

Antibiyotik Direncinde Dışa Atım Sistemlerinin ve Dirençle Mücadelede Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin Önemi

The Importance of Efflux Systems in Antibiotic Resistance and Efflux Pump Inhibitors in the Management of Resistance

Abdurrahman AYGÜL

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
Ege University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 22.10.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.01.2015

ÖZ

En son tanımlanan direnç mekanizması olan aktif dışa atım (efflux) olayı, bakterilerde kazanılmış antibiyotik direncinin önemli nedenlerinden birisidir. Ökaryotik ve prokaryotik tüm hücre tiplerinde bulunan, hücre membranına yerleşmiş pompa proteinleri olan dışa atım sistemleri, ekzojen ve endojen kaynaklı çeşitli maddelerin hücre dışına atımından sorumludur. Bakteriyel pompa proteinleri; ATP Binding Cassette (ABC), Major Facilitator (MFS), Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE), Resistance - Nodulation - Division (RND) ve Small Multidrug Resistance (SMR) olmak üzere beş süper aile içerisinde gruplandırılmıştır. Dışa atım pompaları bazı patojenlerde antibiyotiklere karşı doğal dirençte rol oynarlar. Bu pompalar ayrıca, aşırı eksprese olarak ve diğer direnç mekanizmalarına katkı sağlayarak kazanılmış dirence neden olurlar. Dahası, dışa atım pompaları doğrudan veya dolaylı yollarla bakterilerin virülans özelliklerini kuvvetlendirebilirler. Dolayısıyla, dışa atım kaynaklı direncin önüne geçilebilmesi veya dirençli bakterilerin yeniden duyarlı hale getirilebilmesi için, geleneksel antibiyotiklerle kombine edilerek kullanıma sunulabilecek potansiyel pompa inhibitörleri, dirençle mücadelede ilgi çekici araştırma alanlarından birisidir. Bakteriyel pompa sistemlerini inhibe ettiği bilinen bazı bileşiklere örnek olarak; fenil-arjinin beta-naftilamid (PAβN), INF271, INF55, karbonil siyanid *m*-klorofenil hidrazon (CCCCP), rezepin, 1-(1-naftilmetil) piperazin (NMP), birikodar, timkodar, verapamil, milbemis, klorpromazin, paroksetin ve omeprazol verilebilir. Ancak özellikle toksisite problemlerinden dolayı, henüz klinik kullanımı olan bir pompa inhibitörü yoktur. Buna rağmen, dışa atım pompa inhibitörlerinin toksisitesi kabul edilebilir düzeyde olan etkili türevleri, önümüzdeki dönemlerde antibakteriyel formülasyonlara girebilir. Ayrıca endüstriyel ve akademik alanda faaliyet yürüten pek çok araştırmacı tarafından, pompa inhibisyonu özelliği keşfedilen doğal ve sentetik kaynaklı pek çok bileşik rapor edilmektedir. Bu çerçevede, patent başvuru örnekleri de olan çeşitli antibiyotik türevi (tetrasiklin, aminoglikozit ve florokinolon analogları) ve antibiyotik dışı bile-

İletişim (Correspondence): Ecz. Abdurrahman Aygül, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye.
Tel (Phone): +90 232 311 3283, E-posta (E-mail): abdurrahmanaygul@gmail.com

şikler (indol, üre, aromatik asit, piperidin-karboksilik asit, kinolin türevleri ve peptidomimetikler) sıklıkla çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarla, pompa inhibitörlerinin bazı antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu derleme yazıda, bakterilerdeki dışa atım pompalarının yapıları ve işlevleri özetlenmiş, doğal ve sentetik kaynaklı dışa atım pompa inhibitörleri genel anlamda değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Aktif dışa atım; dışa atım pompa inhibitörleri; antibiyotik direnci; fenil-arjinin beta-naftilamid; rezerpin.

ABSTRACT

The process of active efflux, the last described resistance mechanism in bacteria, is one of the important factors of acquired antibiotic resistance. Efflux systems which consist of membrane-located pump proteins that exist in all eukaryotic and prokaryotic cells, are responsible for extrusion of the various exogenous and endogenous substances. Bacterial pump proteins, namely *ATP Binding Cassette* (ABC), *Major Facilitator* (MFS), *Small Multidrug Resistance* (SMR), *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) and *Resistance - Nodulation - Division* (RND) are grouped in five super families. Efflux pumps play a role in intrinsic resistance against antibiotics among some pathogens. Besides, pumps give rise to acquired resistance by over-expression and contribute to other resistance mechanisms. Furthermore, pumps can directly or indirectly intensify the virulence properties of bacteria. Thus, for inhibition of efflux-mediated resistance or conversion of resistant bacteria to the susceptible phenotype, potential pump inhibitors combined with traditional antibiotics is one of the research areas of interest in the fight against resistance. There are some compounds known to inhibit bacterial pump systems, such as phenyl-arginine beta naphthylamide (PAβN), INF271, INF55, carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP), reserpine, 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP), biricodar, timcodar, verapamil, milbemycin, chlorpromazine, paroxetine and omeprazole. However, particularly due to the toxicity problems, there has been no clinical use of a pump inhibitor yet. Nevertheless, in the upcoming period, derivatives of efflux pump inhibitor compounds with acceptable level of toxicity and efficacy may be included in antibacterial formulations. Additionally, a number of natural and synthetic compounds with pump inhibition activity are reported by many researchers in industrial and academic areas. In this context, various antibiotic derivatives (tetracycline, fluoroquinolone and aminoglycoside analogs) or non-antibiotic compounds (indole, urea, aromatic acid, piperidine-carboxylic acid, quinoline derivatives and peptidomimetics), some of which already have patent applications, are often studied. Pump inhibitors are shown to reduce the minimum inhibitory concentration (MIC) values of various antibiotics in some studies. In this review article, the structure and functions of bacterial efflux pumps have been summarized and the efflux pump inhibitors with natural and synthetic origins have been evaluated.

