

Efflux Pumps in Mycobacteria: Structure, Molecular Mechanisms, Clinical Implications, and Specific Inhibitors

Abstract

Background: The impermeable cell wall of Mycobacteria and the activity of multidrug efflux pumps (EPs) are among the key mechanisms contributing to intrinsic drug resistance in these bacteria. Previous studies have shown that overexpression of efflux pumps in various Mycobacterium species is associated with reduced efficacy of anti-tuberculosis drugs. Genes encoding efflux pumps have been identified in several Mycobacterium species. These proteins are capable of expelling various compounds, including aminoglycosides, fluoroquinolones, and other antimicrobial agents, from inside the cell. Recent evidence suggests that efflux pumps may also play a role in the expulsion of key anti-tuberculosis drugs such as isoniazid and rifampin. This review article focuses on recent advances in understanding the role of efflux pumps in the drug resistance of Mycobacteria, highlighting possible strategies to combat this mechanism, including the use of specific efflux pump inhibitors.

Methods: This study was conducted as a systematic review. Article searches were performed using the keywords Mycobacterium, drug resistance, efflux pumps, efflux transporters, and efflux pump inhibitors in reputable scientific databases, including PubMed, Scopus, and Google Scholar, covering the period from 2000 to 2024. In total, 312 articles were initially identified. Following the screening process, 71 articles were included in the final analysis. Inclusion criteria consisted of English-language original research and review articles with open access, indexed in JCR-listed journals, that investigated drug resistance mechanisms in Mycobacterium species, particularly focusing on efflux pumps and their inhibitors. Exclusion criteria included duplicate articles, those unrelated to the main topic, and studies for which full-text access was not available.

Results: Overexpression of efflux pumps, particularly Rv1258c (TAP) and Rv1410c, in Mycobacteria leads to reduced intracellular drug concentrations and decreased treatment efficacy. These pumps directly contribute to resistance against both first- and second-line anti-tuberculosis drugs. Specific efflux pump inhibitors can enhance bacterial sensitivity to antibiotics.

Conclusion: Given the central role of efflux pumps in the drug resistance of Mycobacteria, understanding their structure, function, and molecular pathways may support the development of more effective therapeutic strategies. Further studies are warranted to develop and clinically evaluate specific efflux pump inhibitors.

Keywords: Efflux pumps (EPs), Mycobacterium, Drug resistance, Efflux pump inhibitors (EPIs)

Mehdi Roshdi Maleki*

Department of Microbiology, Male.C., Islamic Azad University, Malekan, Iran

*** Corresponding Author**

Department of Microbiology, Male.C., Islamic Azad University, Malekan, Iran
Email: Me.roshdi@iau.ac.ir

Received: Mar 17 2025

Accepted: Jul 25 2025

Citation to this article

Roshdi Maleki M. Efflux Pumps in Mycobacteria: Structure, Molecular Mechanisms, Clinical Implications, and Specific Inhibitors. *J Med Counc Iran*. 2025;43(3):6-22.

پمپ‌های افلاکس در مایکوباکتریوم‌ها: ساختار، مکانیسم‌های مولکولی، پیامدهای بالینی و مهارکننده‌های اختصاصی

چکیده

زمینه: سد نفوذناپذیر دیواره سلولی مایکوباکتریوم‌ها و فعالیت پمپ‌های افلاکس چنددارویی، از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی هستند که در ایجاد مقاومت دارویی ذاتی در این باکتری‌ها نقش دارند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که افزایش بیان پمپ‌های افلاکس در گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با کاهش اثربخشی داروهای ضد سل همراه بوده است. ژن‌های کدکننده پمپ‌های افلاکس در چندین گونه مایکوباکتریوم شناسایی شده‌اند. این پروتئین‌ها قادرند ترکیبات مختلف از جمله آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و سایر عوامل ضد میکروبی را از داخل سلول خارج کنند. پمپ‌های افلاکس ممکن است در خروج داروهای کلیدی ضد سل مانند ایزونیازید و ریفامپین نیز نقش داشته باشند. این مقاله مروری بر پیشرفت‌های اخیر در درک نقش پمپ‌های افلاکس در مقاومت دارویی مایکوباکتریوم‌ها تمرکز دارد و راهبردهای ممکن برای مقابله با این مکانیسم، از جمله استفاده از مهارکننده‌های اختصاصی پمپ‌های افلاکس را مورد توجه قرار می‌دهد.

روش کار: این مطالعه به روش مرور نظام مند انجام شد. جستجوی مقالات با استفاده از کلیدواژه‌های Efflux pump in- و Mycobacterium, Drug resistance, Efflux pumps, Efflux transporters inhibitors در پایگاه‌های علمی و معتبر از جمله PubMed, Scopus و Google Scholar در بازه زمانی ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۴ انجام شد. در مجموع، تعداد ۳۱۲ مقاله شناسایی شد که پس از فرایند غربالگری، تعداد ۷۱ مقاله وارد مطالعه شدند. معیارهای ورود شامل مقالات انگلیسی زبان اصیل پژوهشی و مروری با دسترسی آزاد و دارای نمایه JCR بودند که به بررسی مکانیسم‌های مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم‌ها، بویژه نقش پمپ‌های افلاکس و مهارکننده‌های آنها پرداخته بودند. معیارهای حذف نیز شامل مقالات تکراری، غیرمرتبط با موضوع مقاله و عدم دسترسی به متن کامل مقالات بودند.

یافته‌ها: افزایش بیان پمپ‌های افلاکس بخصوص پمپ‌های (TAP) Rv۱۲۵۸c و Rv۱۴۱۰c در مایکوباکتریوم‌ها منجر به کاهش غلظت درون سلولی داروها و کاهش پاسخ به درمان می‌شود. این پمپ‌ها بطور مستقیم به مقاومت در برابر داروهای ضد سل خط اول و خط دوم کمک می‌کنند. مهارکننده‌های اختصاصی پمپ‌های افلاکس می‌توانند حساسیت باکتری‌ها به داروها را افزایش دهند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش محوری پمپ‌های افلاکس در مقاومت دارویی مایکوباکتریوم‌ها، شناخت ساختار، عملکرد و مسیرهای مولکولی آنها می‌تواند زمینه‌ساز طراحی راهکارهای درمانی مؤثرتر باشد. مطالعات بیشتر در زمینه توسعه مهارکننده‌های اختصاصی و بررسی بالینی آنها همچنان احساس می‌شود.

کلمات کلیدی: پمپ‌های افلاکس (Eps)، مایکوباکتریوم، مقاومت دارویی، مهارکننده‌های افلاکس پمپ (EPIs)

مهدی رشدی ملکی

گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران
نشانی الکترونیک:

Me.roshdi@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۳

مقدمه

مایکوباکتریومها، خصوصاً گونهٔ بیماریزای *Mycobacterium tuberculosis* از جمله مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی هستند که به دلیل توانایی مقاومت ذاتی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، چالش‌های بزرگی را در زمینهٔ درمان ایجاد کرده‌اند (۱). سل همچنان یکی از علل مهم مرگ و میر در سراسر جهان است که با گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی تشدید شده و باعث مرگ میلیون‌ها انسان در سال می‌شود (۲). در حال حاضر پذیرفته شده است که مقاومت کلی مایکوباکتریومها به هر عامل ضد میکروبی به دلیل هم‌افزایی بین مقاومت ذاتی و ژنتیکی است (۳). از آنجایی که در مایکوباکتریومها هیچ انتقال افقی ژن‌های مقاومت گزارش نشده است، مقاومت ژنتیکی در این باکتری‌ها عمدتاً از جهش‌های خودبه‌خودی در ژن‌های کروموزومی ناشی می‌شود؛ جهش‌هایی که با تغییر یا افزایش بیان اهداف دارویی، غیرفعال‌سازی دارو یا کاهش فعال‌سازی آن، باکتری را در برابر داروها مقاوم می‌کند (۴).

چندین مکانیسم برای مقاومت مایکوباکتریومها در برابر داروها مطرح شده است که از مهمترین آنها سد نفوذناپذیر دیوارهٔ سلولی و فعالیت پمپ‌های افلاکس چند دارویی (Multidrug efflux pumps) یا ترانسپورترهای خروج (Efflux Transporters: ETs) چند دارویی فعال هستند که در ایجاد مقاومت دارویی ذاتی در این باکتری‌ها نقش دارند (۵،۶). ژن‌های مربوط به ترانسپورترهای خروج دارو در چندین گونه از مایکوباکتریوم شناسایی شده‌اند. این پروتئین‌ها، داروهایی مانند تتراسایکلین، فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها و دیگر ترکیبات را منتقل می‌کنند. گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که پمپ‌های افلاکس ممکن است در انتقال ایزونیاژید (INH) و ریفامپین (RIF) که از داروهای اصلی ضد سل هستند، نیز نقش داشته باشند (۷،۸). بر اساس گزارشات، گسترش سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) و سویه‌هایی با مقاومت بسیار گسترده به دارو (XDR) در مایکوباکتریومها ناشی از مکانیسم‌های خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از این باکتری‌ها است (۹). پمپ‌های افلاکس می‌توانند در ایجاد مقاومت به داروهای اصلی ضد سل مانند INH و RIF و داروهای خط دوم ضد سل مانند فلوروکینولون‌ها (خصوصاً لوفلوکساسین و سپروفلوکساسین) و کرباپنم‌ها نقش داشته باشند. در سال‌های اخیر، تمایل به شناسایی و توسعهٔ ترکیباتی که به عنوان مهارکننده‌های پمپ‌های خروج دارو عمل می‌کنند، افزایش یافته است. بکارگیری این ترکیبات در کنار داروهای ضد سل موجود، می‌تواند با افزایش غلظت درون‌سلولی دارو، اثر ضد مایکوباکتریایی را در سویه‌های مقاوم، تقویت یا بازیابی کرده و مدت زمان درمان را کاهش دهد. علاوه بر این، مهارکننده‌های پمپ افلاکس قادرند بر مقاومت ذاتی *M. tuberculosis* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها غلبه کرده و از بروز جهش‌هایی که منجر به مقاومت دارویی می‌شوند،

