halveringstid och ökade plasmakoncentration av läkemedlet som uppmättes hos värdjuret (Lifschitz et al., 2010a). Liknande resultat uppnåddes i ett *in vivo* försök på nöt som var naturligt infekterade med resistenta nematoder där IVM och Moxidectin co-administrerades med LPM (Lifschitz et al., 2010b). Även här kunde en förlängd halveringstid och ökad plasmakoncentration ses hos värdjuret samt skillnader i antalet avdödade nematoder mellan de grupper där LPM co-administrerades med anthelmintika i jämförelse med de kontrollgrupper där endast anthelmintika användes (Tabell 2). Av detta drogs slutsatsen att LPM minskar effluxen via P-gp hos resistenta nematoder och att LPM också ökar plasmakoncentrationen i värdjuret vilket indirekt också påverkar halveringstiden (Lifschitz et al. 2010a & 2010b).

Tabell 1. Visar antalet avdödade nematoder uttryckt i procent hos naturligt infekterade får (Lifschitz et al., 2010a)

Administrerade läkemedel	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>
IVM	0 %	77,9 %
IVM + LPM	72,5%	96,3 %
Ökning av effekt uttryckt i procentenheter	72,5	18,4

Tabell 2. Visar antalet avdödade nematoder uttryckt i procent hos naturligt infekterade nötkreatur (Lifschitz et al., 2010b)

	Administrerade läkemedel			
	IVM	IVM + LPM	MOX	MOX + LPM
<i>Cooperia spp.</i>	23 %	50 %	69 %	87 %
Ökning av effekt uttryckt i procentenheter	27		18	

Verapamil

I en nyligen utförd studie (Demeler et al., 2013) använde man sig av ett resistent isolat av tredje stadiens larver från *C. onchophora* för att undersöka huruvida inhibitorn verapamil (VPL) förändrar mottagligheten hos parasiten för IVM *in vitro*. Det resultat man fick visade tydligt att co-administration av IVM och VPL helt återställde mottagligheten för IVM hos det resistenta isolatet. Efter co-administrering uppmättes till synes identiska dos-responskurvor hos de båda isolaten. Av resultaten kunde också utläsas att VPL sänkte EC_{50} hos det mottagliga isolatet vilket tolkades som att ett normalt uttryck av P-gp påverkade resultatet av behandling med IVM även hos mottagliga isolat. Det innebär att man skulle kunna använda sig av co-administration av inhibitorer i förebyggande syfte för att minska selektionen för resistens hos de isolat som fortfarande är mottagliga för IVM behandling (Demeler et al., 2013).

En analog till VPL, CL 347.099, har tidigare använts för att studera om det är den kalciumkanal blockerande effekten hos VPL som ger den ökade effekten hos IVM (Molento et al., 2001). CL 347.099 och VPL är strukturellt mycket lika, men till skillnad från VPL har inte CL 347.099 en blockerande effekt. Genom att använda sig av en ”*in vitro* migration assay” kunde man se att både VPL och CL 347.099 gav ökad effekt av IVM vid co-administration. Det ledde fram till slutsatsen att den blockerande effekten hos VPL inte är den huvudsakliga orsaken till dess P-gp inhiberande effekt (Molento et al., 2001). Andra studier har genom andra metoder lett till samma slutsats (Demeler et al., 2013).

Man har sett att VPL har en dosberoende toxisk påverkan såväl på nordafrikanska ökenråttor (Molento et al., 1999a) som får (Molento et al., 1999b). Någon sådan toxisk effekt har inte påvisats när det gäller andra inhibitorer som till exempel LPM (Demeler et al., 2013).

Pluronic 85 och ketokonazol

Vid försök med co-administrering av inhibitorn Pluronic 85 (P85) och IVM har man sett en ökning av plasmakoncentration och ökat antal avdödade nematoder i jämförelse med kontrollgruppen där enbart IVM administrerats (Bartley et al., 2012). Däremot påvisades ingen ökad vävnadskoncentration av läkemedlet. I samma studie testades även effekten av co-administrering med en annan P-gp inhibitor, ketokonazol (KET). KET uppvisade samma ökade plasmakoncentration som P85 men någon ökning av antalet avdödade nematoder påvisades ej i jämförelse med kontrollgruppen. Detta tyder på att flera faktorer än just den ökade koncentrationen i värdjuret är involverad när det gäller att häva uppkommen resistens (Bartley et al., 2012). Att P85 till skillnad från KET får en ökad effekt på antalet avdödade nematoder kan bero på att P85 även inhiberar MRP-1 och MRP-2 utöver P-gp då MRP-1 också spelar en stor roll för resistensstabiliteten hos *C. elegans* (James et al., 2009, Bartley et al., 2012).