Keywords: Active efflux; efflux pump inhibitors; antibiotic resistance; phenyl-arginine beta-naphthylamide; reserpine.

GİRİŞ

Antimikrobiyal direnç, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların etkin tedavisine karşı giderek büyüyen bir tehdit oluşturmaktadır. Geleneksel antimikrobiyal-ler, patojenik mikroorganizmalarda çoklu ilaç direncinin ortaya çıkışından olumsuz bir şekilde etkilenmektedirler. Özellikle, etken olarak sıklıkla karşılaşılan bakterilerdeki antibiyotik direnci kaygı verici boyutlardadır¹⁻³. Antibiyotiklerin kısa bir süre içerisinde işlevsiz kalacağı, enfeksiyonların önlenmesi ve tedavi edilmesinin imkansız hale geleceği, klasik enfeksiyonların önemli mortalite nedenlerinden birisi olarak yeniden karşımıza çıkacağı gibi endişeler sık sık gündeme gelmektedir³.

Bakterilerde kazanılmış antibiyotik direncine neden olduğu bilinen mekanizmalar üç ana başlık altında değerlendirilebilir. Bunlar; (1) antibiyotiğin hedefi olan yapının/ mekanizmanın değişimi, (2) bakteri tarafından salgılanan bazı enzimlerin antibiyotiği inaktif hale getirmesi ve (3) antibiyotik konsantrasyonunun bakteri hücresi içerisinde yeterli seviyelere ulaşmamasıdır. Bu üçüncü problem iki şekilde ortaya çıkabilmektedir. İlk olarak, bakteri hücre membranının porin kaybına uğramasıyla geçirgenliği azalmakta ve böylelikle ilaç hücre içerisine yeterince girememektedir. Diğer mekanizmada ise, dışa atım pompalarının aşırı eksprese olması ve böylelikle etkin bir şekilde içerideki ilacı dışarıya atması söz konusudur⁴⁻⁷.

Antibiyotik direnci sorunu, mevcut antibiyotiklerin modifiye edilmesi ve aynı zamanda yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır⁸. Diğer taraftan, üniversitelerde ve biyoteknoloji/ilaç şirketlerinde araştırmacılar tarafından birtakım alternatif tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır⁹. Bunlar arasında antimikrobiyal peptidler, bakteriyofajlar ve lizinler, terapötik antikolar, yeni tekniklerle üretilip denenilen aşular, bakterinin virülans faktörlerini hedef alan antivirülans yaklaşımlar, gram-negatif bakterilerin lipopolisakkarit (LPS) tabakasını hedef alan LPS inhibitörleri, biomedikal ürünlerin antibakteriyel özellikte olanlarının geliştirilmesi, metallo-antibiyotikler ve pratikte klinik olarak kullanımı mevcut β -laktamaz inhibitörleri ile üzerinde çalışılan dışa atım pompa inhibitörlerinin adjuvan olarak kullanımı sayılabilir^{8,9}. Bu gibi yaklaşımlar içerisinde, dışa atım (efflux) pompası mekanizmasını inhibe edebilen pompa inhibitörlerinin, antibiyotik duyarlılığını yeniden sağlayabildikleri pek çok deneysel araştırmada gösterilmiş olduğundan umut verici bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır^{1,10-12}.

DIŞA ATIM POMPALARI

Hücre membranı boyunca, hücre içi ve hücre dışı ortam arasında madde taşınması pasif (enerjiden bağımsız) veya aktif (enerjiye bağımlı) olarak gerçekleşir. Pasif taşınma kendi içinde basit difüzyon ve kolaylaştırılmış difüzyon (kanal aracılı ve taşıyıcı aracılı) olarak, aktif taşınma ise kendi içinde aktif transport (primer ve sekonder aktif transport) ve veziküller aracıılığıyla transport (endositoz, ekzositoz ve transsitoz) olarak gruplandırılabilir¹³. Bakteriyel dışa atım pompalarının bir kısmı primer, çoğunluğu ise sekonder aktif transport grubuna dahildir^{4,14-16}.

Dışa atım pompaları, ekzojen veya endojen kaynaklı çeşitli maddelerin hücre dışına atımından sorumlu membran transport proteinleridir. Bakterilerden ökaryotik hücrelere kadar tüm canlı hücrelerde bulunurlar. Bunların bir kısmı (örneğin TetA ve CmlA) substrat bakımından tek bir bileşiğe özgü iken çoğu pompa sistemi (örneğin MexAB-OprM, NorA ve BmrA) çeşitli yapılarda birden fazla bileşiği tanıyabilir. Bu bileşiklere örnek olarak biyosidler, deterjanlar, dezenfektanlar, antimikrobiyal peptidler, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar ve çeşitli antibiyotikler verilebilir¹⁷⁻²².

