

سیستم های افلوکس پمپ در باکتری ها

• فاطمه ولدخانی

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی شناسی پزشکی، گروه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

• دکتر حبیب ضیغمی

استادیار میکروبی شناسی، مدیر گروه میکروبی شناسی و ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

zeighami@zums.ac.ir

چکیده

یکی از مهم ترین مکانیسم های مقاومت باکتریایی بیان سیستم های افلوکس پمپ است. در سلسله پروکاریوت ها ۵ خانواده از سیستم های افلوکس پمپ وجود دارد. سیستم های افلوکس پمپ با خروج ترکیبات خارج سلولی از جمله آنتی بیوتیک ها، بیوسایدها، فلزات سنگین، مولکول های سیگنال سیستم کوآرم سنسینگ و یا متابولیت های باکتریایی از ایجاد غلظت کشنده ترکیبات سمی برای سلول جلوگیری نموده و موجب بقاء باکتری می شوند. چالش پیش روی محققان یافتن راهی برای مهار مکانیسم های مقاومت باکتریایی از جمله بیان سیستم های افلوکس پمپ است.

کلمات کلیدی: آنتی بیوتیک، مکانیسم مقاومت، سیستم های افلوکس پمپ

مقدمه

بیش از ۷۰ سال از ظهور اولین آنتی بیوتیک علیه عفونت های میکروبی می گذرد و در این مدت باکتری ها به عنوان موجودات زنده و هوشمند از مکانیسم های جدیدی برای بقاء خود استفاده کردند و این امر ناشی از تدابیر شگفت انگیز باکتری ها در جدال

با محیط برای بقاء می باشد.

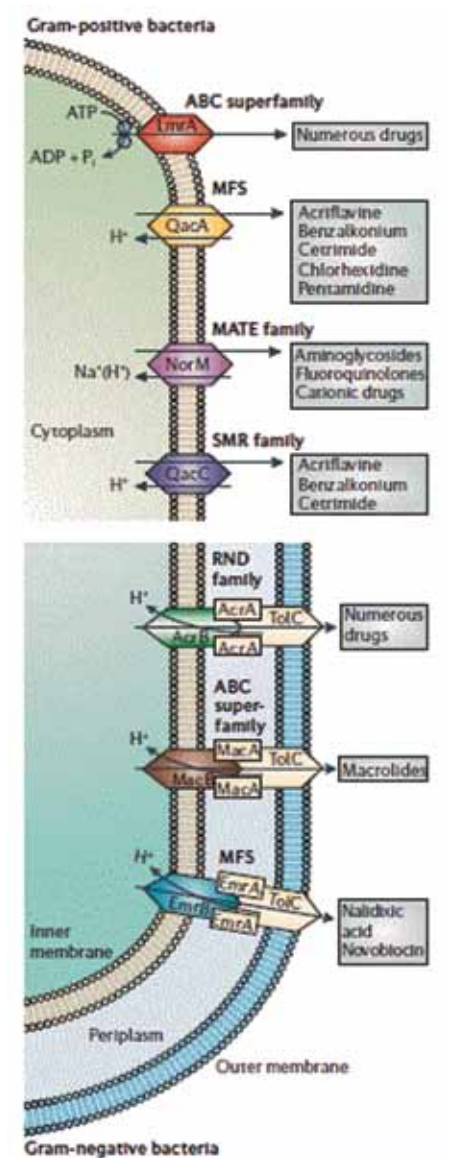
اما متأسفانه مسئله نگران کننده، جان باختن بسیاری از انسان ها در اثر ابتلا به عفونت های مقاوم به درمان آنتی بیوتیکی است. آنچه که طی بررسی ها مشخص شده است؛ یکی از مهم ترین مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیک ها بیان سیستم های افلوکس پمپ در باکتری ها است.

به طور کلی مقاومت به آنتی بیوتیک ها از طریق جهش در ژن های کد کننده جایگاه اثر آنتی بیوتیک و یا کاهش غلظت فعال آنتی بیوتیک رخ می دهد. موانع مختلفی در باکتری مانع ورود آنتی بیوتیک ها و ترکیبات سمی می شوند.

LPS در باکتری های گرم منفی به عنوان یک سد عمل نموده و مانع ورود آنتی بیوتیک ها به داخل سلول می شود به طوری که بیشتر داروها از طریق پورین وارد سلول باکتری می گردند.