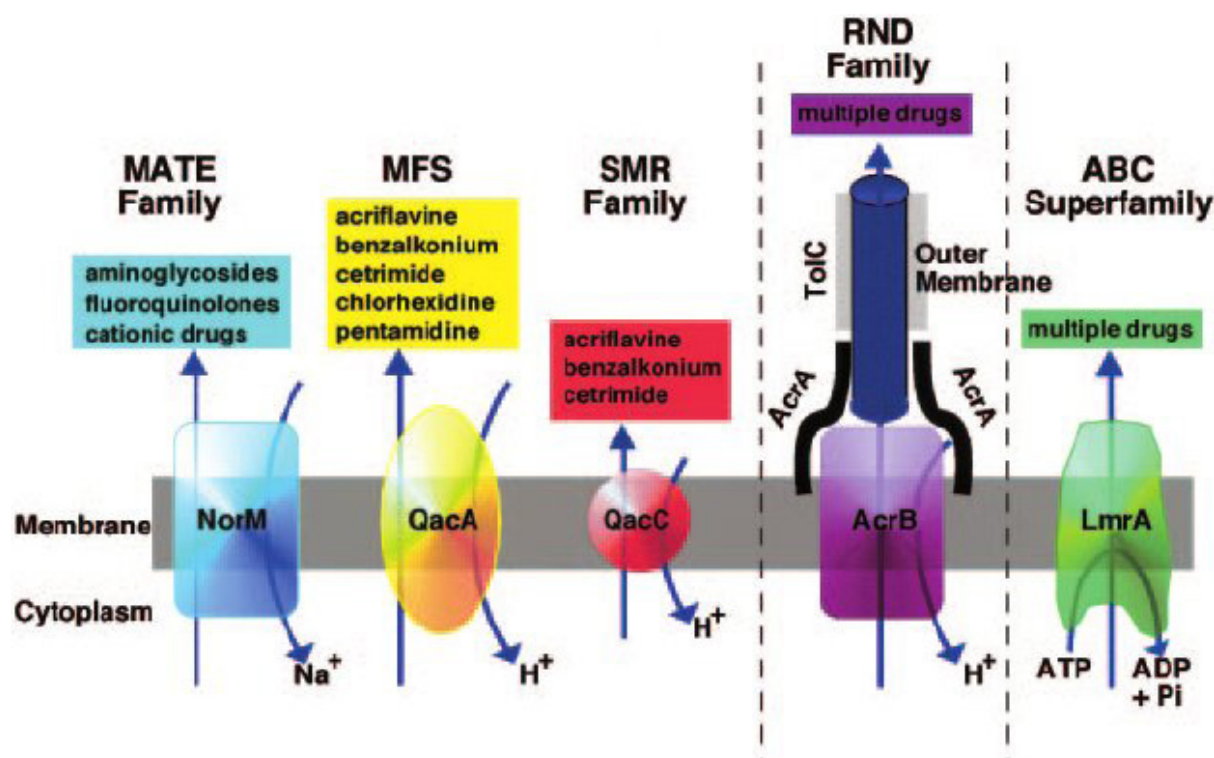
جلوگیری کنند.

مطالعهٔ حاضر با بررسی ساختار و مکانیسم‌های مولکولی پمپ‌های افلاکس و همچنین شناسایی ترکیبات مهارکنندهٔ اختصاصی آنها (Efflux Pump Inhibitors: EPIs) در مایکوباکتریومها، با هدف پاسخ به پرسش‌های زیر انجام گرفت:

- پمپ‌های افلاکس چگونه در مایکوباکتریومها به مقاومت دارویی کمک می‌کنند؟
- کدام پمپ‌ها در ایجاد سویه‌های مقاوم به دارو نقش کلیدی دارند؟
- مکانیسم‌های مولکولی عملکرد آنها چگونه است؟
- کدام ترکیبات EPI در مهار این پمپ‌ها مؤثرند؟
- چگونه می‌توان با استفاده از EPIها با مقاومت دارویی در مایکوباکتریومها مقابله کرد؟
- درک مکانیسم‌های اساسی خروج دارو، تنظیم پمپ‌های افلاکس، و سهم آنها در بیماریزایی، نه تنها امکان پیشرفت ابزارهای سریع‌تر و دقیق‌تر برای هدایت درمان ضدسل را فراهم می‌کند، بلکه دانش لازم برای توسعهٔ استراتژی‌های درمانی جدید را نیز فراهم می‌کند. از اینرو ابتدا به ساختار و مکانیسم‌های مولکولی پمپ‌های افلاکس در مایکوباکتریومها پرداخته خواهد شد؛ سپس تأثیر آنها بر مقاومت دارویی و درمان سل بررسی می‌شود.

روش کار

این مطالعه به روش مرور نظام‌مند در زمستان سال ۱۴۰۳ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ملکان انجام شد. جستجوی مقالات با استفاده از کلیدواژه‌های *Mycobacterium*, *Drug resistance*, *Efflux pumps*, *Efflux transporters* و *Efflux pump inhibitors* در پایگاه‌های علمی و معتبر از جمله PubMed، Scopus و Google Scholar در بازه زمانی ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۴ انجام گرفت که در مجموع، ۳۱۲ مقاله شناسایی شدند. معیارهای ورود شامل مقالات انگلیسی زبان اصیل پژوهشی و مروری با دسترسی آزاد و دارای نمایه JCR بودند که به بررسی مکانیسم‌های مقاومت دارویی در مایکوباکتریومها، بویژه نقش پمپ‌های افلاکس و مهارکننده‌های آنها پرداخته بودند. غربالگری و انتخاب مقالات بیشتر بر اساس عنوان، خلاصه و متن کامل آنها انجام گرفت. معیارهای حذف نیز شامل مقالات تکراری، مقالات غیرمرتبط با محور مقاله و عدم دسترسی به متن کامل مقالات بودند. از بین ۳۱۲ مقاله، تعداد ۱۴۷ مقاله به دلیل عدم دسترسی به متن کامل و ۹۴ مقاله به دلایل غیر مرتبط بودن، نامعتبر بودن ژورنال، فاقد نمایه JCR و تکراری بودن حذف شدند. در نهایت تعداد ۷۱ مقاله با متن کامل و مرتبط با موضوع مطالعه برای تحلیل نهایی انتخاب شدند. سایر منابع علمی مرتبط نیز برای غنای مقاله مورد استناد قرار گرفتند.



شکل ۱. مقایسه نموداری پنج خانواده پمپ های افلاکس (۱۴).

مروری بر متون

نوع طبقه‌بندی می‌شوند: ۱- انتقال‌دهنده‌های اولیه یا ATP Bind- ing Cassets (ABC)، که انرژی لازم برای انتقال را از هیدرولیز مولکول‌های ATP بدست می‌آورند. ۲- انتقال‌دهنده‌های چند دارویی ثانویه که انرژی لازم برای انتقال دارو را از گرادیان الکتروشیمیایی غشایی پروتون‌ها (H^+) یا یون‌های سدیم (Na^+) تأمین می‌کنند. انتقال دهنده‌های چند دارویی ثانویه خود شامل ۴ خانواده است که عبارتند از:

(Major Facilitator Superfamily - MFS)

(Resistance Nodulation Division - RND)

(Small Multidrug Resistant - SMR)

(Multidrug and Toxic Efflux - MATE) (۱۲، ۱۳).

در شکل ۱ ساختار پنج خانواده اصلی پمپ‌های افلاکس نشان داده شده است (۱۴) و جدول ۱، مثال‌هایی از این خانواده‌ها را در مقاومت به داروهای ضد مایکوباکتریوم خلاصه کرده است.

یکی از مکانیسم‌های کلیدی که منجر به مقاومت ذاتی مایکوباکتریوم‌ها در برابر داروها می‌شود، وجود سیستم‌های پمپ افلاکس (Ef^- flux pumps) در دیواره سلولی آنها است. تاکنون بیش از ۳۰ پمپ افلاکس مختلف متعلق به پنج ابرخانواده اصلی که در ادامه به آنها اشاره شده در مقاومت دارویی مایکوباکتریوم‌ها از جمله *M. tuberculosis* نقش دارند، از جمله این پمپ‌ها می‌توان به پمپ Rv۱۸۱۹C *culosis* متعلق به خانواده ABC اشاره کرد که در *M. tuberculosis* شناسایی شده است (۸). این پمپ‌ها، پروتئین‌های غشایی هستند که می‌توانند ترکیبات سمی از جمله داروهای ضد میکروبی را از داخل به خارج انتقال دهند و غلظت درون سلولی دارو و در نتیجه اثربخشی درمان را مختل کنند. این مکانیسم نه تنها بقای باکتری را در محیط‌های خشن تضمین می‌کند، بلکه نقش مهمی در ایجاد مقاومت چند دارویی (Multidrug-resistant: MDR) دارد (۱۰، ۱۱).

طبقه‌بندی و ساختار پمپ‌های افلاکس در مایکوباکتریوم‌ها

پمپ‌های افلاکس به خانواده‌های مختلفی از پروتئین‌های انتقال‌دهنده تعلق دارند که هر کدام از این خانواده‌ها دارای ویژگی‌های ساختاری و عملکردی منحصر به فردی هستند که به آنها اجازه می‌دهد طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی را از سلول خارج کنند. پمپ‌های افلاکس برای عملکرد خود به انرژی نیاز دارند و بر اساس منبع انرژی مورد استفاده و ویژگی‌های ساختاری به دو

ساختار مولکولی و مکانیسم عمل خانواده پمپ‌ها خانواده ABC (ATP-Binding Cassette):

خانواده ABC یکی از مهم‌ترین و گسترده‌ترین خانواده‌های ناقل‌های غشایی است که در بسیاری از موجودات زنده، از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و یوکاریوت‌ها وجود دارد. این پمپ‌ها در انتقال فعال مولکول‌های مختلف از جمله داروهای ضد میکروبی، لیپیدها،

جدول ۱. خانواده‌های مهم پمپ‌های افلاکس به همراه مقاومت دارویی مرتبط با آنها

خانواده افلاکس پمپ	مثال	داروهای مربوطه
ATP-Binding Cassette (ABC)	Rv ۰۱۹۴	β -lactams, STR, TET, CHL, VAN
	Rv ۱۲۱۷c- Rv ۱۲۱۸c	INH, RIF, AZI -۵۳۳ (pyrrole), AZI-۲۱۹ (pyrazolone)
	Rv ۱۴۷۳	Macrolides
	Rv ۱۶۶۷c	PZA
	Rv ۲۴۷۷	OFX, STR
	Rv ۳۷۵۶	PZA
	Rv ۰۱۹۴	β -lactams, STR, TET, CHL, VAN
	Rv ۲۶۸۶c- Rv ۲۶۸۷c- Rv ۲۶۸۸c	FQs
	Rv ۲۹۳۶- Rv ۲۹۳۷- Rv ۲۹۳۸ (DrrABC)	CHL, RIF, STR, TET, EMB, ERY, FQs
	Rv ۰۱۹۱	CHL, EtBr, methylene blue, PZA
Major Facilitator Superfamily (MFS)	Rv ۰۷۸۳	INH, RIF
	Rv ۰۸۴۹	AZI-۵۳۳ (pyrrole), AMK
	Rv ۱۴۱۰c (P۵۵)	INH, EMB, RIF, CFZ
	Rv ۱۶۳۴	FQs
	Rv ۲۳۳۳c (Stp)	SP, TET
	Rv ۲۴۵۹ (JefA)	INH, EMB
	Rv ۲۸۴۶c (EfpA)	INH, ETH
	Rv ۱۲۵۸c (Tap)	Aminoglycosides, AZI-۵۳۳ (pyrrole), INH, OFX, PZA, RIF, STR, TET
	Rv ۲۹۹۴	STR, FQs, CIP
	Rv ۳۰۰۸	PZA
Resistance-Nodulation-Division (RND)	Rv ۳۷۲۸	INH, EMB
	Rv ۲۹۴۲ (MmpLV)	INH
	Rv ۰۶۷۶c- Rv ۰۶۷۷c (MmpL۵-MmpS۵)	BDQ, CFZ, azole
	Rv ۳۰۶۵ (Mmr)	INH, EMB, EtBr, TPP, CTAB, AZI-۵۳۳ (pyrrole)
Small Multidrug Resistance (SMR)		

ساختار و مکانیسم عمل

پمپ‌های افلاکس خانواده ABC معمولاً از چهار زیرواحد پروتئینی تشکیل شده‌اند که شامل ۲ زیرواحد تراغشایی (Transmem-) (brane Domains-TMDs) است که در غشای سلولی قرار دارند و مسئول شناسایی و انتقال سوبسترا (دارو یا ترکیبات سمی) به بیرون سلول هستند و ۲ زیرواحد متصل شونده به نوکلئوتید (Nucleo-) (pyrrole) را تشکیل می‌دهند.