Tüm bakteriyel genlerin yaklaşık %5-10'unun transportta rol aldığı ve bunların da büyük bir kısmının dışa atım pompalarını kodladığı tahmin edilmektedir¹⁹. Bakterilerdeki çoklu ilaç dışa atım sistemlerinin hemen hemen tamamı kromozomal olarak kodlanır. Pek çok örnekte bu sistemlerin, regülatör genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu

ekspres edildikleri gözlemlenmiştir. Buna paralel olarak bakteriler, dışarıdan ilgili gen determinantlarını edinmeksizin çoklu ilaç direnci geliştirebilmektedirler. Tek bir ilaca özgü pompalar ise genellikle plazmidler veya hareketli genetik elemanlar aracılığıyla kodlanırlar^{21,23}.

Dışa Atım Pompalarının Yapısı


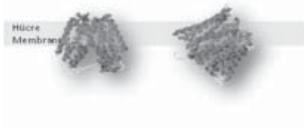


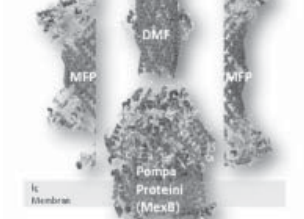
Dışa atım sistemleri bakteri hücre duvarının yapısına göre farklı şekillerde organize olur. Gram-pozitif bakterilerde hücre membranındaki tek bir pompa proteini dışa atımı gerçekleştirirken, gram-negatif bakterilerde bu işlevden aynı şekilde tek bir pompa proteini ya da üç parça proteinden oluşan pompa sistemi sorumludur^{20,24}. Üç parçalı bu sistem; (a) hücre membranına yerleşmiş bir transport proteini olan dışa atım pompa proteini, (b) dış membran faktörü (outer membrane factor; OMF) veya dış membran kanalı (outer membrane channel; OMC) olarak adlandırılan dış membrana yerleşmiş bir kanal proteini ve (c) iki protein arasında kesintisiz bağlantı sağlayan periplazmik membran füzyon proteininden (membrane fusion protein; MFP) oluşur¹. Tek parçalı dışa atım proteinleri, antibiyotiği sitoplazmadan periplazmik aralığa atar; bunlar tanıdıkları substrat çeşitliliği açısından dar spektrumludurlar. Üç parçalı dışa atım sistemleri ise antibiyotiği sitoplazmadan dış ortama aktarır; bunlar geniş spektrumda substratı tanıyabildiklerinden çoklu ilaç direncine yol açarlar²³⁻²⁵.

Dışa atım pompalarının gruplandırılması genel olarak, yapıları, kullandıkları enerji kaynakları, substratları, membran boyunca katlanma sayıları ve gen dizisi benzerlikleri dikkate alınarak yapılmaktadır^{10,15,17,26}. Pek çok kaynakta bakteriyel pompa proteinleri beş süper aile içerisinde gruplandırılmıştır. Bunlar; (1) *ATP-Binding Cassette* (ABC), (2) *Major Facilitator* (MFS), (3) *Multidrug and Toxic compound Extrusion* (MATE), (4) *Resistance-Nodulation-Division* (RND) süper aileleri ve (5) *Small Multidrug Resistance* (SMR) ailesidir (Tablo I)^{1,15,24}. SMR ailesi, *Drug Metabolite Transporter* (DMT) süper ailesine dahil olan bir gruptur. RND tipi pompa proteinleri yalnızca gram-negatif bakterilerde bulunurken, diğerlerine hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilerde sıkça rastlanır. MFS tipi pompa proteinleri sekonder aktif transport sistemleri içerisindeki en büyük gruptur. Pompaların işlevsel olabilmesi için genellikle en az 12 transmembran segmentine sahip olması gerektiğinden, SMR grubu pompa proteinleri muhtemelen trimerler şeklinde organize olmaktadır^{1,10,11,16,17,23,24,26-30}.

Dışa Atım Pompalarının İşlevleri ve Antibiyotik Direncine Katkısı

En son tanımlanan direnç mekanizması olan dışa atım pompaları, ilk olarak 1976'da memeli kanser hücrelerinde bulunan P glikoproteininin kanser ilaçlarına karşı dirence neden olduğunun saptanmasıyla gün yüzüne çıkmıştır. Çok geçmeden, 1980'de *Escherichia coli*'de tetrasiklin direncine yol açan bir pompa (Tet proteini) rapor edilerek prokaryotlarda da var oldukları ortaya konulmuştur. Bu tarihten itibaren yapılan çalışmalar sonucunda, günümüzde çeşitli bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı dışa atım aracılı direnç gelişimi olduğu bilinmektedir ve bu mekanizma direnç sorununun önemli nedenlerinden birisidir^{11,22-24,31}. Dışa atım aracılı çoklu ilaç direnci, gram-negatif patojenlerde daha sık gözlenmekte, gram-pozitif patojenlerin klinik izolatlarında da giderek artan oranlarda rastlanmaktadır³².

Tablo 1. Bakteriyel Dışa Atım Pompa Proteinlerinin 3B Kristal Yapıları^a ve Genel Özellikleri^{1,15,24}

	Süper Aile Grubu	Örnek Protein/İlgili Bakteri (PDB No)	3B Yapı ^b	Topoloji ve Mekanizma
Primer taşıyıcı	ABC	MsbA/ <i>E.coli</i> (3B5W)		12 segmentli (6 TMS, 6 internal ATP-bağlayıcı bölge)
				ATP'ye bağımlı transport
Sekonder taşıyıcı	MFS	LacY ve YbgH/ <i>E.coli</i> (sırasıyla 1PV6, 4Q65)		Sol: 12 TMS'li Sağ: 14 TMS'li
	MATE	NorM/ <i>Vibrio cholerae</i> (3MKU)		12 TMS'li
	SMR	EmrE/ <i>E.coli</i> (3B61)		4 TMS'li
	RND ^c	MexB/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2V50)		12 TMS'li

^a Kristal yapılar, RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank)'den elde edilmiştir.

