

پمپهای دفع آنتی بیوتیکی

*دکتر شهین نجار پیرایه^۱، داود اسماعیلی^۲

خلاصه:

سابقه و هدف: افلوکس فرآیندی است که طی آن باکتریها ترکیبات خارج سلولی را که سمی هستند (داروها، مواد شیمیایی و آنتی بیوتیکها) به خارج سلول دفع و از ایجاد غلظت مناسب آنتی بیوتیکها برای مهار باکتری ممانعت می کنند. امروزه افلوکس پمپ خصوصا در ایجاد مقاومت چند دارویی مطرح است و به عنوان یکی از مهمترین مقاومت ذاتی آنتی بیوتیک در باکتریها می باشد. بنابراین جهت شناخت بیشتر پمپ های دفع آنتی بیوتیکی این مقاله تنظیم شد.

مواد و روشها: تحقیق به روش مروری از نوع تحلیلی انجام گرفت. با استفاده از کلمات کلیدی آنتی بیوتیک ها، پمپ های دفع، مقاومت چند دارویی، میکروارگانیسمها، مکانیسم مقاومت، در ۱۲ مقاله در مجلات معتبر در طی سالهای ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۲ مورد بررسی قرار گرفت. **نتیجه گیری و توصیه ها:** افلوکس آنتی بیوتیکی یکی از گسترده ترین مکانیسمهای مقاومت آنتی بیوتیکی بین میکروارگانیسمهاست. چون هم در باکتریهای گرم مثبت و هم گرم منفی واز جمله گونه های بیماریزای مهم پزشکی مانند استافیلوکوکها، استرپتوکوکها و پاتوژنهای فرصت طلب مثل سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. در عالم باکتریها پنج خانواده از افلوکس پمپها وجود دارد. این پمپهای افلوکس میکروبی متعلق به خانواده انتقال دهنده های مختلفی بوده و اغلب توسط ژنومهای میکروبی رمزگذاری می شوند. هم سلولهای یوکاریوتیک و هم پروکاریوتیک دارای خانواده هایی از پروتئینهای غشایی موسوم به افلوکس پمپها می باشند که در افلوکس داروها و مواد شیمیایی از درون سلول عمل می کنند. با توجه به اهمیت این سیستمهای افلوکس، شناخت آنها و استفاده مناسب از داروها در درمان برای پزشکان و محققین از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

کلمات کلیدی: آنتی بیوتیک ها، پمپهای دفعی، مقاومت چند دارویی، مکانیسم مقاومت، میکروارگانیسمها

مقدمه:

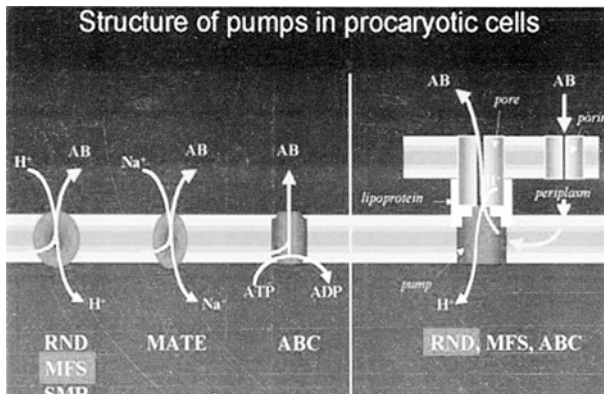
شناسایی پنی سیلین در دهه ۱۹۴۰ سبب انقلابی در درمان بیماریهای عفونی گردید ولی در مدت کوتاهی مقاومتهای مقاومتهای آنتی بیوتیکی در باکتریها ایجاد شد. (۱) باکتریها از چهار طریق نسبت به مواد شیمیایی مقاومت نشان می دهند: ۱- تغییر شیمیایی (غیر فعال سازی آنتی بیوتیک) ۲- غیرفعال ساختن آنزیمی (تغییر هدف) ۳- تغییر در نفوذ پذیری غشاء ۴- افلوکس پمپ (efflux pump) دو روش اول فقط برای یک یا چند آنتی بیوتیک اختصاصی می باشند ولی دو روش بعدی به خصوص افلوکس پمپ سبب مقاومت نسبت به همه آنتی بیوتیکها می شود و امروزه به عنوان یکی از راههای مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی بیوتیکها در باکتریها خصوصا