اختلال در جذب دارو ممکن است در اثر تغییر در ساختار کانال های پورینی به واسطه جهش در ژن کدکننده پورین و یا کاهش تعداد پورین ها به ترتیب موجب مقاومت به کارباپنم و سفالوسپورین ها در انتروباکتر آئروژینوزا شود. سلول باکتری از سه طریق غلظت آنتی بیوتیک داخل

شکل (۱): شماتیک سیستم های افلوکس پمپ (۱)



سلولی را کاهش می دهد: ۱- محدودیت جذب دارو، ۲- غیرفعال سازی دارو، ۳- فعال سازی سیستم های افلوکس پمپ. غیرفعال سازی دارو، یا انتقال یک گروه شیمیایی به دارو ایجاد شود که از بزرگترین آنزیم های تغییر دهنده دارو می توان به بتالاکتامازها اشاره کرد.

افلوکس پمپ های آنتی بیوتیکی اولین بار در سال ۱۹۷۸ توسط levy در E-coli شناسایی شد. سیستم های افلوکس پمپ علاوه بر پروکاریوت ها در سلول های یوکاریوتی نیز وجود دارد. افلوکس فرآیندی است که طی آن باکتری، ترکیبات خارج سلولی سمی مانند داروها، مواد شیمیایی را به خارج سلول دفع و از ایجاد غلظت کشنده برای باکتری جلوگیری می نماید. سیستم های افلوکس پمپ در پروکاریوت ها دارای ۵ خانواده هستند که به دلیل تنوع سوبسترای در ایجاد مقاومت چند دارویی از اهمیت بالایی برخوردارند. افلوکس پمپ ها نه تنها باعث افزایش MIC آنتی بیوتیک ها بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه های موتانت مقاوم در باکتری ها می گردند. برای تحقیق در زمینه مهار سیستم های افلوکس پمپ لازم است ابتدا با ساختار و عملکردشان بیشتر آشنا شویم. در سلسله پروکاریوت ها ۵ خانواده efflux transporters وجود دارد:

- ۱- Major Facilitator Superfamily (MFS)
- ۲- Small Multidrug Resistant (SMR)
- ۳- Resistance Nodulation Division (RND)
- ۴- Multidrug And Toxic Efflux (MATE)
- ۵- ATP Binding Cassette (ABC)

- ۱- اتصال یک سوبسترا به ناحیه سیتوپلاسمی یا پری پلاسمی غشا
- ۲- تغییر ساختاری در ترانسپورترها که منجر به اتصال دوباره سوبسترا به محل اتصال می شود. این مرحله وابسته به انرژی بوده که از ATP در ترانسپورترهای ABC و پمپ پروتون یا سدیم در دیگر افلوکس پمپ ها استفاده می شود.
- ۳- آزاد سازی سوبسترا به بیرون از سلول باکتری (۳-۱).

سیستم های افلوکس پمپ ها به صورت یک قسمتی یا سه قسمتی هستند. افلوکس پمپ های یک قسمتی پس از جذب دارو با کمک پورین ها یا کانال های پروتئینی آن را به بیرون از سلول باکتری هدایت می نمایند در حالی که افلوکس پمپ های سه قسمتی پس از جذب دارو مستقیماً آن را به بیرون از باکتری دفع می کنند. حداقل ۳ مرحله جهت انتقال سوبسترا توسط ترانسپورترها از طریق غشای سیتوپلاسمی وجود دارد:



خانواده بزرگ RND

خانواده RND به طور ویژه در باکتری های گرم منفی یافت می شوند. خانواده RND با توجه به ساختار سویسترا آن را مستقیماً به محیط بیرون پمپ می نماید. برخلاف سایر خانواده های ناقل، تمامی اعضای خانواده RND در ترشح و دفع لیگاند (دارو و یون های فلزی سمی) دخالت دارند و با ناقل های قبلی در ساختار اولیه متفاوت هستند. این خانواده قادر به افلوکس انواعی از ترکیبات از جمله مواد باردار و آمفی فیلیک مانند تتراسایکلین، کینولون ها، کلرامفنیکل و بتالاکتام می باشد. ساختار افلوکس پمپ RND شامل ۱۲ آلفاهلیکس TM با دو لوپ بزرگ و ۹۰۰ آمینو اسید است که به صورت یک کمپلکس سه قسمتی با دومین های پری پلاسمی و کانال های غشای خارجی و پروتئین های آداپتور پری پلاسمی را تشکیل می دهد. پمپ AcrAB-TolC در این گروه از باکتری E.coli بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است.