DISKUSSION

De flesta forskare tycks vara ense om att resistensutvecklingen mot anthelmintika hos nematoder är en komplex process. Det verkar också vara väl förankrat att fokus för denna forskning är inriktad mot effluxproteiner och främst P-gp. Flera forskningsstudier ger bevis för att P-gp har stor betydelse för resistensutvecklingen mot just ML (Kerboeuf et al., 2003, Lespine et al. 2007 & 2008 James et al., 2009). Det breda verkningsspektrat hos ML och dess höga säkerhetsmarginal hos värdjuret har gjort att ML utgör en viktig hörnsten i dagens moderna parasitbekämpning (Lespine et al., 2007, Bartley et al., 2009). Tyvärr har den omfattande användningen av ML lett till ökad resistensproblematik eftersom behandling med IVM selekterar för resistens vilket leder till ett överuttryck av P-gp (Lespine et al., 2008). I försök utförda på *C. elegans* där endast IVM administrerats, har man även påvisat korsresistens mot andra anthelmintika med olika verkningsmekanismer. Forskare menar att detta är bevis för att uppreglering av P-gp är starkt kopplad till den ökade resistensutvecklingen (James et al., 2009). Ett överuttryck av P-gp innebär att effluxen ökar vilket leder till en effektivare eliminering av läkemedlet från nematoden och nematodens möjligheter att överleva ökar trots behandling med anthelmintika (Kerboeuf et al., 2003).

Man kan på gensekvensnivå studera vilka specifika P-gp isotyper som ökar i uttryck vid resistens hos olika nematodarter. Detta är ett användbart verktyg för att öka förståelsen för mekanismerna bakom resistensutveckling. Hos *C. elegans* har man med hjälp av molekylärbiologisk teknik (qPCR) dragit slutsatsen att det är olika transportproteiner involverade i resistensutvecklingen respektive resistensstabiliteten (James et al., 2009). Fortfarande finns dock stora kunskapsluckor om hur väl konserverade olika typer av P-gp är mellan olika nematodarter vilket gör att man inte säkert kan överföra de forskningsframsteg som görs på *C. elegans* till parasitiska nematoder. Varför man hitintills funnit fler typer av ABC-transportörer hos *C. elegans* än hos parasitiska nematoder är oklart. En teori baseras på att det finns naturliga variationer mellan olika nematodarter. En annan teori är att mer forskning utförts på *C. elegans* i jämförelse med parasitiska nematoder. Detta kan innebära att de parasitiska nematodernas genom ännu inte kartlagts i samma utsträckning som hos *C. elegans* (Zhao et al., 2004). Mer forskning krävs inom området, dels för att ytterligare kartlägga P-gp hos parasitiska nematoder och dels för att tillfullo förstå deras funktion och därmed betydelse för resistensutvecklingen.

Både *in vitro* och *in vivo* försök har visat att det är möjligt att häva resistensen genom co-administration av olika typer av P-gp inhibitorer (James et al., 2009, Lifschitz et al. 2010a & 2010b, Demeler et al., 2013). Dessa inhibitorer har till synes effekt på både nematoden och värdjuret. Det är därför tänkbart att effekten av läkemedel förstärks ytterligare hos parasitiska nematoder eftersom P-gp även inhiberas hos värdjuret vilket ger en ökad koncentration i vävnaden och därmed får nematoden en högre dos anthelmintika (Lifschitz et al., 2010a & 2010b). Teoretisk innebär detta att användning av P-gp-inhibitorer är ett steg på vägen vad gäller minskad resistensproblematik hos nematoder. Tyvärr finns flera reservationer angående inhibering av P-gp då dessa transportproteiner är en viktig del av blod-