پپتیدها و سموم نقش اساسی دارند (۱۶). برخلاف دیگر خانواده‌های پمپ‌های افلاکس مانند MFS، این پمپ‌ها برای انتقال سوبسترا به انرژی حاصل از هیدرولیز ATP وابسته هستند. در باکتری‌ها، ناقل‌های ABC جذب مواد مغذی ضروری یا اکستروژن (دفع) مواد سمی را کاتالیز می‌کنند و در نتیجه به مقاومت دارویی و آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌های میکروبی کمک می‌کنند (۸، ۱۷).

جدول ۲. پمپ های افلاکس دارویی مایکوباکتریایی مرتبط با کاهش حساسیت به عوامل آنتی بیوتیکی

منبع	مقاومت به دارو	گونه مایکوباکتریوم	خانواده افلاکس پمپ
MFS Family			
۲۰	فلوروکینولون ها، اتیدیوم بروماید، آکریفلوین و CTAB	M. smegmatis	LfrA
۲۱	تتراسایکلین	M. smegmatis	Tet (V)
۲۲	آمینوگلیکوزیدها و تتراسایکلین	M. tuberculosis M. fortuitum	TAP
۲۳	آمینوگلیکوزیدها و تتراسایکلین	M. bovis	P۵۵
۲۴	فلوروکینولون ها	M. tuberculosis	Rv ۱۶۳۴
۱۱	ریفامپین، افلوکساسین	M. tuberculosis resistant to RIF, INH, ofloxacin	Rv ۱۲۵۸c
SMR Family			
۲۵	تترا فنیل فسفونیوم، اتیدیوم بروماید، اریترومایسین، ۷ پرونین، O، آکریفلوین، سافرانی	M. tuberculosis	MmR
RND Family			
۷	ایزونیازید	M. tuberculosis	MmpLV
ABC Family			
۲۶	فلوروکینولون ها	M. tuberculosis	PstB
۲۷	تتراسایکلین، اریترومایسین، اتاموتول، نورفلوکساسین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل و آنتراسیکلینها	M. tuberculosis	DrrAB
۲۸	فلوروکینولون ها	M. tuberculosis	Rv ۲۶۸۶c-۲۶۸۷c-۲۶۸۸c

مهم این خانواده این است که این سیستم می تواند مولکول های مختلف را حتی در برابر شیب غلظتی مخالف (Uphill transport) به بیرون از سلول، پمپ کند، که این ویژگی در مقاومت دارویی بسیار مهم است (۱۹). در جدول ۲ برخی از مهم ترین پمپ های خانواده ABC که در مایکوباکتریوم ها شناسایی شده اند به همراه عملکرد و ارتباط آنها با مقاومت دارویی نشان داده شده است.

نقش در مقاومت دارویی

پمپ های ABC بطور مستقیم در مقاومت های MDR و XDR دخیل هستند و با تخلیه آنتی بیوتیک ها، غلظت داخل سلولی داروها را کاهش می دهند. افزایش بیان پمپ های ABC در مایکوباکتریوم باعث کاهش تجمع ریفامپین (RIF) و ایزونیازید (INH) شده و درمان سل را دشوارتر می کند. برخی پمپ های ABC حتی می توانند مواد ضد عفونی کننده و ترکیبات ضد میکروبی میزبان را دفع کنند

(tide-Binding Domains-NBDs) که در سمت سیتوپلاسم قرار دارند و از طریق اتصال و هیدرولیز ATP به ADP+Pi انرژی لازم برای خروج سوپسترا را تأمین می کنند (۱۶). در برخی از پمپ های ABC، این چهار زیر واحد در قالب یک پروتئین منفرد سازمان دهی شده اند، در حالی که در برخی دیگر، زیر واحدها بصورت پروتئین های جداگانه عمل می کنند. این خانواده از پمپ ها در مقاومت به داروهای مختلف مانند فلوروکینولون ها و آمینوگلیکوزیدها نقش مهمی دارند. پمپ های افلاکس خانواده ABC نسبت به خانواده MFS انرژی بیشتری برای عملکرد نیاز دارند (۱۶، ۱۸). مکانیسم عمل این پمپ ها به این صورت است که ابتدا مولکول هدف (مثلاً آنتی بیوتیک) به بخش تراغشایی متصل می شود؛ در ادامه، NBD ها ATP را هیدرولیز کرده و انرژی حاصل باعث تغییر ساختار کانال و خروج سوپسترا به خارج از سلول می شود. پس از تخلیه، پمپ به حالت اولیه خود بازمی گردد و آماده انتقال مولکول های جدید می شود. از ویژگی های

که به بقای مایکوباکتریوم در درون ماکروفاژها کمک می کند (۲۹).

خانواده MFS (Major Facilitator Superfamily)

ابر خانواده تسهیل کننده اصلی (MFS)، یکی از بزرگ ترین و متنوع ترین خانواده های پروتئین های انتقال دهنده غشایی در پروکاریوت ها و یوکاریوت ها است که نقش کلیدی در جابجایی طیف گسترده ای از مولکول ها، از جمله مواد مغذی، متابولیت ها، یون ها و ترکیبات دارویی، ایفا می کند. این پروتئین های انتقال دهنده با استفاده از شیب الکتروموتیو پروتون یا سایر مکانیسم های هم انتقالی، امکان ورود و خروج مواد را از طریق غشاء فراهم می کنند. در دهه های اخیر، پیشرفت های قابل توجهی در مطالعات ساختاری اعضای این خانواده حاصل شده است که درک عمیق تری از مکانیسم های عملکردی آنها ارائه می دهد. بویژه، استفاده از روش های تصویربرداری پیشرفته مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس و میکروسکوپی کرایو-الکترونی (Cryo-EM) منجر به شناسایی ساختارهای با وضوح بالا از چندین ناقل MFS شده است. این دستاوردها نه تنها به درک نحوه تعامل این پروتئین ها با سوبستراهایشان کمک کرده است، بلکه در توسعه داروهای هدفمند برای مقابله با مقاومت دارویی نیز اهمیت بسزایی داشته است (۳۰).

ساختار و مکانیسم عمل

اعضای این خانواده، ساختاری تک پروتئینی دارند که معمولاً از ۱۲ یا ۱۴ واحد α -هلیکسی تراغشایی (TMS) تشکیل شده است. تاکنون، ساختار بلوری بیش از ۱۲ ترانسپورتر MFS شناسایی شده است که شامل پمپ های دفع چنددارویی، ترانسپورترهای قندی، ترانسپورترهای گلیسرول-۳-فسفات، انتقال دهنده های لاکتوز، و انتقال دهنده های نیترات/نیتريت می باشند. همچنین، ترانسپورترهایی مانند GLUT1 (انتقال دهنده گلوکز در انسان) و GLUT5 (انتقال دهنده فروکتوز در پستانداران) نیز جزء این دسته قرار دارند. ساختار کلی این پروتئین ها نشان می دهد که ترانسپورترهای MFS شامل دو مجموعه ساختاری متقارن اما عملکردی نامتقارن به نام دامنه های N-ترمینال (NTD) و C-ترمینال (CTD) هستند. این دامنه ها شامل ۶ بخش TMS اولیه و ۶ بخش TMS نهایی بوده که از تکثیر و اتصال متوالی یک ژن اجدادی با TMS-6 شکل گرفته اند. ویژگی مشترک ترانسپورترهای MFS وجود یک حفره آبی مرکزی است که از تعامل بین دو دسته ساختاری ناشی می شود. این ویژگی از نظریه میشل حمایت می کند که نشان می دهد شیب پروتون به عنوان منبع انرژی برای انتقال سوبستراها از غشا عمل می کند (۳۱). پمپ های خانواده MFS برخلاف خانواده ABC برای خروج سوبسترا نیازی به ATP ندارند، بلکه از نیروی محرکه پروتون (PMF - Pro-) (ton Motive Force) استفاده می کنند. بطور خاص، در فرآیندی