بیان افلوکس پمپ های چند دارویی تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار دارد.

- ۱- تعدادی از سیستم های افلوکس پمپ در باکتری ها به طور ذاتی بیان می شوند مانند MexAB-OprN در سودوموناس آئروژینوزا و AcrAB در E.coli
- ۲- ممکن است ژن های کد کننده سیستم افلوکس پمپ تحت تاثیر القا کننده های خاص بیان شود.
- ۳- جهش در پروتئین های تنظیمی موجب سرکوب بیان ژن های کد کننده سیستم افلوکس پمپ می شود (۴،۵).

خانواده بزرگ MFS

ترانسپورتر MFS توسط Henderson و همکارانش کشف شد که شامل انواع Symporter, Antiporter, Uniporter می باشد. یکی از انواع آنتی پورترها، افلوکس پمپ چند دارویی است. ژن های کد کننده MFS بیشتر کروموزومی هستند. ابر خانواده MFS در بردارنده ۷۴ خانواده است و در تمامی موجودات زنده از جمله پروکاریوت ها و یوکاریوت ها وجود دارد که یکی از مهم ترین افلوکس پمپ ها در باکتری های گرم مثبت می باشد و حدود ۱۰ درصد از پروتئین های E.coli را

تشکیل می دهد. ترانسپورترهای MFS ساختار و عملکرد بسیار حفاظت شده دارند و دارای ۴۰۰ تا ۶۰۰ اسید آمینه هستند. براساس ساختمان نواحی بین غشاء به دو گروه ۱۲ و ۱۴ ناحیه بین غشایی (TM) تقسیم می شوند. خانواده دوم از ابر خانواده MFS دارای ساختار (14-SPANNER) آنتی پورتر H^+ / دارو و خانواده سوم از ابر خانواده MFS دارای ساختار (12-SPANNER) آنتی پورتر H^+ / دارو است. بیشتر خانواده های این نوع از افلوکس پمپ تنها داروها را از سیتوزول به فضای پری پلاسمی انتقال می دهند و فاقد ترانسپورتر موجود در غشای داخلی برای خروج دارو به بیرون از باکتری هستند (۹-۶).

خانواده SMR

ترانسپورتر SMR جزء گروه انتقال دهنده دارو/متابولیت است. پمپ SMR فقط در باکتری ها یافت شده است و توسط کروموزوم، پلاسمید و عناصر قابل انتقال بیان می شود. در باکتری های گرم مثبت و منفی ۲ ساختار همولوگ SMR وجود دارد در حالی که در آرکی ها تنها یک همولوگ SMR وجود دارد. پمپ SMR یک پروتئین حدوداً ۱۲ کیلودالتونی است که در غشای داخلی دارد. پروتئین های این خانواده کوچک ترین انتقال دهنده های چند دارویی شناخته شده می باشند و اندازه ای بین ۶۰۰-۴۰۰ آمینو اسید دارد. از نظر توپولوژیکی دارای چهار ناحیه TMF بصورت هموترامر فعال است که به دلیل ساختار اسیدهای آمینه لوپ ماهیت هیدروفیلیک دارد. پروتئین های این گروه براساس فنوتیپ به دو دسته Small Multidrug Pump (SMP) و Suppressor of groEL mutation proteins (SUG) تقسیم می شوند (۱۳-۱۰). ترکیبات منتقله توسط این خانواده دارای ماهیت لیپوفیلیک و کاتیونیک مانند تتراسایکلین، اریترومایسین و سولفادیازین است. سویسترای SMR وابسته به انرژی pmf است. مکانیسم SMR اولین بار بر روی sau-smr توسط Grinius و Goldberg بررسی شد. برای این کار آن ها sau-smr را بر روی پروتئولپوزوم بازسازی نمودند که پمپ بازسازی شده قادر بود TPP را با کمک با گرادپانت الکتروشیمیایی

پروتون به بیرون پمپ نماید. براساس مطالعاتی که بر روی Eco-EmrE انجام گرفته است میزان انرژی لازم برای پمپ سوپسترا بستگی به ماهیت ترکیب دارد، وضعیت انرژی سلول و گرادیانت پروتون غشا دارد (۱۵، ۱۴، ۱۲، ۲).