^b Membran yapıları ve pompa proteinlerinin birbirlerine göre konumu tam olarak bilinmemekle birlikte, tablodaki membranları temsil eden yapılar tahmini olarak konumlandırılmıştır.

^c Görsel bütünlük açısından, RND grubundaki Membran Füzyon Proteini (MFP), alt ünitelerinin birbirlerine göre konumu gözlemlenmemiştir, uzun aksisi boyunca ikiye ayrılmış olarak verilmiştir.

PDB No: Protein Data Bank Erişim Numarası; TMS: Transmembran segmenti; DMF: Dış Membran Faktörü; MFP: Membran Füzyon Proteini

Dışa atım pompaları pek çok substratı ve dolayısıyla antibiyotiği tanıyabilirler. ABC tipi pompalar tetrasiklinler, florokinolonlar, aminoglikozidler, makrolidler, rifampisin, kloramfenikol ve linkozamidleri; MFS tipi pompalar bu antibiyotiklere ek olarak pristinamisin; RND tipi pompalar ise β -laktamlar, sülfonamidler ve fusidik asidi tanırlar. SMR tipi pompalardan en çok etkilenen antibiyotikler ise tetrasiklinler, eritromisin ve sülfadiyazindir. Tüm süper aileler içerisinde, etkinlik açısından düşünüldüğünde, RND tipi pompalar en geniş protein ve substrat çeşitliliğine sahip olan gruptur^{1,16}.

Tek başına değerlendirildiği zaman, dışa atım mekanizmasının bakterilerdeki antibiyotik direncine katkısı düşük veya orta düzeydedir^{7,11,16}. Ancak klinik olarak önemli bir direnç mekanizması olmasının nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

Doğal direnç: Dışa atım sistemlerinin bir kısmı, regülatör genlerin uyarımı veya bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu eksprese edilirler. Bazı pompa genleri ise bazal seviyelerde sürekli olarak eksprese edilirler; doğal direncin (özellikle gram-negatif bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı olan doğal direnç) önde gelen nedenlerinden birisi budur^{19,33,34}. Yapılan çeşitli çalışmalarda, sırasıyla AcrB-TolC ve AcrAB pompa sistemlerinden yoksun mutant *E.coli* ve *Haemophilus influenzae*'nin makrolidlere karşı; MexAB-OprM pompa sisteminden yoksun *Pseudomonas aeruginosa*'nın β -laktam, kloramfenikol, florokinolonlar ve tetrasiklinlere karşı; MdrL pompa sisteminden yoksun *Listeria monocytogenes*'in sefalosporinlere karşı doğal dirence ya da zayıf bir duyarlılığa sahipken, oldukça duyarlı hale geldikleri gözlemlenmiştir³³⁻³⁵.

Bir dışa atım sisteminin aşırı ekspresyonu: Klinik önemi yüksek pek çok patojende aşırı eksprese edilen muhtelif pompa sistemlerinin, tetrasiklinler, makrolidler, florokinolonlar, aminoglikozitler, penisilinler, amfenikoller gibi sık kullanılan çeşitli antibiyotik gruplarına karşı azalmış duyarlılık, hatta kazanılmış veya doğal direnç nedeni oldukları bilinmektedir. Mikobakterilerden *Mycobacterium tuberculosis*, gram-negatif bakterilerden *Salmonella enterica*, *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* spp., *Serratia marcescens*, *H. influenzae*, *Helicobacter pylori*, gram-pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* bunlara örnek olarak verilebilir^{1,7,17,23,33,36,37}. Birçok kaynakta dışa atım aracılı direnç, patojen/pompa sistemi/antibiyotik ilişkisi çerçevesinde, tablolar halinde işlenmiştir^{1,7,11,23,24,33,35}.

Çeşitli dışa atım sistemlerinin aynı anda eksprese edilmesi: Farklı tipte pompa kombinasyonlarının çeşitli antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerine etkisi, yapılan bazı çalışmalarla karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur^{7,21}. *P.aeruginosa* kökenlerinin kullanıldığı bir çalışmada, iki farklı çoklu, iki farklı tekli ve bir çoklu bir tekli pompa proteinini aynı anda eksprese edenler olmak üzere mevcut izolatlar üç gruba ayrılmıştır. Aynı tip pompaları eksprese eden suşlar incelendiğinde (üç parçalı MexAB-OprM ve MexCD-OprJ eksprese edenler), levofloksasin MİK değerlerine katkısı açısından bu pompaların herhangi birinin ekspresyonu ile her ikisinin aynı anda ekspresyonu önemli bir farklılık göstermemiştir. Farklı tipte pompaları eksprese eden suşlar (üç parçalı AcrAB-TolC ve tek parça CmlA eksprese edenler) incelendiğinde ise, her iki pom-

panın aynı anda ekspresyonunun kloramfenikol MİK değerlerinde meydana getirdikleri artış (> 256 µg/ml) ayrı ayrı etkilerinin toplamından (32-64 µg/ml) en az 4 ila 8 kat daha fazla bulunmuştur. *E.coli*, *P.aeruginosa* gibi patojenlerin klinik izolatlarındaki yüksek düzey kloramfenikol direncinin nedenleri incelendiğinde, bu sonuçları destekler nitelikte bulgulara erişilmiştir. Bu durum, farklı yapıdaki pompaların dışa atım mekanizmaları da kısmen farklı olduğundan, aynı anda ekspresyonları halinde ortaya çıkan toplam etkinliğin normalden daha fazla olduğunu düşündürmektedir^{7,21}.