جدول ۱: راههای مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی

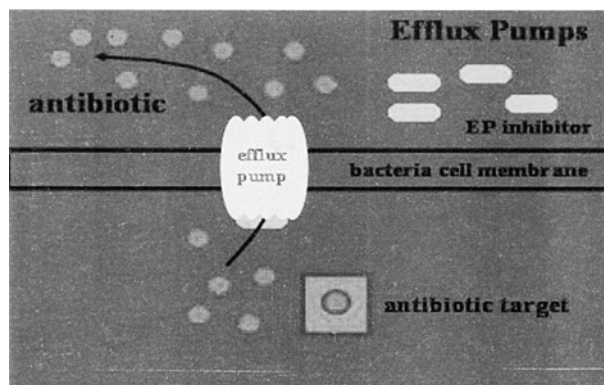
مکانیسمهای مقاومت باکتریایی

تتراسایکلین	مکروئیدها	کتونونها	آمینوگلیکوزیدها	بتالاکتامها
-	+	-	+	+
+	+	+	(+)	+
+	(+)	+	+	+
+	+	+	+	+

۱- اسنادیاری باکتری شناسی، گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس* (نویسنده مسئول)
۲- M.sc باکتری شناسی، گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس



شکل ۲: سیستم‌های مختلف افلوکس آنتی بیوتیکها در باکتریها



شکل ۳: مکانیسم افلوکس پمپ آنتی بیوتیک

انواع پمپهای دفع آنتی بیوتیکی

در عالم باکتریها ۵ خانواده از افلوکس پمپها وجود دارند که عبارتند از:

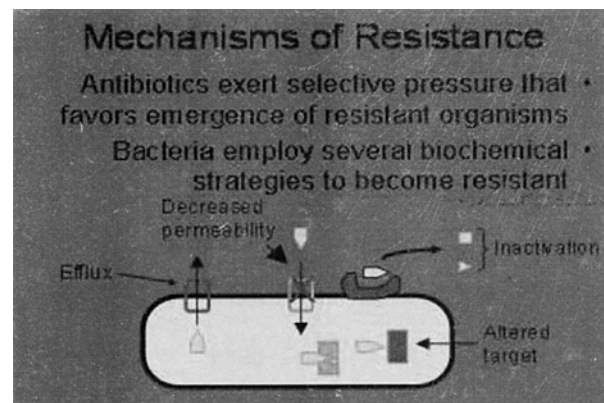
- (MFS) Major facilitator superfamily
- (SMR) Small multi drug resistant
- (RND) Resistant nodulation division
- (MATE) Multidrug and toxic efflux
- (ABC) ATP binding cassette

افلوکس پمپها از طریق بیوشیمیایی، میکروبیولوژیکی یا مولکولی شناسایی می شوند ولی بهترین روش شناسایی آنها از طریق توالی ژنومی می باشد (۶) (شکل ۴).

الف- خانواده بزرگ MFS: باعث دفع ترکیبات از سلولهای باکتریایی به شکل آنتی پورت می شود و بر اساس ساختمان نواحی بین غشاء به دو گروه ۱۲ و ۱۴ ناحیه بین غشایی (TM) ۴ تقسیم می شوند. عموماً

Pseudomonas aeruginosa مطرح می باشد (۲).