خانواده MATE

MATE برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ به عنوان یک خانواده انتقال دهنده پروتئین ها شناخته شد. این ترانسپورترها در حیوانات پیشرفته و گیاهان و باکتری ها گسترش یافته‌اند. اعضای خانواده MATE داری ۱۲ دومین بین غشایی می باشند. MATE طیف متنوعی از آنتی بیوتیک ها از جمله نوروفلوکسازین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکسازین، کانامایسین، آمپی سیلین و استرپتومایسین را به بیرون از باکتری پمپ می نماید. MATE در سلول های انسانی در خروج عوامل سمی شیمی درمانی دخالت دارد. بیشتر ترانسپورترهای این گروه با استفاده از گرادیانت H^+ یا Na^+ ترکیبات مختلف از جمله داروها، فلوروکینولون ها، آمینوگلیکوزیدها و رنگ های کاتیونی را به فضای پری پلاسمی پمپ می نمایند. اولین مدل این گروه، افلوکس پمپ NorM یک آنتی پورتر Na^+ دارو است که در سال ۱۹۹۸ در ویبریوپاراهمولایتیکوس شناسایی شد (۱۷، ۱۶، ۸).

انتقال دهنده های ABC

انتقال دهنده های ABC شامل انواع مختلفی از جمله Importer ها و Exporter ها در پروکاریوت ها و یوکاریوت ها است. ABC ترانسپورترها در خروج دارو در باکتری ها و نیز در مقاومت به آنتی بیوتیک ها در سلول های سرطانی نقش دارند. تنها تعداد کمی از اعضای این خانواده به عنوان multidrug exporter شناخته شده است. برخلاف دیگر افلوکس پمپ ها، این گروه از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP برای انتقال فعال دارو بر خلاف شیب غلظت استفاده می نمایند. خانواده ABC ترانسپورتر علاوه بر افلوکس متابولیت های طبیعی و مقاومت دارویی، در تقسیم سلولی و نگهداری حجم سلول نیز نقش دارد. ABC ترانسپورترها دارای ۲۰۰ آمینواسید هستند. همگی دارای ۲

دومین (TMD) یا (MSD) متشکل از ۶ آلفا هلیکس، مسئول انتقال سوپسترا و ۲ دومین متصل شونده به نوکلئوتید (NBD) هستند. برخلاف TMD، ساختار NBDها بسیار حفاظت شده و دارای چندین موتیف مشخص است. نواحی والکر B، A و سکانس LSGGQ عامل اختصاصیت دومین ها هستند. نواحی WalkerA و WalkerB در تمامی خانواده های ترانسپورتر ABC وجود دارند. طی فرآیند افلوکس TMDها در سمت سیتوپلاسم به دو مولکول کوچک یا یک مولکول بزرگ از سوپسترا متصل می شوند. هیدرولیز ATP موجب تغییر شکل TMD می شود به طوری که سطح اتصال به سوپسترا به سمت سیتوپلاسم جابجا می شود. دومین های متصل شونده به ATP به سمت خارج سیتوپلاسم به یکدیگر متصل شده و در سمت داخل سیتوپلاسم از یکدیگر جدا هستند. شایع ترین مثال ABC ترانسپورترها پمپ sav1866 در استافیلوکوکوس اورئوس است که به صورت یک هومودایمر می باشد (۱۸، ۱۶، ۱۴).

نقش افلوکس پمپ های چند دارویی در بیوفیلم باکتریایی

بیوفیلم مجموعه ای از یک یا چند گونه از باکتری ها است که در ارتباط با یکدیگر به سطوح زنده یا غیر زنده متصل می باشند تمامی سلول ها در حصاری از ماتریکس خارج سلولی قرار گرفته و با یکدیگر و محیط اطراف خود مرتبط هستند. بیشتر بیماری های عفونی باکتریایی در رابطه با تشکیل بیوفیلم است. سیستم های افلوکس پمپ با خروج مولکول های کوآرم سنسینگ در تشکیل بیوفیلم نقش دارند. چندین مکانیسم در مقاومت آنتی بیوتیکی بیوفیلم موثر است. ۱- انتشار ضعیف آنتی بیوتیک از طریق ماتریکس پلی ساکاریدی، ۲- پاسخ های قحطی و سرعت پایین رشد، ۳- کوآرم سنسینگ، ۴- بیان افلوکس پمپ و ۵- ظهور سلول های مقاوم. سیستم افلوکس پمپ MexAB-OprM باکتری سودوموناس آئروژینوزا علاوه بر حالت پلانکتونی در بقاء این باکتری به فرم بیوفیلم نیز دخالت دارد. MexAB-OprM در سلول های سطح خارجی بیوفیلم نسبت به نواحی مرکزی بیان بیشتر دارد. سیستم های افلوکس پمپ علاوه بر اثر ضد میکروبی از لحاظ ساختاری نیز در تشکیل ساختار بیوفیلم مؤثرند. به طور مثال از نظر ساختاری TolC AcrAB-TolC علاوه بر راه خروج آنتی بیوتیک ها،