Diğer direnç mekanizmalarıyla sinerjik etki: Bakteriler yüksek düzeyde antibiyotik direnci kazanmak için genellikle birkaç direnç mekanizmasının sinerjik olarak etkileşiminden yararlanırlar²⁵. Örneğin, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında kullanılan florokinolonlara karşı anlamlı seviyelerde bir direnç gelişiminden söz edebilmek için topoizomerazları kodlayan genlerde mutasyonun yanı sıra bakteriye özgü dışa atım sistemlerinin aşırı ekspresyonu da gerekmektedir. Pratikte, bu iki mekanizmanın ayrı ayrı neden olduğu MİK artışı öngörülen kritik noktaları aşmamakta ve dolayısıyla klinik seviyelerde bir direnç gelişimine neden olmamaktadır¹². Ayrıca gram-negatif bakterilerde hücre duvarı zorlu bir bariyer teşkil ettiği için, dışa atım sistemlerinin de katkısıyla, antibiyotik direnci ortaya çıkmaktadır. *P.aeruginosa*'daki doğal penem direnci dış membran bariyeri, AmpC β-laktamaz ve MexAB-OprM dışa atım sisteminin ortak katkıları sonucu oluşmaktadır. Benzer örnekler arasında *A.baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia* spp. de sayılabilir. Diğer taraftan *E.coli*'de sınıf-C β-laktamazlar birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere, AcrB pompa proteini ise penisilinlere dirençte rol oynamakta, sonuçta muhtemelen her iki mekanizmanın da katkısıyla, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere direnç görülmektedir^{7,25,35}.

Dışa atım sistemlerinin bakteri virülansına etkisi: Mevcut veriler dahilinde yeterli bilgi olmasa da, dışa atım sistemlerinin ekspresyonu ile biyofilm oluşturma ve çoğuluğu algılama (quorum sensing) arasında birbirini destekler bir ilişki olduğu düşünülmektedir. *E.coli*, *L.monocytogenes* gibi patojenlerle yapılan bazı çalışmalarda, kendilerine özgü pompa proteinlerini kodlayan genlere sahip mutantların, biyofilm oluşturma kapasitelerinde ciddi bir artış görülmüştür. Bu genlerden yoksun mutantlar içinse tam tersi bir durum söz konusudur²⁶. Diğer taraftan kendilerine özgü pompa sistemlerinden yoksun *Salmonella typhimurium*'un (AcrB mutanı) makrofajlara invazyonunun ve *P.aeruginosa*'nın (MexAB-OprM mutanı) hücre kültürü ortamındaki hücreleri enfekte etme yeteneğinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca, *H.pylori*'nin CznABC metal pompasının üreaz modülasyonu ve gastrik kolonizasyonda, *N.gonorrhoeae*'nin MtrCDE sisteminin ise idrar yolu enfeksiyonlarında rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir¹. Bunun yanı sıra sideroforlar ve quorum sensing sinyal proteinleri (örneğin, N-açıl homoserin lakton) gibi bakteri açısından kritik öneme sahip hücre üretilenler, sitoplazmada sentezlenip dışa atım aracılığıyla dış ortama gönderilmektedir. Buna en iyi örneklerden biri de, enterotoksijenik *E.coli* (ETEC)'nin ısıya dirençli toksininin (enterotoksin-II) MacAB-TolC sistemiyle dış ortama salgılanmasıdır. Dolayısıyla, bu türden moleküllerin bakteri açısından önemi düşünüldüğünde, pompaların üstlendiği fizyolojik rollerin, bakterinin virülansına önemli katkıları olduğu anlaşılmaktadır^{1,7}.

DIŞA ATIM ARACILI DİRENCİN İNHİBİSYONU

Dışa atım aracılı direncin önüne geçilebilmesi veya dirençli kökenlerin yeniden duyarlı hale getirilebilmesi için takip edilebilecek yöntemler genel olarak üç başlık altında incelenebilir^{5,11}:

1. Pompa mekanizmasını atlatma

Dışa atım pompalarının, aynı antibiyotik grupları içindeki ajanlara, mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da, farklı oranlarda duyarlı oldukları gözlenmektedir. Genellikle bir grup içerisindeki yeni nesil ajanlar, eskilere kıyasla dışa atım pompalarının daha düşük oranlarda tanınmakta ve böylece dışa atımdan daha kolay kaçabilmektedirler. Örneğin, 3. ve 4. nesil kinolonlar 1. ve 2. nesil kinolonlara, ketolidler makrolidlere, glisilsiklinler tetrasiklinlere kıyasla daha düşük oranlarda dışa atım pompalarının hedefi olmaktadır. Dolayısıyla eski gruplar üzerinden yeni antibiyotik tasarımında direnç mekanizmalarını da göz önünde bulundurmaya faydalı olacaktır^{5,11,23}.