افلوکس آنتی بیوتیکی در سال ۱۹۷۸ برای اولین بار توسط Levy در *E-coli* شناسایی شد و اکنون بیش از ۵۰ سیستم افلوکس دارویی شناسایی شده است. خصوصیت مشترک همه سیستمهای افلوکس، توانایی دفع انواع مواد ضد باکتریایی نظیر آنتی بیوتیکها، بیوسایدها رنگها، پاک کننده‌ها، اسیدهای چرب و حلالهای آلی می باشد. افلوکس فرآیندی است که طی آن باکتری، ترکیبات خارج سلولی سمی (داروها، مواد شیمیایی و...) را به خارج سلول دفع و از ایجاد غلظت مناسب مواد سمی که برای باکتری کشنده است، جلوگیری می نماید. افزون بر این، باکتریها متابولیت‌های طبیعی خود نظیر آنتی بیوتیکها، باکتریوسین ها، همولیزین و اندول را نیز با این مکانیسم به خارج سلول پمپ می نمایند (۱) (شکل ۱). افلوکس پمپها به دلیل تنوع سوبستری در ایجاد مقاومت چند دارویی مهم هستند، نظیر پمپهای Bmr در باسیلوس سوبتیلیس، AcrAB در *E-coli* و MexAB در سودوموناس آئروژینوزا. افلوکس پمپها نه تنها باعث افزایش MIC^۱ (حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری) آنتی بیوتیکها می گردند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه های موتانت مقاوم به آنتی بیوتیک در باکتریها می گردند. در این مقاله به معرفی خانواده های مهم پمپهای دفع آنتی بیوتیکی در باکتریها می پردازیم. در باکتریها ۵ خانواده از افلوکس پمپها وجود دارد که بر حسب روش کسب انرژی برای انتقال سوبسترا به دو دسته تقسیم می شوند. پمپهای دسته ۱ جهت جابجایی سوبسترا از انرژی ATP استفاده می کنند. در این دسته فقط پمپهای ABC^۲ یا کاستهای اتصال به ATP وجود دارند. پمپهای دسته ۲ از انرژی گرادینت پروتون غشاء (pmf)^۳ برای انتقال سوبستراهایشان سود می برند (۳) (شکل ۲ و ۳).



شکل ۱: مکانیسمهای مقاومت باکتریها نسبت به مواد شیمیایی

1- Minimum Inhibition Concentration
2- ATP Binding Cassette
3- Proton Motive Force
4- Trans Membrane

شکل ۴: توپولوژی، مکانیسم عمل و سوبستراهای طبیعی خانواده های اصلی افلوکس پمپها

	SMR	RND	MFS	ABC	
Topology			12 TMS 14 TMS 		
Mechanism					
Antibiotics	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ erythromycin ▲ sulfadiazine 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ fluoroquinolones ▲ erythromycin ▲ rifapicin ▲ β-lactams ▲ fluoroquinolones ▲ fusidic acid ▲ chloramphenicol □ aminoglycosides 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ fluoroquinolones ▲ erythromycin ▲ lincosamides ▲ rifapicin ▲ pristinamycin ▲ chloramphenicol □ aminoglycosides 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ fluoroquinolones ▲ macrolides ▲ lincosamides ▲ rifapicin ▲ chloramphenicol □ aminoglycosides 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ fluoroquinolones ▲ tetracyclines ▲ macrolides

E-coli مقاومت به آمینو گلیکوزیدها، رنگها و فلوروکینولونها را ایجاد می کند.

ه- انتقال دهنده های ABC: خانواده ناقلهای ABC دارای یک ناحیه سیتوپلاسمی متصل شونده به غشاء علاوه بر ناحیه آلفا هلیکس داخل غشایی می باشند که به آنها اجازه می دهد از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP برای انتقال فعال دارو برخلاف شیب غلظتی استفاده نمایند. خانواده های دیگر برای این هدف از شیب الکتروشیمیایی داخل غشاء و تبادل پروتونها استفاده می کنند. نواحی ABC ۲۰۰ آمینواسید در طول دارند. اختصاصیت ویژه domainهای ABC حضور نواحی والکر A، B و سکانس LSGGQ در تمامی اعضاء این خانواده می باشد. هر domain هیدروفوبیک ترکیبی از ۶ آلفا هلیکس TM می باشد. مسوول انتقال طیف وسیعی از سوسترها می باشد. این خانواده نقشهایی در تقسیم سلولی translation elongation، و نگهداری حجم سلول علاوه بر افلوکس متابولیتهای طبیعی و مقاومت دارویی دارند. در ورود طیف وسیعی از مولکولها با وزن مولکولی کم نقش داشته و در تهیه مواد برای ساختار سطحی و ارگانیسیمهای دیگر دخالت می کند. نقش ناقلهای این خانواده در مقاومت دارویی در باکتریهای گرم منفی کم اهمیت تر از نقش آنها در باکتریهای گرم مثبت است. این وضعیت ممکن است به علت ساختار فیزیکی خارجی باکتریهای گرم منفی باشد. (۴،۵،۹،۸)