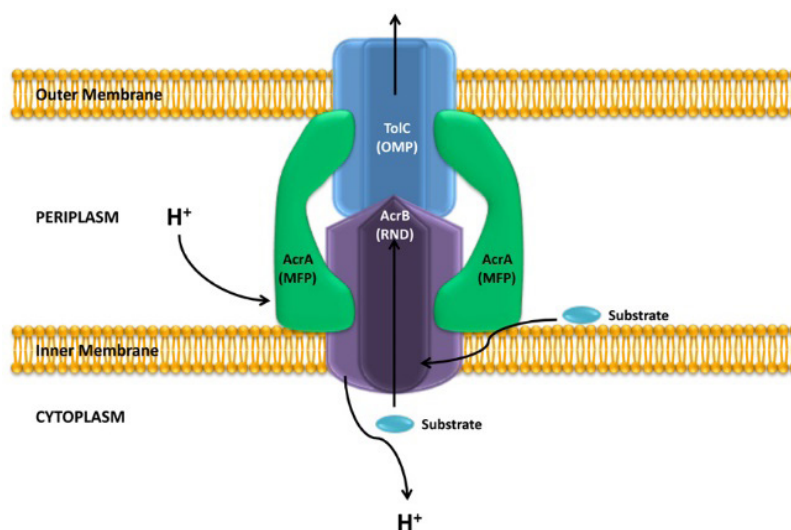
به نام Antiport یا Symport، این ناقل ها از شیب الکتروشیمیایی یون ها (مانند پروتون ها یا سدیم) برای انتقال مواد مختلف از داخل به خارج سلول استفاده می کنند. برخی از مهم ترین پمپ های افلاکس در خانواده MFS مانند Rv1877, Rv1634, LfrA, EfpA و Tap در مایکوباکتریوم ها شناسایی شده اند. این پمپ ها در مقاومت به داروهای آنتی بیوتیکی مختلف مانند فلوروکینولون ها، تتراسایکلین، ماکرولیدها و کلرامفنیکل نقش مهمی دارند. مطالعات نشان داده اند که افزایش بیان ژن های MFS در *M. tuberculosis* باعث افزایش مقاومت نسبت به داروهای خط اول مانند ایزونیاژید و ریفامپین می شود (۷, ۳۲). پمپ Rv1877 که اخیراً مورد مطالعه قرار گرفته است، قادر است داروهای فلوروکینولونی مانند افلوکساسین و لووفلوکساسین را از سلول خارج کند، که به مقاومت باکتری به این داروها کمک می کند. همچنین، این پروتئین در تشکیل بیوفیلم در باکتری ها نقش دارد، که می تواند مقاومت به درمان های ضدباکتریایی را تقویت کند. پمپ Rv1877 ممکن است هدف مناسبی برای توسعه روش های درمانی جدید در برابر *M. tuberculosis* باشد (۳۳). بیان بیش از حد پمپ های MFS باعث کاهش غلظت داخل سلولی داروهای ضد مایکوباکتریایی شده و اثر بخشی درمان را کاهش می دهد. برخی ترکیبات بعنوان مهارکننده های پمپ های افلاکس (Efflux Pump Inhibitors-EPIs) مورد بررسی قرار گرفته اند تا بتوانند کارایی داروها را افزایش دهند. برای مثال، Verapamil و برخی مشتقات فینیل آلکیل آمین قادر به مهار این پمپ ها هستند و در ترکیب با آنتی بیوتیک ها اثر درمانی بهتری نشان داده اند (۳۴).

خانواده RND (Resistance-Nodulation-Division)

پمپ های خانواده RND یک خانواده بزرگ از پمپ های افلاکس هستند که در باکتری ها بویژه در باکتری های گرم منفی و همچنین مایکوباکتریوم ها دیده می شوند. این خانواده شامل پروتئین های انتقال دهنده ای با ۱۲ بخش تراغشایی است که در بسیاری از موجودات زنده یافت می شوند، اما نقش آنها در مقاومت دارویی عمدتاً در باکتری های گرم منفی مشاهده شده است. این باکتری ها برای خروج دارو از سلول به محیط خارج، به ۲ پروتئین کمکی (پروتئین پیوند غشایی و پروتئین غشای خارجی) نیاز دارند.

ساختار و مکانیسم عمل

در باکتری های گرم منفی، پمپ های RND از سه جزء تشکیل شده اند که عبارتند از: ۱- پروتئین های غشای داخلی (Inner mem-brane proteins): این پروتئین ها که در غشای داخلی سلول قرار دارند، از انرژی حاصل از گرادیان پروتون یا یون ها برای انتقال مواد استفاده می کنند. ۲- پروتئین های غشای بیرونی (Outer mem-)



شکل ۲. ساختار یک پمپ افلاکس از خانواده RND در باکتری های گرم منفی

MmpL11 در *M. leprae* عملکردی هستند. همچنین، MmpL3 بعنوان هدف درمانی جدید در *M. tuberculosis* شناسایی شده است. پمپ MmpS5-MmpL5 که یکی از مهم ترین پمپ های RND در *M. tuberculosis* است، در *M. leprae* وجود ندارد. این حذف به احتمال برای حفظ مسیرهای ضروری برای زندگی داخل سلولی *M. leprae* اتفاق افتاده است. غیاب این پمپ باعث می شود *M. leprae* نسبت به کلوفازیمین حساس باشد و این پمپ با مقاومت به داروهایی مانند آزول ها و بداکیلین در *M. tuberculosis* مرتبط است (۳۶).

MmpL3، یکی از مهم ترین اعضای خانواده RND در *M. tuberculosis* می باشد که در انتقال اسیدهای مایکولیک و همچنین در مقاومت به داروهایی مانند بداکیلین (Bedaquiline) نقش دارد، همچنین، MmpL5 در مقاومت به داروهایی مانند کلوفازیمین (Clofazimine) دخیل است (۶،۳۷). MmpL7 یکی دیگر از این پروتئین هاست که در انتقال لیپید Phthiocerol Dimycoc- PDIM (erosate) از سیتوپلاسم به سطح خارجی دیواره سلول نقش دارد. مطالعات نشان داده است که حذف ژن MmpL7 باعث کاهش بیماریزایی *M. tuberculosis* در مدل های حیوانی شده است (۳۸،۳۹). همچنین، ژن fadD28 که در نزدیکی MmpL7 قرار دارد، در بیوسنتز DIM نقش داشته و حذف آن منجر به عدم تولید DIM می شود. مطالعات نشان داده اند که MmpL7 در *M. smegmatis* باعث افزایش مقاومت به ایزونیازید (INH) می شود و این مقاومت زمانی که fadD28 و MmpL7 بطور هم زمان بیان شوند، از بین می رود که نشان دهنده رقابت DIM و INH برای یک سیستم انتقالی مشترک است (۴۰).

علاوه بر MmpL7، مطالعات جهش زایی نشان داده اند که

این پروتئین ها در غشای بیرونی باکتری قرار دارند و به انتقال مواد از سلول به محیط بیرون کمک می کنند. ۳- پروتئین های متصل کننده (Periplasmic proteins): این پروتئین ها که در فضای پری پلاسمیک قرار دارند بعنوان پلی برای اتصال دو بخش غشای داخلی و بیرونی عمل می کنند و پمپ کامل را تشکیل می دهند (۳۵). شکل ۲ نشان دهنده یک طرح ساختاری از سیستم AcrAB-TolC در *E. coli* است. همانطور که مشاهده می شود، این سیستم یک کمپلکس ۳ جزئی است که از پروتئین غشای داخلی، پروتئین TolC غشای خارجی و پروتئین ادغام کننده غشای AcrA تشکیل شده است. فعالیت پروتئین AcrB از خانواده RND به گرادیان پروتونی متصل است.

در مایکوباکتریوم ها، این پمپ ها فاقد کانال غشای خارجی هستند، زیرا دیواره سلولی ضخیم و غنی از اسیدهای مایکولیک نقش یک مانع طبیعی را ایفا می کند. بنابراین، پمپ های RND در مایکوباکتریوم ها معمولاً دو جزئی هستند. مایکوباکتریوم ها، با وجود طبقه بندی در گروه باکتری های گرم مثبت، از نظر ساختاری به باکتری های گرم منفی شباهت دارند زیرا دارای یک لایه لیپیدی خارجی و پوشش سلولی ضخیم هستند. برخلاف باکتری های گرم منفی، تاکنون در مایکوباکتریوم ها پمپ های چندواحدی مشابه شناسایی نشده است، اما توالی ژنومی *M. tuberculosis* نشان می دهد که این باکتری دارای ۱۳ الی ۱۵ ژن کد کننده پروتئین های Mycobac-MmpL (terial membrane protein Large) و ۵ پروتئین کمکی MmpS (Mycobacterial membrane protein Small) هستند (۷).

در *M. leprae*، برخی از ژن های MmpL غیرعملکردی بوده و یا بطور دائم بیان می شوند. از ۱۳ پروتئین MmpL در *M. tuberculosis*، فقط MmpL3، MmpL4، MmpL7، MmpL10 و

سه‌بعدی این پروتئین نیز بعنوان یک هومودایمر نامتقارن مشخص شده است (۵۱،۵۲).

نقش پمپ‌های افلاکس SMR در مقاومت دارویی گونه‌های مختلف باکتری‌ها

در *A. baumannii*، پمپ AbeS باعث خروج اتیدیوم بروماید، بنزالکونیوم و آکری‌فلاوین شده و مقاومت نسبت به آمیکاسین را افزایش می‌دهد (۵۳،۵۴). در *K. pneumoniae*، فعال‌سازی سیستم افلاکس KpnEF، مقاومت در برابر کلرهگزیدین، بنزالکونیوم کلراید (Benzalkonium chloride) و سایر ضدعفونی‌کننده‌ها را ایجاد می‌کند (۵۵). در *P. aeruginosa* و *E. coli*، پمپ EmrE در حذف ترکیبات پلی‌آروماتیک و ترکیبات کاتیونی نقش دارد (۴۴،۵۶). در *Enterococcus faecalis* و *S. aureus*، ژن‌های *QacA* و *QacB* شناسایی شده‌اند، در حالیکه در *Enterobacteriaceae* و *Pseudo-monas spp*، ژن *qacE* بیشتر مشاهده شده است (۵۷).

نقش در مقاومت دارویی میکوباکتریوم‌ها

در میان میکوباکتریوم‌ها، تنها یک پمپ افلاکس از خانواده SMR در *M. tuberculosis* شناسایی شده که با نام Mmr (Rv3065) شناخته می‌شود. افزایش بیان این ژن باعث کاهش حساسیت به اتیدیوم بروماید، اریترئومایسین، آکری‌فلاوین، سافرانین O و پی‌رونین Y می‌شود (۲۵،۵۸). Mmr، مانند سایر پمپ‌های SMR، بعنوان یک آنتی‌پورتر پروتون/دارو عمل می‌کند و خروج ترکیبات سمی را از طریق نیروی محرکه پروتون تنظیم می‌کند. این ژن در گونه‌های دیگر میکوباکتریوم مانند *M. gordonae*، *M. tuberculosis*، *M. simiae* و *M. bovis* نیز شناسایی شده است (۲۵،۵۸). پمپ‌های SMR اغلب توسط پلاسمیدها کدگذاری شده و بر روی اینتگرئون‌ها (Integrations) که از عناصر ژنتیکی متحرک (Mobile Genetic Elements) هستند، قرار دارند. این امر احتمال انتقال افقی ژن‌های مقاومت را افزایش داده و باعث گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جمعیت‌های باکتریایی می‌شود (۴۹). مطالعات نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی می‌تواند باعث بیان بیش از حد پمپ‌های افلاکس شود و در نتیجه، انتقال افقی ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها را تسهیل کند (۵۹،۶۰). از اینرو می‌توان نتیجه گرفت که پمپ‌های افلاکس خانواده SMR، بویژه در باکتری‌های مقاوم به دارو، نقش مهمی در توسعه مقاومت چنددارویی دارند. افزایش بیان این پمپ‌ها نه تنها موجب افزایش مقاومت به داروهای مختلف می‌شود، بلکه می‌تواند انتقال افقی ژن‌های مقاومت را نیز تسهیل کند. درک مکانیسم این پمپ‌ها و شناسایی مهارکننده‌های اختصاصی برای آنها می‌تواند به توسعه راهکارهای جدید در درمان عفونت‌های مقاوم به دارو،

MmpL2 و MmpL4 برای رشد *M. tuberculosis* در ریه‌های موش ضروری هستند. همچنین، MmpL8 برای انتقال پیش‌ساز گلیکولیپید سولفات SL-1 و بقای پایدار باکتری در بدن میزبان ضروری است. جهش در MmpL8 باعث کاهش بیماری‌زایی در موش شده است (۳۹). تحقیقات نشان داده‌اند که MmpL6 ممکن است در سیستم خروج سموم و داروهای ضدسل مانند ایزونیاژید، تیولاکتومایسین (TLM) و تریکلوسان نقش داشته باشد. بررسی عملکرد سایر پروتئین‌های MmpL می‌تواند اطلاعات بیشتری درباره مقاومت دارویی و بیماری‌زایی *M. tuberculosis* فراهم کند (۴۱،۴۲).