2. Dışa atımın biyolojik inhibisyonu

Biyolojik olarak inhibisyona dair fikirler iki noktada yoğunlaşmaktadır. Bunlardan ilki antisens oligonükleotidler, siRNA'lar veya daha farklı antisens moleküllerle regülasyon aşamasında pompaların ekspresyonunun önüne geçilmesidir. Bu uygulamaya, "Methods of reducing microbial resistance to drugs" adıyla patenti alınmış (yayınlanma numarası: US 20110301127 A1), *E.coli*'nin AcrAB dışa atım sistemini hedef alan bir yöntem örnek olarak verilebilir. Diğer bir yaklaşım ise, pompalara özgü antikorların kullanılmasının yararlı olabileceği şeklindedir^{5,11}.

3. Dışa atımın farmakolojik inhibisyonu

Daha geniş olarak çalışılan bu yöntem, muhtelif mekanizmalarla etkinlik gösteren dışa atım pompa inhibitörleri kullanılarak, aktif dışa atımın inhibisyonu prensibine dayanmaktadır^{5,11,23}. Pompaların farmakolojik inhibisyonuna dair bazı mekanizmalar öngörülmektedir. Yukarıdaki yöntemlerde değinilen regülasyon aşamasında inhibisyon ve uygun antibiyotik tasarımıyla pompayı atlatma seçeneklerinin dışında; pompa sisteminin enerjisini kesme, yarışmalı veya yarışmasız pompa inhibitörlerini kullanarak asıl etkinliğe sahip olan antibiyotiği pompadan gizleme, gram-negatiflerdeki üç parçalı sistemin işlevsel bir şekilde bir araya gelişinin önüne geçilmesi veya dış membran faktörünün bloke edilmesi gibi mekanizmalarla dışa atımın inhibisyonu mümkün olabilir^{11,27,38}.

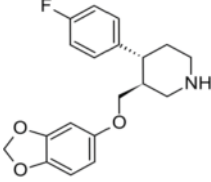
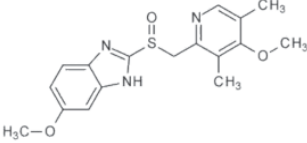
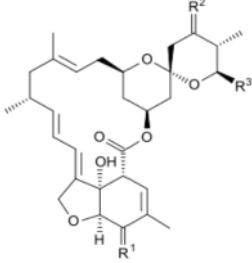
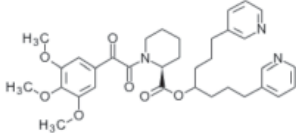
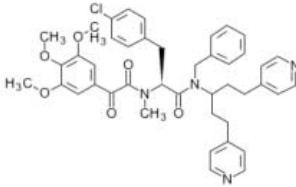
Dışa Atım Pompa İnhibitörleri

Günümüzde, çoğunluğu doğal veya sentetik kaynaklı moleküllerden yola çıkılarak geleneksel tarama yöntemleriyle rastgele keşfedilen çeşitli bileşiklerin, dışa atımı inhibe etme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (Tablo II)^{1,10,11}. Örneğin PAβN ve NMP gibi pompa inhibitörü bileşiklerin, dirençli gram-negatif bakterilerdeki siprofloksasin MİK değerlerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda; PAβN'nin *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *A.baumannii* klinik izolatlarında, NMP'nin ise *E.coli* ve *K.pneumoniae* klinik izolatlarında siprofloksasin MİK değerlerinde belirgin azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir^{39,40}. Benzer şekilde, çeşitli

Tablo II. Bakteriyel Dışa Atım Sistemlerine Etkili Olduğu Bilinen Pompa İnhibitörleri^{1,10,11}

Sınıf	İnhibitör	Kimyasal formül	Etkin olduğu bakteriler/ dışa atım sistemleri
Peptidomimetikler	PAβN (Fenil-arjinin beta naftilamid) (MC-207,110)		Gram-negatifler/RND
	INF271 (BLT-4)		Gram-pozitifler/MFS
	INF55		Gram-pozitifler/MFS
Proton İyono- forları (Enerji Dekuplörleri)	CCCP (Karbonil siyanid m-klorofenil hidrazon)		Gram-negatifler, mikobakteriler/RND, MFS, MATE
Alkaloidler	Rezerpin		Gram-pozitifler/ MFS, ABC
Piperazin türevleri	NMP (1-(1-naftilmetil) piperazin)		Gram-negatifler/RND
Ca ⁺ antagonistleri	Verapamil		Gram-negatifler, mikobakteriler/MFS, ABC
Fenotiyazinler	Klorpromazin^a		Gram-pozitifler, mikobakteriler/ABC, SMR

Tablo II. Bakteriyel Dışa Atım Sistemlerine Etkili Olduğu Bilinen Pompa İnhibitörleri^{1,10,11} (devamı)

Sınıf	İnhibitör	Kimyasal formül	Etkin olduğu bakteriler/ dışa atım sistemleri
Selektif serotonin geri alım inhibitörleri	Paroksetin		Gram-pozitif ve negatifler/MFS, RND
Proton pompa inhibitörleri	Omeprazol		Gram-pozitifler/MFS
Makrolid türevleri	Milbemisin		Gram-pozitif ve negatifler/ABC
Piperidin - karboksilik asit türevleri	Birikodar (VX-710)		Gram-pozitif ve negatifler/MFS, ABC
	Timkodar (VX-853)		Gram-pozitif ve negatifler/MFS, ABC

^a Hangi süper aileye etkinlik gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Tabloda verilmiş olanlar tahminidir.

antibiyotiklere dirençli bakteriler üzerinde çeşitli inhibitör bileşikler denenerek yapılmış pek çok araştırma vardır^{6,41,42}.