نقش افلوکس پمپ ها در مقاومت به بیوسایدها

بیوسایدها گروهی از عوامل ضد میکروبی هستند که جهت ضد عفونی، گندزدایی و نگهداری مواد استفاده می شوند. برخی از آن ها مانند کلروهگزین برای آلودگی زدایی پوست و تعدادی نیز برای جلوگیری از عفونت استفاده می شوند. این ترکیبات در کارخانجات مواد غذایی، ترکیبات شوینده خانگی، دهان شویه ها استفاده می شود ولی در درمان عفونت ها باکتریایی کاربرد ندارد. بیوسایدها دارای چندین سایت هدف هستند به همین علت مقاومت به بیوسایدها معمولا به سختی حاصل می شود. از بهترین نمونه های مورد مطالعه می توان به افلوکس پمپ های MexEF-OprN و MexAB-OprM, MexCD-OprJ از سودوموناس آئروژینوزا و AcrEF-TolC, AcrAB-TolC در E.coli اشاره نمود. استفاده بی رویه و نامناسب از ترکیبات بیوساید و پایدار بودن آن ها در اکوسیستم می تواند علاوه بر مقاومت به بیوسایدها باعث مقاومت به آنتی بیوتیک ها شود. علاوه بر بیوسایدها، افلوکس پمپ ها با دفع فلزات سنگین موجود در اطراف باکتری در رشد باکتری موثرند (۲۴، ۲۳).

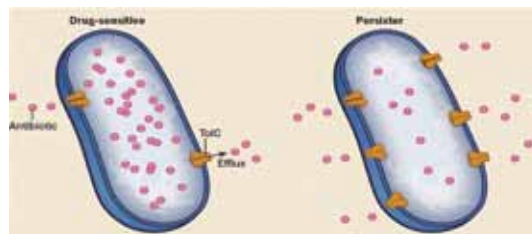
فاژ تراپی و ارتباط با افلوکس پمپ

فاژ تراپی به عنوان یک روش درمانی برای درمان عفونت های باکتریایی استفاده می شود. در روش فاژ تراپی با استفاده از فاژهای لایتیک متابولیسیم باکتری مختل شده و در نهایت باکتری لیز می شود. فاژهای لایتیک برای ورود به داخل سلول باکتری به یک یا چندین رسپتور در سطح سلول باکتری متصل می شوند. بعد از ورود به داخل سلول باکتری فاژهای لایتیک تکثیر می یابند و در نهایت موجب لیز سلول باکتری می شوند. یکی از محدودیت های فاژ تراپی مقاومت باکتری ها به عفونت فاژهاست که از طریق تغییر یا کاهش بیان رسپتورهای باکتریوفاژ صورت می گیرد. یکی از اهداف فاژ تراپی نوین اختلال در مکانیسم افلوکس پمپ ها است. در فاژ تراپی مدرن از فاژهایی

جهت اتصال و تشکیل بیوفیلم در سویه EAEC مورد نیاز است. در باکتری سالمونلا تیفی ۹ افلوکس پمپ چند دارویی وجود دارد که جهت تشکیل ساختار بیوفیلم ضروری هستند. ترکیبات مهارکننده افلوکس پمپ به همراه برخی از ترکیبات ضد میکروبی موجب اثر مهار بر روی تشکیل بیوفیلم می شوند. به طور مثال ترکیب (CQA) caffeoylquinic به همراه ترکیباتی از جمله moxifloxacin و ethidium bromide موجب مهار تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس می شوند (۲۰، ۱۹، ۱۰).