پیشرفتهای قابل ملاحظه ای که در طی دهه گذشته در دانش سیستمهای افلوکس چند دارویی حاصل شده، نشان می دهد این سیستم در عالم باکتریها گسترده شده و دو نقش فیزیولوژیکی دارند نخست به عنوان ماشین ترشح فرآورده های سلولی هستند و دوم به عنوان مکانیسمهای دفاعی علیه مواد مضر که در محیط وجود دارند استفاده می گردند. میزان مقاومتی که توسط افلوکس پمپها ایجاد می شود بستگی به ماهیت میکروارگانسیم و سوسترهای آنتی بیوتیک دارد.

از نظر بالینی مقاومتهای آنتی بیوتیکی معنی داری در بعضی از پاتوژنهای مهم نظیر سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه توسط پمپهای دفع آنتی بیوتیکی مختلف ایجاد شده است. در بیشتر موارد این سیستمهای دفع آنتی بیوتیکی فقط موجب افزایش MIC آنتی بیوتیک در میکروارگانسیمها می گردند ولی همراه با مکانیسمهای دیگر مقاومت آنتی بیوتیکی

۴۰۰ آمینواسید دارند و باعث افلوکس انواع زیادی از ترکیبات مانند آنتی بیوتیکها، قندها، حد واسطهای چرخه کربس، استرهای فسفات و اولیگوساکاریدها می گردد. NorA یکی از سیستمهای افلوکس MFS است که در استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد و سبب مقاومت به کینولونها (مانند سپیروفلوکساسین و نورفلوکساسین)، کلرامفنیکل و کاتیونهای آلی می گردد.

ب- خانواده بزرگ SMR: پروتئینهای این خانواده کوچکترین انتقال دهنده های چند دارویی شناخته شده می باشند و ۱۰۰ آمینواسید دارند. از نظر توپولوژیکی دارای چهار ناحیه TM بوده و فقط در باکتریها یافت شدند. ترکیبات منتقله توسط این خانواده معمولا لیپوفیلیک و کاتیونیک می باشند مانند تراسایکلین، اریترومایسین و سولفادیازین.

ج- خانواده بزرگ RND: این خانواده با توجه به ساختار از بقیه متمایز هستند. ناقلهای این خانواده بزرگتر از بقیه ناقلها می باشند. فقط در باکتریهای گرم منفی یافت می شوند. سیستمهای دفع چند دارویی OMP/MFP/RND در تعدادی از ارگانیسیمها از جمله E-coli سالمونلا تیفی موریوم، هموفیلوس آفلوآزنا، گونه های نایسریا، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس پوتیدا، گونه های بورخ اولدریا و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا وجود دارد. بازدهی این ناقلها بیشتر از بقیه است چون با توجه به ساختار سوستر آن را مستقیما به محیط بیرون پمپ می کنند. برخلاف سایر خانواده های ناقلها، تمام اعضای خانواده RND در ترشح و دفع لیگاندهای چند گانه دخالت دارند (دارو و یونهای فلزی سمی) با ناقلهای قبلی در ساختار اولیه متفاوت است و شامل ۱۲ آلفا هلیکس (TM) با دو لوپ بزرگ و ۹۰۰ آمینواسید دارند.

این خانواده قادر به افلوکس انواعی از ترکیبات از جمله مواد باردار و آملی فیلک مانند تراسایکلین، کینولونها، کلرامفنیکل و بتالاکتامها می باشد. یکی از مهمترین سیستمهای افلوکس شناخته شده پمپهای افلوکس Mex در سودوموناس آئروژینوزا می باشند. پمپهای Mex سبب مقاومت چند دارویی نسبت به آنتی بیوتیکهای تراسایکلین، فلوروکینولونها، تعداد زیادی از بتالاکتامها (از جمله سفتازیدیم و ایمی پنم)، آمینو گلیکوزیدها و اریترومایسین می گردند. د- خانواده MATE: اعضاء این خانواده دارای domain ۱۲ بین غشایی می باشند. NorM در ویبریو پاراهمولیتیکوس و هومولوگ آن در



سوبسترای های چند گانه را تحت تاثیر قرار می دهد .
۳- شناسایی مهار کننده که با افلوکس از طریق جبران تغییر در ورود عامل آنتی باکتریال مقابله می کند.