Toksinite ve stabilite problemlerinden dolayı klinik kullanıma uygun pompa inhibitörü+antibiyotik kombinasyonlarının henüz bir örneği olmasa da, pek çok araştırmacı

tarafından çalışılan mevcut inhibitörlerin türevlerinin veya tamamen özgün moleküllerin bu durumu aşması muhtemeldir. Böylelikle antibiyotik etkinliğinin önemli ölçüde geri kazanılabileceği, dahası dirençli bakterilerin eliminasyonunun mümkün olabileceği düşüncesi yaygınlık kazanmıştır²⁷. Bu çerçevede, patent başvuruları yapılmış çeşitli antibiyotik türevleri (tetrasiklin, aminoglikozid ve florokinolon analogları) ve antibiyotik dışı bileşikler (indol, üre, aromatik asit, piperidin-karboksilik asit ve kinolin türevleri ile peptidomimetikler) yaygın olarak çalışılmaktadır. Şimdiye kadar klinik fazlarda deneme aşamalarına geçen tek örnek Mpex Pharmaceuticals'ın MP-601,205 kodlu bileşiğidir^{7,11}. Bilinen pompa inhibitörleri genel olarak; pompa sisteminin enerjisinin kesilmesi (proton gradientinden elde edilen enerjinin engellenmesi) ve direkt olarak pompanın blokajı (pompa substratlarının yarışmalı veya yarışmasız inhibisyonu) şeklinde iki ayrı mekanizma ile etkinlik gösterirler^{7,33}.

Son yıllarda yoğun olarak çalışılan dışa atım sistemlerinin ve potansiyel pompa inhibitörlerinin değerlendirilmesinde bazı basit in-vitro yöntemler sıklıkla tercih edilmektedir. Bunlara örnek olarak, bakterinin çoklu ilaç direncine sahip klinik izolatu, vahşi tipi ve aşırı pompa ekspresyonuna sahip mutant tipinin karşılaştırılması yöntemine dayanan klasik etidyum-bromür agar metodu ve gerçek zamanlı değerlendirme yapan ısı döngü cihazının kullanıldığı (Corbett Research 3000TM) otomatize etidyum-bromür metodu verilebilir⁴³. Değerlendirmenin in-vivo boyutu düşünüldüğünde ise, dikkat edilmesi tavsiye edilen bazı kriterler ön plana çıkmaktadır. Bu kriterler patojen ve konakçı organizma açısından olmak üzere iki başlık altında değerlendirilebilir:

1. Patojen organizmaya etkileri bakımından ideal bir pompa inhibitörü, pompaların substratı olan antibiyotiklerin etkinliğini artırmalı, pompaların substratı olmayan antibiyotiklerin etkinliğinde bir değişikliğe yol açmamalıdır. Buna paralel olarak inhibitör bileşikten, işlevsel pompa sisteminden yoksun suşlarda etkinlik göstermemesi beklenir. Ayrıca, ideal inhibitör, pompaların substratı olan maddelerin bakteri hücresinde birikimini artırmalı ve atımını azaltmalıdır. Son olarak, hücre içi ve hücre dışı proton yoğunluğu farklılığından kaynaklanan proton gradientini değiştirmemelidir^{26,44}.
2. Konakçı organizmaya etkileri bakımından ideal bir pompa inhibitörünün ise, öncelikle, ökaryotik hücrelerde herhangi bir farmakolojik etkisi olmamalıdır. Aksi takdirde özgüllüğünden bahsedilemez ve yan etkilere sebep olabilir. Diğer taraftan, maksimum özgüllük ve etkinlik gösterebilmesi için terapötik penceresi ve farmakokinetik profili geniş olmalıdır. Ayrıca, yüksek serum seviyelerine ulaşabilmesi ve hücrelerde yüksek oranlarda birikebilmesi için proteolitik açıdan stabil olmalıdır. Yüksek konsantrasyonlarda kullanılacağından toksik olmamalıdır. Son olarak, paradoksal bir şekilde çeşitli direnç mekanizmalarını tetikleyerek kendisine karşı direnç gelişimine neden olma ihtimali olduğundan, antibakteriyel etkinliği olmamalıdır⁷. Bazı kaynaklarda, ideal pompa inhibitörünün özgül olması gerektiği ile ilgili önerilere ters düşen yorumlar da vardır; bu noktada çift etkili (hem bakteri hem de memeli hücrelerinde etkili) bir inhibitörün birtakım avantajları olabileceği ifade edilmektedir^{45,46}. Çift etkili inhibitör, vücut hücrelerindeki pompaları da inhibe

ederek, kombine edilecek antibiyotiğin hücrel birikimini artıracaktır. Böylelikle antibiyotiğin daha düşük konsantrasyonlarda kullanımı mümkün olacak ve istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkma riski azalacaktır. Diğer taraftan, hücre içi patojenlerin eradikasyonu da hızlanacaktır. Ayrıca antibiyotiğin kan-beyin bariyeri geçirgenliği ve gastrointestinal sistemden emilimi artacaktır. Dolayısıyla bu tür olası etkiler, hem bakteri hücreindeki birikimini hem de vücuttaki fizyolojik seviyesini artırarak, antibiyotiğin etkinliğine önemli oranda katkı sağlayabilir^{45,46}.