خانواده Small Multidrug Resistance (SMR)

پمپ‌های افلاکس خانواده SMR از جمله مهم‌ترین سیستم‌های دفع دارو در باکتری‌های پروکاریوتی هستند که با استفاده از شیب الکتروشیمیایی پروتون (Proton gradient)، طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات سمی را از سلول خارج کرده و در نتیجه، نقش مهمی در ایجاد مقاومت چند دارویی دارند (۴۳). اعضای این خانواده بر اساس آنالیز توالی ژنی به دو زیرگروه اصلی تقسیم می‌شوند که عبارتند از: ۱- خارج‌کننده گوانیدیوم (Gdx)؛ این گروه مسئول انتقال یون گوانیدینیوم (Gdm⁺)، یکی از متابولیت‌های باکتریایی، در ازای ورود دو پروتون است. ۲- پمپ‌های ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی (QACs)؛ این زیرگروه مسئول خروج ترکیبات کاتیونی، هیدروفوبیک و آمونیوم نوع چهارم از سلول می‌باشد (۴۴). پس از کشف اولین ضدعفونی‌کننده‌های آمونیوم چهار ظرفیتی در حدود یک قرن پیش، مشخص شد که پروتئین‌های Qac نقش مهمی در گسترش عناصر ژنتیکی مرتبط با مقاومت دارویی دارند. تحقیقات نشان داده‌اند که باکتری‌های مختلف دارای هر دو زیرگروه از پروتئین‌های SMR هستند، اما عملکرد آنها مستقل از یکدیگر است (۴۵-۴۷).

ساختار و مکانیسم عمل

اعضای این خانواده از زنجیره‌های پپتیدی کوتاهی (۱۰۰ تا ۱۵۰ اسید آمینه) تشکیل شده‌اند که دارای چهار مارپیچ آلفا (TM α-he-) هستند و غشای سیتوپلاسمی را طی می‌کنند (۴۸). این ساختار موجب می‌شود که طیف گسترده‌ای از داروها و ترکیبات سمی از جمله اتیدیوم بروماید، ترکیبات پلی‌آروماتیک، آکری‌فلاوین و ترکیبات کاتیونی از سلول دفع شوند (۴۹). پمپ‌های SMR به عنوان آنتی‌پورترهای پروتون/دارو عمل کرده و از نیروی محرکه پروتون برای خروج ترکیبات سمی از سلول استفاده می‌کنند (۵۰). یکی از معروف‌ترین این پمپ‌ها، EmrE در *E. coli* است که مقاومت نسبت به اتیدیوم بروماید و متیل ویولوژن را ایجاد می‌کند. ساختار

بردن پمپ های افلاکس می تواند از راه های مختلف انجام گیرد که عبارتند از: ۱) کاهش بیان ژن های پمپ های افلاکس با دخالت در تنظیم ژنتیک، ۲) طراحی مجدد آنتی بیوتیک هایی که دیگر به عنوان سوبسترا شناخته نمی شوند، ۳) ممانعت از مونتاژ پمپ های خروجی عملکردی، ۴) مسدود کردن پمپ برای جلوگیری از اتصال سوبسترا به محل فعال و ۵) فروپاشی مکانیسم مسئول انرژی دادن به این پمپ ها (۳۴,۶۲). گزارش شده است که مهارکننده های پمپ افلاکس (Efflux Pump Inhibitors: EPIs) از فعالیت برخی از پمپ های خروجی *M. tuberculosis* هم در شرایط *in vitro* و هم *ex vivo* جلوگیری می کنند. بنابراین، شناسایی و توسعه EPI هایی که می توانند فعالیت ضد میکروبی یک آنتی بیوتیک در معرض جریان را بازگردانند، رویکردی است که برای جلوگیری از ظهور مقاومت دارویی در *M. tuberculosis* و بهبود اثربخشی درمان های دارویی ضد سل، شایسته بررسی است. تا به امروز، EPI ها شامل داروهای فتوتیازین مانند کلرپرومازین (CPZ) و مشتقات آن تیوریدازین (TZ)، کربونیل سیانید m-کلروفنیل هیدرازون (CCCP)، رزپین (RSP) و وراپامیل (VP) هستند (۶۳). CCCP، یک جداکننده نیروی محرکه پروتون، می تواند فعالیت یک سیستم جریان فعال را با تغییر گرادیان غلظت پروتون کاهش دهد، در نتیجه بر تجمع دارو در باکتری ها و بازگرداندن حساسیت به دارو تأثیر می گذارد. مطالعات بر روی *M. tu-berculosis* نشان داده است که VP فعالیت بداکیلین و افلوکساسین را در درمان بیماران مبتلا به سل تقویت می کند (۶۴). RSP به عنوان یک داروی ضد فشار خون ساخته شده است، اما می تواند به عنوان یک مهارکننده پمپ نیز استفاده شود. RSP باعث کاهش دفع دارو توسط باکتری ها و بازیابی حساسیت دارو با کاهش تأمین انرژی از طریق هیدرولیز ATP می شود. در نهایت، TZ در تمام خواص ضد میکوباکتریایی معادل CPZ است (۶۵,۶۶). در جدول شماره ۳ به تعدادی از مهارکننده های شناخته شده که در مطالعات مختلف روی میکوباکتریومها بررسی شده اند، اشاره شده است.

انواع EPI ها بر اساس مکانیسم عمل آنها

اگرچه انواع مختلفی از EPI ها با مکانیسم عمل متفاوت گزارش شده اند، بطور کلی، این مواد در ۲ دسته اصلی طبقه بندی می شوند: ۱- انتقال انرژی: پمپ های افلاکس به انرژی سلولی وابسته اند و جداکردن این انرژی می تواند به مهار آنها کمک کند. CCCP یکی از معروف ترین EPI ها است که با اختلال در نیروی محرکه پروتون (PMF) باعث غیرفعال شدن متابولیک سلول ها و اثر هم افزایی با آنتی بیوتیک ها می شود (۷۰). ۲- اتصال مستقیم EPI به پمپ های فعال است که باعث کاهش توانایی پمپ ها در تعامل با سوبستراهای خود می شود. این اتصال می تواند رقابتی یا غیر رقابتی باشد. با این حال، باکتری ها می توانند با ایجاد جهش در ژن های کدکننده پمپ

خصوصاً سل و سایر بیماری های باکتریایی کمک کند. همچنین مهار این پمپ ها می تواند راهکاری مؤثر برای افزایش حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک ها باشد، که نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه را برجسته می کند.

خانواده MATE

(Multidrug and Toxic Compound Extrusion)

پمپ های MATE در هر سه حوزه حیات (باکتری ها، آرکی ها، و یوکاریوت ها) یافت می شوند و نقش مهمی در دفع ترکیبات سمی و داروها دارند. این پمپ ها به عنوان ترانسپورترهای ثانویه شناخته می شوند که از گرادیان یونی (معمولاً H^+ یا Na^+) برای انتقال سوبستراها استفاده می کنند. از نظر ساختار، پمپ های MATE دارای ۱۲ حوزه تراغشایی (TM) هستند که به دو نیمه TM1-6 و TM7-12 تقسیم می شوند. ساختار آنها شامل حلقه های اتصال دهنده (Loops) بین حوزه های تراغشایی است که برخی از آنها (مانند L3-4, L6-7, L9-10) طولانی تر هستند و در عملکرد پروتئین نقش دارند. از نظر عملکرد، بصورت آنتی پورتر ($Na^+/drug$ یا $H^+/drug$ anti-porter) عمل می کنند. در این مکانیسم، اتصال سوبسترا (مانند دارو یا ترکیب سمی) به جایگاه خود در غیاب کاتیون رخ می دهد. با ورود کاتیون، تغییرات ساختاری در پروتئین (مانند جابجایی TM7 و TM8) باعث آزادسازی سوبسترا به خارج از سلول می شود. این پمپ ها با سوبستراهای کاتیونی و آروماتیک (مانند آنتی بیوتیک ها، رنگ های کاتیونی و متابولیت های سمی) تعامل دارند. پمپ های MATE در مقاومت چنددارویی (MDR)، بویژه در باکتری هایی مانند *Neisseria gonorrhoeae* (پمپ NorM-NG Vibrio cholerae) و *ae* (پمپ NorM-VC) نقش دارند. این پمپ ها با دفع آنتی بیوتیک هایی مانند فلوروکینولون ها، آمینوگلیکوزیدها و سایر ترکیبات ضد میکروبی به بقای باکتری در برابر درمان های دارویی کمک می کنند (۶۱).

پمپ های MATE در میکوباکتریومها نیز وجود دارند، هرچند نسبت به خانواده های دیگر مانند ABC, MFS و RND کمتر مطالعه شده اند. مهارکننده هایی مانند وراپامیل و تیوریدازین می توانند فعالیت این پمپ ها را کاهش داده و اثربخشی درمان های ضد سل را بهبود بخشند، اما اطلاعات دقیق در مورد ژن های خاص MATE در میکوباکتریومها محدود است و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد (۸).