سلول های مقاوم^۱

سلول های مقاوم گروه کوچکی از باکتری ها هستند که نسبت به آنتی بیوتیک ها تحمل نشان می دهند و در طی درمان با آنتی بیوتیک زنده می مانند. آن ها از نظر فنوتیپی از سلول های مقاوم به آنتی بیوتیک متفاوت هستند. سلول های مقاوم از نظر متابولیسمی غیرفعال هستند همچنین در مطالعات جدید ثابت شده که افزایش فعالیت افلوکس پمپ ها با تشکیل سلول های مقاوم مرتبط است. در تعریف جدید این سلول ها را latent ولی active می نامند. مقاومت آنتی بیوتیکی در سلول های مقاوم علاوه بر تولید افلوکس پمپ ها به دلیل بیان کمتر پورین های ompf, ompc است. امروزه با توجه به ویژگی های سلول های مقاوم و احتمال حضور آن ها به خصوص در عفونت های مزمن، از استراتژی های جدید درمانی جهت درمان عفونت های مزمن استفاده می شود که شامل تجویز مهارکننده های افلوکس پمپ به همراه آنتی بیوتیک ها می باشد (۲۲، ۲۱).



شکل (۲): تفاوت بین سلول سالم و مقاوم (۲۲)

1-Persister cells

PAβN

PAβN به عنوان یک EPI کلاسیک برای مهار پمپ های RND استفاده می شود که اغلب با غلظت $20\mu\text{g/ml}$ در ترکیب با آنتی بیوتیک استفاده می شود. PAβN یک ترکیب دی پپتید آمید با ۲ بار مثبت در pH فیزیولوژی است که در میزان بالای غلظت Mg^{++} نفوذ پذیر می باشد. میزان PAβN MIC علیه افلوکس پمپ RND در باکتری های E.coli و سودوموناس آئروژینوزا بین 32 تا $512\mu\text{g/ml}$ است. در بورخولدیریا غلظت بالای $200\mu\text{g/ml}$ استفاده می شود. در حالی که این غلظت موجب القا پمپ های AmrAB-OprA و BpeAB-OprB در *denis B.thailan* می شود. PAβN به عنوان مهارکننده پمپ های MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN در سودوموناس آئروژینوزا است که جهت افلوکس فلوروکینولون ها و مهار پمپ AcrAB-TolC استفاده می شود در غلظت $20\mu\text{g/ml}$ از PAβN میزان MIC آنتی بیوتیک ها با بیان بالای MexAB-OprM در سودوموناس آئروژینوزا کاهش می یابد. البته کاهش MIC در تمام آنتی بیوتیک ها یکسان نیست. به طور مثال برای کلرامفنیکل و اسپارفلوکساسین و اریترومایسین و لوفلوکساسین این میزان کاهش به ترتیب ۱۲۸-۱۲۸-۳۲ و ۳۲ برابر است به عبارت دیگر میزان کاهش به میزان زیادی به نوع آنتی بیوتیک بستگی دارد. داروها و مهارکننده ها دارای محل اتصال مشترکی بر روی ترانسپورترها هستند. اخیرا طی بررسی ها مشخص شده که برخی از سوبستراهای AcrB از جمله کلرامفنیکل، بنزن، سیکلوهگزان، افلوکس ترکیبات نیتروسفین و سفامندول را تحریک می نمایند که این نوع مهار رقابتی می تواند مربوط به حضور جایگاه های اتصال و پیچیدگی های مسیر خروج می باشد. PAβN در غلظت بالا از غشای داخلی سودوموناس آئروژینوزا عبور می نماید. برای کاهش سمیت بالای PAβN تا حد قابل تحمل ساختار این ترکیب تغییر یافته است. حضور ۲ گروه کاتیونی منجر به تجمع این ترکیب در سلول باکتری می شود که به طور موقت در وزیکول های اسیدی تجمع می یابند. این ترکیب برای کلیه سمی است و محققان در تلاشند با بررسی بیشتر مهارکننده با سمیت کمتر را تولید نمایند.

استفاده می شود که رسپتور آن ها یکی از اجزای ساختار افلوکس پمپ و معمولا کانال خروج دارو در سطح باکتری است که فاذا پس از اتصال و ورود به باکتری موجب لیز آن می شوند. بروز مقاومت سلول باکتری به فاژ، در اثر کاهش بیان کانال های افلوکس پمپ، موجب اختلال در عملکرد افلوکس می شود که منجر به فعالیت آنتی بیوتیک ها و مرگ سلول باکتری می شود (۲۵).