SONUÇ

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde çığır açan antibiyotiklerin, kısa veya uzun vadede direnç gelişimine yenik düşmesi kaçınılmaz görünmektedir. Buna rağmen adjuvan ajanların kullanımıyla bu durum belirli ölçüde geciktirilebilir. Bu noktada dışa atım pompa inhibitörleri, potansiyel adjuvan terapötik ajanlar olarak tüm dünyada yoğun bir şekilde araştırılırken, konuyla ilgili ülkemizdeki çalışmalar henüz oldukça sınırlıdır. Uluslararası yoğun ilgiye rağmen henüz klinik kullanımda pompa inhibitörlerinin örneği olmaması, bir fırsat olarak görülebilir. Akademik kurumlarda ve ilaç endüstrisinde faaliyet yürüten kuruluşlarda, işbirliği içerisinde gerçekleştirilecek in-vitro, preklirik ve klinik çalışmalarla ülkemiz bu konuda öncülük edebilir. Ayrıca antibiyotik+beta laktamaz inhibitörü+dışa atım pompa inhibitörü şeklinde üçlü kombinasyonlar çok daha etkili sonuçlar verebilir.

TEŞEKKÜR

Bu derleme, daha fikir aşamasında iken beni cesaretlendiren ve yazım aşamasında teknik olarak katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Şafak Ermertcan'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

KAYNAKLAR

1. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 2009; 69(12): 1555-623.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Available at: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
3. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64 (Suppl 1): i29-36.
4. Denis O, Rodriguez-Villalobos H, Struelens MJ. The problem of resistance, pp: 24-48. In: Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ (eds), *Antibiotic and Chemotherapy*. 2011, 9th ed. Saunders, Elsevier, Edinburgh.
5. Ughachukwu P, Unekwe P. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. *Ann Med Health Sci Res* 2012; 2(2): 191-8.
6. Brincat JP, Carosati E, Sabatini S, et al. Discovery of novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *J Med Chem* 2011; 54(1): 354-65.
7. Bhardwaj AK, Mohanty P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2012; 7(1): 73-89.
8. Mandal SM, Roy A, Ghosh AK, Hazra TK, Basak A, Franco OL. Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Front Pharmacol* 2014; 5(5): 1-12.
9. Fernebro J. Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Resist Updat* 2011; 14(2): 125-39.

10. Tegos GP, Haynes M, Strouse JJ, et al. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. *Curr Pharm Des* 2011; 17(13): 1291-302.
11. Van Bambeke F, Pagès JM, Lee VJ. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2006; 1(2): 157-75.
12. Rouveix B. Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(6): 1208-9.
13. Tortora GJ, Derrickson B (eds). Transport across the plasma membrane, pp: 68-78. In: *Principles of Anatomy and Physiology*. 2012, 13th ed. John Wiley&Sons, USA.
14. Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie* 2005; 87(12): 1137-47.
15. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(4): 672-93.
16. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 2000; 60(4): 457-70.
17. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453(2): 254-67.
18. Pagès JM, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in gram-negative bacteria. *Trends Mol Med*. 2005; 11(8): 382-9.
19. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(1): 9-11.
20. Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 2002; 92(Suppl): 65S-71S.
21. Lomovskaya O, Watkins W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3(2): 225-36.
22. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(10): 1486-513.
23. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1):20-51.
24. Hasdemir U. The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(4): 309-27.
25. Schweizer HP. Understanding efflux in gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7(7): 633-42.
26. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013; 4(3): 223-9.
27. Pages JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794(5): 826-33.
28. Stavri M, Piddock LJ V, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(6): 1247-60.
29. Saier MH, Paulsen IT. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12(3):205-13.
30. Webber MA, Coldham NG. Measuring the activity of active efflux in gram-negative bacteria, pp: 173-80. In: Gillespie SH, McHugh TD (eds), *Antibiotic Resistance Protocols*. 2010, 2nd ed. Springer Publishing, New York.
31. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(7): 3974-7.
32. Kristiansen JE, Thomsen VF, Martins ANA, Viveiros M, Amaral L. Non-antibiotics reverse resistance of bacteria to antibiotics. *In Vivo* 2010; 24(5): 751-4
33. Zechini B, Versace I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2009; 4(1): 37-50.

34. Lomovskaya O, Bostian K. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(7): 910-8.
35. Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechère JC, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(5): 1055-65.
36. Eraç B, Yılmaz FF, Limoncu MH, Öztürk İ, Aydemir Ş. Investigation of the virulence factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(1): 70-81.
37. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pages J. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol* 2004;42(6): 2701-6.
38. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med* 2011; 6.
39. Çoban AY, Bayram Z, Sezgin FM, Durupınar B. Effect of efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine to MIC values of ciprofloxacin in ciprofloxacin resistant gram-negative bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(3): 457-61.
40. Çetinkaya E, Çoban AY, Durupınar B. Investigation of the effect of efflux pump inhibitors to MIC values of ciprofloxacin in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4):553-61.
41. Zeng B, Wang H, Zou L, Zhang A, Yang X, Guan Z. Evaluation and target validation of indole derivatives as inhibitors of the AcrAB-TolC efflux pump. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(11): 2237-41.
42. Piddock LJ, Garvey MI, Rahman MM, Gibbons S. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(6): 1215-23.
43. Amaral L, Martins A, Spengler G, Molnar J. Efflux pumps of gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Front Pharmacol* 2014; 4:168.
44. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(1): 105-16.
45. Mullin S, Mani N, Grossman TH. Inhibition of antibiotic efflux in bacteria by the novel multidrug resistance inhibitors Biricodar (VX-710) and Timcodar (VX-853). *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(11): 4171-6.
46. Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, et al. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(10): 2401-8.