مهارکننده های پمپ های افلاکس (EPIs) به عنوان عوامل درمانی جدید

با توجه به اهمیت پمپ های افلاکس در بروز مقاومت آنتی بیوتیکی، قابل انتظار است که دورزدن این عوامل تعیین کننده مقاومت می تواند فعالیت آنتی بیوتیک های سوبسترا را تقویت کند. از بین

جدول ۳. برخی از مهارکننده‌های پمپ‌های افلاکس (EPIs) در مایکوباکتریوم‌ها (۶۷، ۶۴، ۶۳، ۶۲، ۶۱-۶۰)

مهارکننده پمپ افلاکس	پمپ (های) هدف	مایکوباکتریوم هدف	سوبسترا (ها)
Verapamil (VP)	(efpA [Rv ۲۸۴۶c], Rv ۱۲۵۸c, jefA [Rv ۲۴۵۹], and P۵۵ [Rv ۱۴۱۰c]) and (Rv ۱۸۱۹c and pstB [Rv ۰۹۳۳])	M. tuberculosis	Isoniazid
Reserpine (RSP)	ABC: Rv ۲۹۳۶-Rv ۲۹۳۷-Rv ۲۹۳۸ (DrrABC) Rv ۰۹۳۳ (PstB) Rv ۲۶۸۶c-Rv ۲۶۸۷c-Rv ۲۶۸۸c RND: Rv ۰۶۷۸, Rv ۱۱۴۵, Rv ۱۱۴۶, Rv ۲۹۴۲ (mmpLY) MFS: Rv ۱۴۱۰c (P۵۵), Rv ۱۸۷۷ Rv ۲۸۴۶c SMR: Rv ۳۰۶۵ (mmr)	Mycobacterium spp.	Ciprofloxacin, Ofloxacin
Thioridazine (TZ)	LfrA, DrrAB, Tap, MmpL۳	M. tuberculosis, M. avium complex, M. smegmatis	Norfloxacin, Fluoroquinolones (FQs), Et-Br acriflavine
Chlorpromazine (CPZ)	LfrA, DrrAB, Tap, MmpL۳	M. tuberculosis, M. avium complex, M. smegmatis	Et-Br Fluoroquinolones
Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP)	AcrB MdrI- Mdr۲- MmpL۳	Mycobacterium M. smegmatis & M. tuberculosis	Rifampin Isoniazid Pyrazinamide
Phenylpropanoid	Rv ۱۱۴۵, Rv ۱۱۴۶ Rv ۱۸۷۷, Rv ۲۸۴۶c Rv ۳۰۶۵(mmr)	Mycobacterium spp.	Et-Br
Spectinamides	Rv ۱۲۵۸c	Mycobacterium spp.	Clarithromycin, Doxycycline and Clindamycin
Diterpenes (ferruginol)	MsrA, TetK, NorA	Mycobacterium spp.	Erythromycin, Norfloxacin Isoniazid
Totarol	MsrA, TetK	Mycobacterium spp.	Isoniazid
Piperine	NorA, MdeA, Rv ۱۲۵۸c	Mycobacterium spp.	Ciprofloxacin
Tetrandrine	Rv ۲۴۵۹ (jefA), Rv ۳۷۲۸ Rv ۳۰۶۵(mmr)	Mycobacterium spp.	Isoniazid and Ethambutol

کاربرد بالینی آنها می‌شود (۷۱). به عبارتی شکاف‌هایی وجود دارد تا EPI ها در نهایت بتوانند در درمان عفونت‌ها به بالین بیماران بیایند. بنابراین، تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی مهارکننده‌های مؤثر و ایمن ضروری است تا این درمان‌ها در عمل برای بیماران قابل استفاده باشند (۷۲، ۷۳).

های افلاکس و تغییر ساختار آنها، عملکرد مهارکننده‌ها را بی‌اثر کنند (۳۴، ۶۹). اگرچه استفاده از مهارکننده‌های پمپ افلاکس (EPIs) یک استراتژی درمانی جذاب برای مقابله با مقاومت دارویی باکتری‌ها به شمار می‌رود، اما هنوز تا تحقق کامل کاربرد بالینی آنها فاصله وجود دارد. مزیت EPI ها دشواری ایجاد مقاومت باکتریایی در برابر آنها است، اما در مقابل، خاصیت سمی و مشکلات فارماکولوژیکی مانع از

بحث

مایکوباکتریومها، بویژه *M. tuberculosis*، عامل اصلی بیماری سل، از مقاومت ذاتی و اکتسابی بالایی نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیکها برخوردار هستند. این مقاومت عمدتاً ناشی از مجموعه ای از چندین مکانیسم، از جمله غیرفعال سازی یا اصلاح دارو، کاهش نفوذپذیری دیواره سلولی، تغییرات ژنتیکی در ژنهای هدف و افزایش خروج دارو از سلول بواسطه پمپهای افلاکس است. سایر مکانیسمهای مقاومت، شامل مهار فعال سازی پیش داروهایی مانند ایزونیاژید (INH) و پیرازینامید (PZA) به فرم فعال آنها است (۱۰). مقاومت یک ارگانیزم نسبت به داروها ممکن است جزء ویژگی ذاتی آن ارگانیزم و یا ممکن است ناشی از جهشهای خود به خودی یا کسب ژنهای مقاومت از خارج باشد. وقتی یک باکتری مقاومت ذاتی دارد، در این صورت هر عضو از گونه آن باکتری در غیاب هرگونه تغییرات ژنتیکی اضافی، همچنان مقاومت خود را حفظ می کند. به عنوان مثال، تمام مایکوپلاسماها به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام مقاوم هستند زیرا دیواره سلولی آنها فاقد پپتیدوگلیکان است. بطور مشابه، بسیاری از گونههای باکتریایی ساکن روده به آنتی بیوتیکهای آبرزین مانند ماکرولیدها حساس نیستند، زیرا چنین آنتی بیوتیکهایی بطور مؤثر به غشای خارجی این ارگانیزمها نفوذ نمی کنند (۷).

در گذشته تصور می شد که مقاومت ذاتی باکتریها به آنتی بیوتیکها صرفاً ناشی از یک فرایند غیرفعال، مانند نبود هدف دارو در باکتری و یا نفوذناپذیری باکتری نسبت به برخی داروهای خاص است. اما تحقیقات جدید نشان می دهند که سیستمهای خروج فعال (E_f- flux pumps) که بطور ذاتی یا القا شده در برخی باکتریها بیان می شوند، نقش مهمی در این نوع مقاومت دارند. یک مثال معمولی، *Pseudomonas aeruginosa* است که مدت ها تصور می شد، حساسیت کم این باکتری به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها به دلیل نفوذپذیری پایین غشای خارجی نسبت به داروها است، اما اگر ژنی که پمپ MexB را کد می کند، مختل شود، حساسیت آن به بتالاکتامها، تتراسایکلینها، فلوروکینولونها (FQs) و کلرامفنیکل به شدت افزایش می یابد. MexB جزئی از پمپ MexAB-OprM در *P. aeruginosa* است که برخی سموم از جمله آنتی بیوتیکها را از سلول خارج می کند. بطور مشابه، اختلال در ژن کننده ناقل Mdr1 در *Listeria monocytogenes*، MIC، سفوتاکسیم را تا ۱۰ برابر کاهش داده است، این نشان می دهد که مقاومت ذاتی این باکتری به سفالوسپورینها فقط به دلیل پروتئینهای متصل شونده به پنی سیلین نیست، بلکه مکانیسمهای دیگری مانند پمپهای افلاکس نیز درگیر هستند. از اینرو می توان نتیجه گرفت که مقاومت ذاتی بسیاری از باکتریها صرفاً به نفوذپذیری یا عدم وجود هدف دارو محدود

نمی شود، بلکه پمپهای افلاکس نقش کلیدی در کاهش تأثیر آنتی بیوتیکها دارند. ترانسپورترها همچنین ممکن است در نتیجه جهش در ژنهای تنظیم کننده آنها، بیش از حد بیان شوند و در نتیجه نقش مهمی در مقاومت ذاتی و اکتسابی به داروها داشته باشند (۷۴). اپرون mtr در *Neisseria gonorrhoeae* یک سیستم پمپ خروجی وابسته به انرژی را بیان می کند که از پروتئینهای غشای سلولی MtrC، MtrD و MtrE تشکیل شده است. این سیستم، عوامل ضد میکروبی را از سلول خارج می کند. جهش در ژن *mtrR* (که یک سرکوب کننده رونویسی برای *mtrCDE* است) باعث افزایش بیان این پمپ خروجی می شود و در نتیجه، مقاومت نسبت به چندین عامل ضد میکروبی و ترکیبات هیدروفوبیک، از جمله پنی سیلینها، ماکرولیدها و ریفامپسینها ایجاد می شود (۷).

مقاومت ضد میکروبی ناشی از پمپ های افلاکس در ابتدا در *E. coli* گزارش شد (۷۵). اما متعاقباً در طیف وسیعی از ارگانیزم ها، از جمله *P. aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii* هم گزارش شد (۷۶،۷۷). با شناسایی پمپ LfrA در *M. smegmatis* به عنوان واسطه مقاومت فلوروکینولون (۲۰)، توجهات زیادی به سهم پمپ های افلاکس در مایکوباکتریومها وجود آمد (۷۸،۷۹). از آن زمان، مکانیسمهای خروج دارو بعنوان یکی از عوامل اصلی مقاومت دارویی در باکتریها شناخته شده اند، که بویژه در سویه های بیماری زا و مقاوم به چند دارو (MDR) نگرانی های قابل توجهی ایجاد کرده اند (۸۰،۸۱). برخی از پمپهای افلاکس دارای ویژگی اختصاصی برای گروه های خاصی از ترکیبات هستند، اما بسیاری از ترانسپورترها چند منظوره اند و قادرند انواع مختلفی از داروهای ساختاری نامرتبط را از سلول خارج کنند (۸۲). ترانسپورترهای MDR می توانند انواع مختلفی از ترکیبات مضر، از جمله آنتی بیوتیکها را از سلول خارج کنند و بدین ترتیب، سازوکاری مؤثر برای مقاومت باکتریها در برابر درمان های رایج فراهم سازند. از اینرو، این پمپها بعنوان اهداف بالقوه ارزشمندی برای طراحی EPIهای جدید مطرح هستند که می توانند اثربخشی درمان های سنتی را بازگردانند (۸۳).