مهارکننده های افلوکس پمپ (EPIs)

Efflux Pump Inhibitors (EPIs) به طور گسترده برای تعیین مقاومت دارویی به واسطه افلوکس پمپ در ایزوله های کلینیکی استفاده می شود. عوامل نفوذ کننده غشا یا EPIها حساسیت به آنتی بیوتیک ها را افزایش می دهند. برخی از مهارکننده ها می توانند آنتی بیوتیک های غیرفعال را دوباره به فرم فعال تبدیل نمایند. تعدادی از ویژگی مهارکننده های افلوکس پمپ عبارتند از:

- ۱- توانایی تقویت عملکرد آنتی بیوتیک هایی که باکتری با بیان افلوکس پمپ نسبت به آن ها مقاوم شده اند.
 - ۲- بر روی گونه های باکتری که فاقد سیستم افلوکس پمپ می باشند بی تاثیر است.
 - ۳- MIC آنتی بیوتیک هایی که افلوکس نمی شوند را کاهش نمی دهد.
 - ۴- موجب افزایش تجمع سوبستراهای افلوکس پمپ در داخل باکتری می شود.
 - ۵- نسبت به غشای خارجی نفوذپذیر نمی باشد.
 - ۶- تاثیری بر روی شیب پروتون در غشای داخلی ندارد.
- روش های مهار افلوکس دارو عبارتند از:
- ۱- مورد هدف قرار دادن فعال کننده ها و مهارکننده ها
 - ۲- تغییر در طراحی ساختار آنتی بیوتیک ها
 - ۳- جلوگیری از اسمبلی ساختار کامل افلوکس پمپ
 - ۴- تولید سوبستراهایی با افینیتی بالاتر برای اتصال به پروتئین های غشای داخلی
 - ۵- اختلال در کانال خروج دارو
 - ۶- حذف انرژی مورد نیاز برای آنتی پورت دارو/پروتون ترکیبات بسیاری جهت مهار افلوکس پمپ ها استفاده شده است که عبارتند از:



NMP

به دلیل نفوذ ضعیف به غشای داخلی بر روی افلوکس پمپ های سودوموناس آئروژینوزا مؤثر نیست همچنین این ترکیب فاقد گروه های با بار الکتریکی است و قادر به عبور از کانال های خاص بر روی غشا نیست. تمامی این ترکیبات با اختلال در اتصال به ترانسپورتر از اتصال سوبستراها به آن جلوگیری می نمایند.

با پیشرفت تکنولوژی در زمینه بیوشیمی و سلولی مولکولی، بررسی محققان بر روی انتقال دهنده های دارو نیز تسهیل شده است. آزمایش های حساسیت میکروبی Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) و تکنیک RT-Qpcr است برای مطالعه مقاومت به واسطه افلوکس پمپ کاربرد دارد. در روش AST با استفاده از سلول های intact یا سالم در حضور و عدم حضور EPI مقاومت به آنتی بیوتیک به واسطه افلوکس پمپ بررسی می شود (۲۸-۲۶، ۸).

نتیجه گیری

در حال حاضر بهترین راه درمان عفونت های باکتریایی استفاده از آنتی بیوتیک است ولی به دلیل مصرف نامناسب، مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها رو به افزایش است بزرگ ترین چالش محققان در این زمینه از بین بردن عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک ها است. یکی از پایدارترین راه های مقاومت به آنتی بیوتیک ها بیان افلوکس پمپ ها در میکروارگانسیم ها بخصوص در باکتری ها است. در این راستا محققان ترکیبات مهارکننده افلوکس پمپ ها را تولید کردند و از ترکیب آن ها با آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت ها باکتریایی استفاده می کنند؛ اما به دلیل سمیت اکثر این ترکیبات در انسان استفاده گسترده از آن ها ممنوع می باشد از این رو چالش جدید، یافتن ترکیبات مهارکننده با سمیت کمتر یا بدون سمیت است.