hjärnbarriären som utgör den främsta skyddsmekanismen för centrala nervsystemet (CNS). De preparat som används i forskningssyfte idag hämmar även P-gp i värddjuret vilket ger ett minskat skydd för värddjurets CNS. Om ML når höga koncentrationer i värddjuret finns risk för neurotoxicitet genom påverkan från ML på GABA-receptorer i neuronerna (Lin 2003, Riviere 2009). Det resultat man önskar uppnå inom framtida forskning är att utveckla mer specifika inhibitorer som endast riktas mot P-gp hos nematoder. Syftet är att möjliggöra användning av P-gp inhibitorer utan risk för neurotoxisk påverkan på värddjuret (Lespine et al., 2012). Man vill också bredda användandet av P-gp inhibitorer till att omfatta behandling i förebyggande syfte, detta för att öka effektiviteten hos ML vilket skulle förhindra en fortsatt ökning av resistensutvecklingen (Lespine et al., 2012).

Av detta kan man dra slutsatsen att trots den mängd forskning som utförts för att klargöra de olika mekanismerna kring resistensutveckling hos nematoder har man dessvärre bara börjat skrapa på ytan. Mycket återstår innan full förståelse nåtts för de funktioner i nematoden som leder fram till resistens. Detta kommer säkerligen också vara nyckeln till hur man kan förhindra uppkomsten av resistens samt ge lösningen till hur den kan hävas när den uppstått.

REFERENSER

- Bartley, D.J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Ménez, C., Alvenerie, M., Jackson, F. & Lespine, A. 2009 P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 136, 1081-1088.
- Bartley, D.J., Morrison, A.A., Dupuy, J., Bartley, Y., Sutra, J.F., Ménez, C., Alvenerie, M., Jackson, F., Devin, L. & Lespine, A. 2012 The influence of ketoconazole and pluronic 85 on disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant *H. contortus* isolate. *Veterinary Parasitology*, 187, 464-472.
- Demeler, J., Krücken, J., AlGusbi, S., Ramünke, S., De Graef, J., Kerboeuf, D., Geldhof, P., E. Pomroy, W. & von Samson-Himmestjerna, G. 2013. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 188, 10-19.
- James, C.E. & Davey, M.W. 2009. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*, 39, 213-220
- Jones, P.M & George, A.M. 2005. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. *International Journal for Parasitology*, 35, 555-566.
- Kerboeuf, D., Blackhall, W., Kaminsky, R. & von Samson-Himmestjerna, G. 2003. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 332-346.
- Lifschitz, A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., Virkel, G., Borda, B. & Lanusse, C. 2010a. Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, 172, 291-298.
- Lifschitz, A., Suarez, V.H., Sallovitz, J., Cristel, S.L., Imperiale, F., Ahoussou, S., Schiavi, C. & Lanusse, C. 2010b. Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: Cooperative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. *Experimental Parasitology*, 125, 172-178
- Lin, J.H. 2003. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 53-81.
- Lespine, A., Alvenerie, M., Vercruyse, J., Prichard, R.K. & Geldhof, P. 2008. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 24, 295-298.
- Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orłowski, S. & Alvenerie, M. 2007. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure-affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical sciences*, 30, 84-94.
- Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C., Prichard, R.K. 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 58-75.

- Molento, M. B., Prichard, R.K. 1999a. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitology Research*, 85, 1007-1011.
- Molento, M. B., Wang, G.T., Prichard, R.K. 1999b. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. *Veterinary Parasitology*, 86, 77-81.
- Molento, M.B. & Prichard, R.K. 2001. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 21, 117-121.
- Riviere, J.E. & Papich, M.G. 2009. Veterinary pharmacology & therapeutics. I: C.E. Lanusse, A.L.Lifschitz, A.F. Imperale. eds. Macrocyclic lactones: endectocide compounds. Iowa, USA. Blackwell Publishing.
- Williamsson, S.M., Wolstenholme, A.J. 2011. P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *Journal of Helminthology*, 86, 202-208.
- Zhao, Z., Sheps, J. A., Ling, V., Fang, L. L., Baillie, D. L. 2004. Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 344, 409-417.