یکی از استراتژی های امیدوارکننده برای کاهش مقاومت دارویی، مهار فعالیت پمپهای افلاکس با استفاده از EPIهای اختصاصی است؛ ترکیباتی که می توانند با افزایش غلظت درون سلولی داروهای ضد میکروبی، اثربخشی درمان را بهبود بخشند. در سال های اخیر، تلاش های زیادی برای شناسایی EPIهای مؤثر در مایکوباکتریومها صورت گرفته است تا بتوان از آنها بصورت ترکیبی با داروهای ضد سل استفاده کرد (۸۴). برخی ترکیبات می توانند منبع انرژی مورد استفاده برای انتقال دارو را تخلیه کرده و در نتیجه، فعالیت پمپ افلاکس را متوقف کنند. استفاده از این ترکیبات مهار، شواهدی از انتقال دارو و اطلاعاتی درباره منبع انرژی درگیر در این فرآیند ارائه

می‌دهد. رایج‌ترین مهارکننده‌ها شامل:

CCCP (یک جداکننده نیروی محرکه پروتونی Ortho-va-PMF) و nadate و Reserpine (دو مهارکننده پمپ‌های افلاکس وابسته به ATP) و Verapamil (یک مهارکننده شناخته شده P-glycopro-tein انسانی و پمپ‌های افلاکس باکتریایی) هستند. این ترکیبات معمولاً افزایش مقاومت ناشی از پمپ‌های افلاکس را مهار می‌کنند. مطالعه Choudhuri و همکاران نشان داده است که افزودن CCCP و Ortho-vanadate باعث افزایش تجمع INH در *M. smegmatis* می‌شود (۲۷). این یافته نشان می‌دهد که هر دو سیستم وابسته به PMF و ATP در خروج داروی INH از این باکتری نقش دارند. از آنجایی که تنها ۵۰ الی ۶۰ درصد از سویه‌های *M. tuberculosis* sis مقاوم به INH دارای جهش در ژن‌های *inhA*، *katG* و *kasA* هستند، این فرض وجود دارد که مکانیسم‌های دیگری نیز در مقاومت این باکتری به INH نقش داشته باشند (۸۵).

Viveiros و همکاران (۸۶) گزارش دادند داروی Reserpine که پمپ‌های افلاکس وابسته به ATP را مهار می‌کند، سطح مقاومت به INH را در سویه‌های *M. tuberculosis* کاهش می‌دهد. اثبات اینکه مقاومت بالا به INH می‌تواند بصورت تدریجی و از طریق مکانیسمی حساس به Reserpine بدون نیاز به جهش ژنتیکی در سویه‌های حساس *M. tuberculosis* القاء شود، با فرضیه دخالت پمپ‌های افلاکس در مقاومت القایی همخوانی دارد.

یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی در بیماری سل، ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR-TB) و سویه‌های با مقاومت بسیار گسترده (XDR-TB) است. مطالعات نشان داده‌اند که بیان بیش از حد برخی پمپ‌های افلاکس، مانند Rv1258c و P55، ارتباط مستقیمی با مقاومت به داروهای خط اول مانند ایزونیازید، ریفامپین، و فلوروکینولون‌ها دارد (۸۷). داروی جدید بداکیلین (Bedaquiline)، که برای درمان MDR-TB استفاده می‌شود، نیز تحت تأثیر فعالیت پمپ‌های افلاکس قرار دارد. مشخص شده است که پمپ MmpL5 مسئول خروج بداکیلین از سلول‌های مایکوباکتریوم بوده و کاهش اثربخشی این دارو در برخی سویه‌ها را نشان می‌دهد (۸۸، ۸۹).

پیرازینامید (PZA) یکی از مهم‌ترین داروهای مورد استفاده در درمان سل است. این دارو بعنوان پیش‌دارو (Pro-drug) از طریق انتشار غیرفعال وارد *M. tuberculosis* شده و توسط آنزیم پیرازینامیداز/نیکوتینامیداز که توسط ژن *pncA* کد می‌شود، به ترکیب فعال پیرازینوئیک اسید (POA) تبدیل می‌شود (۹۰). مکانیسم اصلی مقاومت به PZA به دلیل جهش‌هایی است که در نوکلئوتید ۵۶۱ از ژن *pncA* یا ناحیه پروموتور آن رخ می‌دهد (۹۱، ۹۲). Hirano و همکاران (۹۳) گزارش کردند که ۷۲ تا ۹۷ درصد از ایزوله‌های بالینی *M. tuberculosis* مقاوم به PZA، حامل جهشی در ناحیه کدکننده ژن *pncA* یا در ناحیه پروموتور آن هستند. در مقابل، Raynaud

و همکاران (۹۴) دریافتند که ایزوله‌های با سطح بالای مقاومت به PZA فاقد جهش در ژن *pncA* هستند. از اینرو می‌توان نتیجه گرفت، مکانیسم‌های دیگری در این سویه‌ها که جهش در ژن *pncA* نداشته‌اند در مقاومت به PZA دخیل بوده‌اند. این مکانیسم‌ها ممکن است شامل مشکل در جذب PZA، تنظیم ژن *pncA*، خروج POA از سلول یا جهش‌هایی در اهداف ناشناخته برای POA باشند. باکتری *M. tuberculosis* بطور ذاتی به PZA مقاوم است، اگرچه پیش‌داروی PZA را به POA تبدیل می‌کند، اما بدلیل داشتن یک مکانیسم خروجی بسیار فعال POA، آنرا به بیرون پمپ کرده و در خود انباشته نمی‌کند (۷). همچنین نشان داده شده است که پمپ افلاکس EmrAB-TolC در *E. coli* در مقاومت به POA نقش مهمی دارد (۹۵).

مطالعات دیگر نشان داده‌اند که PZA می‌تواند پتانسیل غشای سلولی در *M. tuberculosis* را کاهش داده و حساسیت باکتری نسبت به POA را افزایش دهد. در این زمینه، مهارکننده‌های انرژی مانند DCCD (مهارکننده F0F1-ATP سنتاز)، Rotenone (مهارکننده NADH دهیدروژناز کمپلکس I)، Azide (مهارکننده سیتوکروم اکسیداز C) و ترکیبات دیگری مانند CCCP، دی‌نیتروفلن (DNP)، والینومایسین و سیانید قادرند فعالیت PZA را بطور قابل توجهی تقویت کنند (۹۰). در واقع، این تأثیر تقویتی به دلیل کاهش پتانسیل غشای سلولی است که موجب می‌شود باکتری‌های *M. tubercu* *losis* نسبت به اثرات کاهش انرژی ناشی از POA حساس‌تر شوند. علاوه بر این، تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که (Bedaquiline) TMC207، یک مهارکننده ATP سنتاز، می‌تواند با PZA هم‌افزایی کند. این یافته‌ها مدل PZA را تقویت می‌کنند و نشان می‌دهند که کاهش انرژی در سلول‌های باکتریایی نقش مهمی در افزایش اثر درمانی PZA دارد. نکته مهم این است که اثرات مهارکننده‌های انرژی در تقویت فعالیت PZA خاص است و این مهارکننده‌ها اثرات مشابهی بر داروهای دیگر مانند INH یا RIF نداشته‌اند (۹۶).

ریفامپین (RIF) یکی دیگر از داروهای خط اول و اصلی ضد سل است. در بیش از ۹۵٪ از ایزوله‌های مقاوم به RIF، جهش‌هایی در ژن *rpoB* که زیر واحد β آنزیم RNA پلی‌مراز را کد می‌کند، مشاهده شده است (۹۷). میزان تجمع RIF در *M. tuberculosis*، *M. aurum* و *M. smegmatis* را بررسی کرده‌اند و دریافت‌اند که تجمع RIF در حضور مهارکننده پمپ افلاکس Reserpine افزایش می‌یابد. از اینرو می‌توان نتیجه گرفت که پمپ‌های افلاکس در انتقال این دارو نقش مؤثری دارند.

با توجه به نقش محوری پمپ‌های افلاکس در مقاومت دارویی مایکوباکتریوم‌ها، بویژه در سویه‌های MDR و XDR، به نظر می‌رسد که این پمپ‌ها نه تنها در مقاومت ذاتی، بلکه در شکل‌گیری مقاومت اکتسابی نیز نقش کلیدی دارند. با این حال، تناقضاتی مانند

فعالیت داروها را بازیابی کند، بلکه با کاهش انتخاب جهش‌های مقاوم، روند گسترش مقاومت را نیز کند می‌سازد. همچنین برخی مهارکننده‌های افلاکس علاوه بر توانایی در مهار خروج دارو، موجب تقویت عملکرد ماکروفاژهای آلوده می‌شوند، که در بافت هدف عفونت سل (ریه) اهمیتی مضاعف دارد. با وجود این مزایا، تاکنون هیچ یک از مهارکننده‌های افلاکس به شکل گسترده وارد کاربرد بالینی برای درمان سل نشده‌اند. مهم‌ترین موانع در این مسیر، سمیت بالا، عدم اختصاصیت به باکتری‌های پاتوژن و تداخل با انتقال‌دهنده‌های انسانی است. رویکردهایی نظیر سنتز مشتقات ایمن‌تر از ترکیبات موجود، بهره‌گیری از ترکیبات مشتق از منابع طبیعی در مسیر غلبه بر این چالش‌ها بسیار امید بخش هستند. در نهایت، طراحی مهارکننده‌هایی که با داروهای موجود از نظر فارماکوکینتیک همخوانی داشته باشند، می‌تواند به ایجاد رژیم‌های درمانی کوتاه‌تر، مؤثرتر و با احتمال کمتر بروز مقاومت دارویی کمک کند. همچنین، ضروری است که در فرایند طراحی داروهای جدید، قابلیت افلاکس شدن آنها به عنوان یک ویژگی کلیدی در نظر گرفته شود تا از تکرار تجربه‌هایی مانند کاهش اثربخشی بداکیلین جلوگیری شود. بنابراین، در چشم‌انداز آینده، مهار پمپ‌های افلاکس بعنوان یکی از ارکان اصلی راهبردهای نوین درمان عفونت‌های میکوباکتریایی بویژه سل باید مد نظر قرار گیرد.

مقاومت به PZA در سویه‌های فاقد جهش در ژن *pncA* یا فعالیت پمپ‌های افلاکس در خروج POA بدون شواهد واضح از بیان بیش‌ازحد ژن‌های شناخته‌شده، بر پیچیدگی مکانیسم‌های مقاومت و وجود مسیرهای ناشناخته تأکید می‌کند.

محدودیت‌های مطالعات کنونی، از جمله وابستگی به مدل‌های آزمایشگاهی و کمبود داده‌های بالینی درباره اثربخشی EPI‌ها، کارایی این ترکیبات را در شرایط بالینی مبهم می‌سازد. همچنین، اطلاعات محدودی درباره اختصاصیت سوبسترای پمپ‌ها و تأثیر محیط میزبان وجود دارد. از اینرو، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات آینده بر شناسایی پمپ‌های اختصاصی، بررسی تعاملات شبکه‌ای آنها و نقش محیط میزبان، و توسعه EPI‌های ایمن با قدرت مهاري بالا در شرایط *in vivo* متمرکز شوند. همچنین طراحی درمان‌های ترکیبی با EPI‌ها و داروهای خط اول یا جدید مانند بداکیلین، می‌تواند مسیر تازه‌ای برای مقابله با مقاومت دارویی در درمان بیماری‌های ناشی از میکوباکتریوم‌ها فراهم آورد.