NMP، دومین ترکیب مهارکننده که در آزمایشگاه به طور گسترده استفاده می شود. دارای وزن مولکولی ۲۲۶ کیلودالتون است و طی بررسی های Kern و Bohnert کشف شد. فعالیت این ترکیب کمتر از PAβN است و نیاز به 50μg/ml برای کاهش MIC لوفلوکساسین در بیان بالای AcrB در E.coli دارد. از نظر اختصاصیت به سوبسترا NMP کاملاً از PAβN متفاوت است. به طور مثال در حضور غلظت مناسب PAβN موجب حساسیت باکتری E.coli به اتیدیوم برمیاید می شود در حالی PAβN تأثیری بر روی میزان مقاومت باکتری به اتیدیوم برمیاید ندارد همچنین برخلاف NMP, PAβN تأثیری بر میزان حساسیت نسبت به ریفامپین یا کلاریترومایسین ندارد به جهت عملکرد NMP بر ضد سروتونین در درمان کلینیکی استفاده نمی شود.

D13-9001

آزمایشگاه Daiichi-Micricide بعد از تولید PAβN اقدام به تولید مهارکننده های خاص MexB نمود که از جدیدترین تولیدات این آزمایشگاه ترکیب D13-9001 است. این ترکیب دارای وزن مولکولی ۶۶۹ دالتون است و ترکیب آن بر پایه پیروپیریمیدین است. این ترکیب بر روی مهار افلوکس پمپ در سودوموناس آئروژینوزا مؤثر است.


MBX2391

این ترکیب از مشتقات پیرانوپیریدین است که توسط Microbiotix به عنوان مهارکننده پمپ AcrB در انتروباکتریاسیه ساخته شد. این ترکیب نسبتاً کوچک است و وزن مولکولی ۴۱۰ دالتون دارد. MBX2391 یک ترکیب طبیعی است که در غلظت پایین فعال است. این ترکیب

References

- 1- Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(8):629-36.
- 2- Zgurskaya HI, Weeks JW, Ntrel AT, Nickels LM, Wolloscheck D. Mechanism of coupling drug transport reactions located in two different membranes. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:100.
- 3- Köhler T, Pechère J-C, Plesiat P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1999;56(9-10):771-8.
- 4- Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2009;1794(5):769-81.
- 5- Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*. 2015;6.
- 6- Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *International journal of bacteriology*. 2013;2013.
- 7- Schindler BD, Kaatz GW. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resistance Updates*. 2016;27:1-13.
- 8- Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(2):337-418.
- 9- Du D, van Veen HW, Murakami S, Pos KM, Luisi BF. Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Current opinion in structural biology*. 2015;33:76-91.
- 10- Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;453(2):254-67.
- 11- Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 2007;446(7137):749-57.
- 12- Pule C. Defining the role of efflux pump inhibitors on anti-TB drugs in Rifampicin resistant clinical *Mycobacterium Tuberculosis* isolates. Stellenbosch: Stellenbosch University; 2014.
- 13- Reygaert WC. Insights on the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *Adv Clin Med Microbiol*. 2016;2(005).
- 14- Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, Corona F, Reales-Calderón JA, Sánchez MB, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resistance Updates*. 2016;28:13-27.
- 15- Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778(9):1814-38.
- 16- Mousa JJ, Bruner SD. Structural and mechanistic diversity of multidrug transporters. *Natural Product Reports*. 2016.
- 17- Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2009;1794(5):763-8.
- 18- Mehmood S, Domene C, Forest E, Jault J-M. Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward-and outward-facing conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(27):10832-6.
- 19- Andersen JL, He G-X, Kakarla P, KC R, Kumar S, Lakra WS, et al. Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *International journal of environmental research and public health*. 2015;12(2):1487-547.
- 20- Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*. 2013;4(3):223-9.



- 
- 21- Wu Y, Vulić M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(9):4922-6.
- 22- Gerdes K, Semsey S. *Microbiology: Pumping persisters*. Nature. 2016.
- 23- Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*. 2016;4(1):14.
- 24- Germendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33:430449.
- 25- Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*. 2016;6.
- 26- Wacher-Rodarte MdC, Trejo-Muñúzuri TP, Montiel-Aguirre JF, Drago-Serrano ME, Gutiérrez-Lucas RL, Castañeda-Sánchez JI, et al. Antibiotic resistance and multidrug-resistant efflux pumps expression in lactic acid bacteria isolated from pozol, a nonalcoholic Mayan maize fermented beverage. *Food science & nutrition*. 2015.
- 27- Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, Ma S. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:377.
- 28- Blair JM, Piddock LJ. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current opinion in microbiology*. 2009;12(5):512-9.