۴- شناسایی مهار کننده های شبکه تنظیمی که ممکن است بیان افلوکس پمپهای اکتسابی را کنترل کند .

۵- شناسایی مهار کننده که دیواره یا غشاء باکتریایی را تخریب می کند بنابراین افلوکس با تاثیر کمتری بیان می شود.

۶- تغییر عامل آنتی باکتریال جهت مقاومت نسبت به افلوکس (۲) مهار کننده های افلوکس پمپها، ترکیباتی هستند که افلوکس آنتی بیوتیکها را مهار می کنند و این مهار کننده ها به عنوان یکی از محورهای تحقیقاتی مراکز بزرگ پژوهشی دنیا مورد توجه هستند و ترکیبات مختلفی برای مهار بعضی از پمپهای دفع آنتی بیوتیکی معرفی شده اند که عبارتند از :

۱- Alkylaminoquinolines، افلوکس پمپ آنتی بیوتیکی باکتریایی را مهار می کند.

۲- EA371D-a EA371A، توسط *Streptomyces vellosus* تولید شده و پمپهای MexEF, MexAB را مهار می کند

۳- BenstatinA, B پمپهای MexEF, MexAB را مهار می کند.

۴- Milbemycins مهار کننده پمپهای کانیدید آلیکانس و گلابراتا می باشد.

۵- Mc-2,7,11 پمپهای RND در باکتریهای گرم منفی را مهار می کند.

۶- Mc-2, 595 مهار کننده پمپ سودوموناس آئروژینوزا در افلوکس لوفلوکسازین می باشد.

۷- Mc-4, 124 باعث مهار افلوکس در باکتریهای گرم منفی و همچنین باعث مهار سیستم AcrAB می شود.

۸- Mc-51. 5. and 51 یک فرآورده طبیعی بوده که سبب مهار پمپهای MexAB می شود.

۹- cptc-13 یک مهار کننده رقابتی تتراسایکلین می شود.

۱۰- Uk - 57562 عامل تخریب کننده غشاء می باشد.

۱۱- INF-392 سینرژزی با اتیدیوم بروماید و سپیروفلوکسازین در سویه های باسیلوس سوبتیلیس و استاف اورئوس دارد و سبب مهار پمپ NorA در استافیلوکوکوس اورئوس می شود (۱،۲،۱۰،۱۱،۱۲)

سبب ایجاد مقاومت سطح بالای معنی داری در باکتریهای گردند. همچنین به دلیل کاهش غلظت موثر آنتی بیوتیک در موضع عمل سبب به وجود آمدن سویه های جهش یافته مقاوم به آنتی بیوتیک می گردند.

به طور کلی از اهمیت افلوکس پمپها می توان موارد ذیل را نام برد :
۱- باعث دفع داروها و مواد شیمیایی می شود.

۲- سبب دفع متابولیتها و توکسینها ی باکتریایی می شود.

۳- سبب حفاظت میکروارگانیزم از آنتی بیوتیک، مواد شیمیایی، توکسین و استرس می شود.

۴- سبب بقاء میکروارگانیزم در محیطهای مختلف می شود . در نایسریا گونوره Mtr باعث می شود که باکتری در مخاط رکتوم زنده بماند چون باکتری با این سیستم فسفولیپیدهای مدفوعی را دفع می کند .

۵- در تهیه مواد برای ساختار سطحی باکتری نقش دارد . در MsbA , E-coli در حرکت لیپید A از غشاء داخلی به غشاء خارجی نقش دارد
۶- در بالانس محلولها و هموستازی تعادل یونی نقش دارد . TetL در باسیلوس سوبتیلیس و TetK در استافیلوکوکوس اورئوس کاتیونهای مونوالانت سدیم و پتاسیم را انتقال می دهند .

۷- افلوکس پمپهای آنتی بیوتیکی به خاطر تنوع و وسیع سوبستراهایی که شناسایی می کنند و بیان آنها در پاتوژنهای مهم و همراهی و اثر سینرژسمی آنها با مکانیسمهای دیگر مقاومت حائز اهمیت هستند. (۱۰، ۵، ۲، ۱) بنابراین، سیستمهای دفع دارویی اهمیت زیادی در ایجاد مقاومتهای دارویی پیدا می کنند و لازم است که مانند سایر مکانیسمهای مقاومت دارویی راهکاری برای مقابله با افلوکس دارویی بیابیم.

روشهای مهار افلوکس چند دارویی :

۱- داروهایی طراحی شوند که بازدهی کمی برای افلوکس پمپ داشته باشند .

۲- درمان ترکیبی با دارو

۳- افزایش نفوذپذیری غشاء خارجی در باکتریهای گرم منفی

شیوه های مهار افلوکس پمپها

۱- شناسایی مهار کننده علیه پمپ ویژه مسئول افلوکس (NorA) که نورفلوکسازین را شناسایی می کند).

۲- شناسایی طیف وسیعی از مهار کننده که پمپهای چند گانه و یا

**REFERENCES:**

1. T.kohler, et al. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance, *CMLS.cell.Mol.life sci*, (1999) 56:771-778
2. Françoise van Bambeke, et al. Antibiotic efflux pumps, *Biochemical pharmacology*, (2006): 457-47.
3. Marc Ouellette, et al.. Microbial multidrug resistance, *International journal of Antimicrobial agents*, (1997) 8: 179-187
4. Paul L. Skatrud. The impact of multiple drug resistance (MDR) proteins on chemotherapy and drug discovery, *Progress in Drug Research*, (2002): 12-127
5. Keith Poole, Ramakrishnan. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanism and clinical significance, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, (2001) 44: 59-71
6. Paulsen, et al.. Comparative genomics of microbial drug efflux systems, *JMOL Microbiol. Biotechnol*, (2001) 3:145-15.
7. Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance, *Antimicrob Agent Chemother*, (1992) 36: 694- 703
8. BORGES-WALMSLEY MI, WALMSLEY. The structure and function of drug pumps, *Trends Microbiol*, (2001): 71-79
9. Putman M, et al.. Molecular properties of bacterial multidrug transporters, *Microbiol Mol Biol Rev*, (2000) 64: 672- 693
10. Keith Poole, Efflux – Mediated Resistance to fluoroquinolones in Gram negative Bacteria, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, (2002): 2233-2241
11. Thilo Kohler Mehr Mischea – Hamzehpour, et al. Characterization of MexEF- oprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular Microbiology*, (1997)23:345-354
12. May D.Lee, et al. Microbial fermentation derived inhibitors of efflux- pump – mediated drug resistance, *IL Farmaco*, (2001): 81-85

Antibiotic Efflux pumps

*SH. N. Peerayeh¹, D. Esmaeili²

Abstract :

Background: Efflux is the process in which bacteria transport compounds outside the cell which are potentially toxic, such as drug or chemicals or compounds.

Materials and methods: For this review article by using key words: multidrug resistance, microorganisms, efflux pumps, resistance mechanism we have assessed 12 articles in journals published during 1997-2002

Results: Multidrug efflux systems endow on bacterial cells the ability to limit the access of antimicrobial agents to their targets. By actively pumping out antibiotic molecules, these systems prevent the intra cellular accumulation necessary for antibiotics to exert their lethal activity. Drug efflux appears to be one of the most widespread antibiotic resistance mechanisms among microorganisms, since it has been demonstrated to occur in many Gram positive and Gram-negative bacteria including medically important species like staphylococci, streptococci, enterobacteria and opportunistic pathogens like *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial antimicrobial efflux transporters have generally been grouped into five superfamily. These include the major facilitator superfamily (MFS), the ATP-binding cassette family, the resistance – nodulation – division (RND) family, the small multidrug resistance (SMR) and multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family.

Conclusion: Efflux pumps can be specific for only one substrate or accommodate a more or less wide range of noxious products.

Key word : efflux pumps, microorganisms, multidrug resistance, resistance mechanism.

1- (*corresponding author) Assistant professor, department of bacteriology, medical school, Tabriz University.

2- M.Sc, Department of bacteriology, school of medical, Tabriz University.