نتیجه گیری

درک نقش پمپ‌های افلاکس در ایجاد مقاومت دارویی در میکوباکتریوم‌ها، زمینه‌ای نوین و رو به گسترش در مبارزه با سل، بویژه اشکال مقاوم به چند دارو (MDR/XDR) را فراهم کرده است. مطالعات متعدد نشان می‌دهند که مهار این پمپ‌ها نه تنها می‌تواند

منابع

1. Sachan RSK, Mistry V, Dholaria M, Rana A, Devgon I, Ali I, et al. Overcoming Mycobacterium tuberculosis Drug Resistance: Novel Medications and Repositioning Strategies. ACS Omega. 2023;8(36):32244-57.
2. Williams PM, Pratt RH, Walker WL, Price SF, Stewart RJ, Feng PI. Tuberculosis - United States, 2023. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2024;73(12):265-70.
3. Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, Machado D, Couto I, Ainsa J, et al. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10(9):983-98.
4. Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. J Antimicrob Chemother. 2011;66(7):1417-30.
5. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. Nat Rev Microbiol. 2018;16(9):523-39.
6. Balganes M, Dinesh N, Sharma S, Kuruppath S, Nair AV, Sharma U. Efflux pumps of Mycobacterium tuberculosis play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(5):2643-51.
7. De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(1):36-52.
8. Laws M, Jin P, Rahman KM. Efflux pumps in Mycobacterium tuberculosis and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. Trends Microbiol. 2022;30(1):57-68.
9. Li X, Li P, Ruan C, Xie Lx, Gu Y, Li J, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv0191 is an efflux pump of major facilitator superfamily transporter regulated by Rv1353c. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2019;667:59-66.
10. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009;13(11):1320-30.
11. Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch VM, et al. Mycobacterium tuberculosis isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. Infection. 2004;32(2):109-11.
12. Sandhu P, Akhter Y. The drug binding sites and transport mechanism of the RND pumps from Mycobacterium tuberculosis: Insights from molecular dynamics simulations. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2016;592:38-49.
13. Wang S, Wang K, Song K, Lai ZW, Li P, Li D, et al. Structures of the Mycobacterium tuberculosis efflux pump EfpA reveal the mechanisms of transport and inhibition. Nature Communications. 2024;15(1):7710.
14. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev. 2006;19(2):382-402.
15. Rao N, Bhosale R. Targeting mycobacterial efflux system to

- enhance tuberculosis therapy: Review article. *International journal of health sciences*. 2024;8(S1):830-53.
16. Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol*. 2001;152(3-4):205-10.
 17. Hollenstein K, Dawson RJP, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007;17(4):412-8.
 18. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*. 2015;7:14.
 19. Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004;14(4):426-31.
 20. Liu J, Takiff HE, Nikaido H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J Bacteriol*. 1996;178(13):3791-5.
 21. De Rossi E, Blokpoel MC, Cantoni R, Branzoni M, Riccardi G, Young DB, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(8):1931-7.
 22. Ainsa JA, Blokpoel MC, Otal I, Young DB, De Smet KA, Martín C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1998;180(22):5836-43.
 23. Silva PE, Bigi F, Santangelo MP, Romano MI, Martín C, Cataldi A, et al. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(3):800-4.
 24. De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martín C, Ainsa JA, et al. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med*. 2002;8(11):714-24.
 25. De Rossi E, Branzoni M, Cantoni R, Milano A, Riccardi G, Ciferri O. mmr, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *J Bacteriol*. 1998;180(22):6068-71.
 26. Banerjee SK, Bhatt K, Misra P, Chakraborti PK. Involvement of a natural transport system in the process of efflux-mediated drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Gen Genet*. 2000;262(6):949-56.
 27. Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *draA* and *drdB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*. 2002;367(Pt 1):279-85.
 28. Pasca MR, Guglielame P, Arcesi F, Bellinzoni M, De Rossi E, Riccardi G. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(8):3175-8.
 29. Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, et al. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2012;7(4):e34538.
 30. Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci*. 2013;38(3):151-9.
 31. Ranaweera I, Shrestha U, Ranjana KC, Kakarla P, Willmon TM, Hernandez AJ, et al. Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Trends Cell Mol Biol*. 2015;10:131-40.
 32. Machado D, Coelho TS, Perdigão J, Pereira C, Couto I, Portugal I, et al. Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8.
 33. Adhikary A, Biswal S, Ghosh AS. The Putative Major Facilitator Superfamily (MFS) Protein Named Rv1877 in *Mycobacterium tuberculosis* Behaves as a Multidrug Efflux Pump. *Curr Microbiol*. 2022;79(11):324.
 34. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res*. 2019;149(2):129-45.
 35. Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 2011;77:1-60.
 36. Machado D, Lecorche E, Mougari F, Cambau E, Viveiros M. Insights on *Mycobacterium leprae* Efflux Pumps and Their Implications in Drug Resistance and Virulence. *Front Microbiol*. 2018;9:3072.
 37. Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole ST. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2979-81.
 38. Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, et al. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem*. 2001;276(23):19845-54.
 39. Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol*. 1999;34(2):257-67.
 40. Pasca MR, Guglielame P, De Rossi E, Zara F, Riccardi G. mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4775-7.
 41. Betts JC, McLaren A, Lennon MG, Kelly FM, Lukey PT, Blakemore SJ, et al. Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(9):2903-13.
 42. Alvarez-Ortega C, Olivares J, Martínez JL. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front Microbiol*. 2013;4:7.
 43. Kermani AA, Macdonald CB, Burata OE, Ben Koff B, Koide A, Denbaum E, et al. The structural basis of promiscuity in small multidrug resistance transporters. *Nat Commun*. 2020;11(1):6064.
 44. Chetri S. The culmination of multidrug-resistant efflux pumps vs. meager antibiotic arsenal era: Urgent need for an improved new generation of EPIs. *Front Microbiol*. 2023;14:1149418.
 45. Kermani AA, Macdonald CB, Gundepudi R, Stockbridge RB. Guanidinium export is the primal function of SMR family transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(12):3060-5.
 46. Gillings MR. Class 1 integrons as invasive species. *Curr Opin Microbiol*. 2017;38:10-5.
 47. Zhu YG, Zhao Y, Li B, Huang CL, Zhang SY, Yu S, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nat Microbiol*. 2017;2:16270.
 48. Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(9):1814-38.
 49. Bay DC, Turner RJ. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC Evol Biol*. 2009;9:140.
 50. Jack DL, Yang NM, Saier MH, Jr. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem*. 2001;268(13):3620-39.
 51. Ubarretxena-Belandia I, Baldwin JM, Schuldiner S, Tate CG. Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *Embo j*. 2003;22(23):6175-81.
 52. Yerushalmi H, Lebendiker M, Schuldiner S. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem*. 1995;270(12):6856-63.

53. Lytvynenko I, Brill S, Oswald C, Pos KM. Molecular basis of polyspecificity of the Small Multidrug Resistance Efflux Pump AbeS from *Acinetobacter baumannii*. *J Mol Biol*. 2016;428(3):644-57.
54. Lin MF, Lin YY, Tu CC, Lan CY. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017;50(2):224-31.
55. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4449-62.
56. Banigan JR, Gayen A, Cho MK, Traaseth NJ. A structured loop modulates coupling between the substrate-binding and dimerization domains in the multidrug resistance transporter EmrE. *J Biol Chem*. 2015;290(2):805-14.
57. Jaglic Z, Cervinkova D. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds--the qac genes and their role: a review. *Veterinárni medicína*. 2012;57(6).
58. Ninio S, Rotem D, Schuldiner S. Functional analysis of novel multidrug transporters from human pathogens. *J Biol Chem*. 2001;276(51):48250-6.
59. Anandapadamanaban M, Pilstål R, Andresen C, Trehwella J, Moche M, Wallner B, et al. Mutation-Induced Population Shift in the MexR Conformational Ensemble Disengages DNA Binding: A Novel Mechanism for MarR Family Derepression. *Structure*. 2016;24(8):1311-21.
60. Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Maillard JY, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria. *Future Microbiol*. 2016;11(1):81-92.
61. Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(5):763-8.
62. 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.
63. Li G, Zhang J, Li C, Guo Q, Jiang Y, Wei J, et al. Antimycobacterial activity of five efflux pump inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *The Journal of Antibiotics*. 2016;69(3):173-5.
64. Gupta S, Cohen KA, Winglee K, Maiga M, Diarra B, Bishai WR. Efflux Inhibition with Verapamil Potentiates Bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(1):574-6.
65. Amaral L, Viveiros M, Kristiansen JE. Phenothiazines: potential alternatives for the management of antibiotic resistant infections of tuberculosis and malaria in developing countries. *Tropical Medicine & International Health*. 2001;6(12):1016-22.
66. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular microbiology*. 1999;31(1).
67. Rodrigues L, Ramos J, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiology*. 2011;11(1):35.
68. Rodrigues L, Wagner D, Viveiros M, Sampaio D, Couto I, Vavra M, et al. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61(5):1076-82.
69. Pule CM, Sampson SL, Warren RM, Black PA, van Helden PD, Victor TC, et al. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;71(1):17-26.
70. Osei Sekyere J, Amoako DG. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Front Microbiol*. 2017;8:228.
71. Rodrigues L, Cravo P, Viveiros M. Efflux pump inhibitors as a promising adjunct therapy against drug resistant tuberculosis: a new strategy to revisit mycobacterial targets and repurpose old drugs. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2020;18(8):741-57.
72. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(7):910-8.
73. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med*. 2011;6.
74. Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol*. 2000;37(2):219-25.
75. McMurry L, Petrucci RE, Jr., 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.
76. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):947-53.
77. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(9):1948-53.
78. Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, McEvoy CR, Van Helden PD, Victor TC. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3181-9.
79. da Silva PE, Von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63(1):1-9.
80. Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2002;92 Suppl:65s-71s.
81. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 1994;264(5157):382-8.
82. Neyfakh AA. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol Microbiol*. 2002;44(5):1123-30.
83. 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.
84. Rindi L. Efflux Pump Inhibitors Against Nontuberculous Mycobacteria. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12).
85. Slayden RA, Barry CE, 3rd. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2000;2(6):659-69.
86. Viveiros M, Portugal I, Bettencourt R, Victor TC, Jordaan AM, Leandro C, et al. Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(9):2804-10.
87. Li G, Zhang J, Guo Q, Jiang Y, Wei J, Zhao LL, et al. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS One*. 2015;10(2):e0119013.
88. Worley MV, Estrada SJ. Bedaquiline: a novel antitubercular agent for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Pharmacotherapy*. 2014;34(11):1187-97.
89. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HW, Neefs JM, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*.

2005;307(5707):223-7.

90. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4):Mgm2-0023-2013.

91. Che Y, Bo D, Lin X, Chen T, He T, Lin Y. Phenotypic and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Ningbo, China. *BMC Infectious Diseases*. 2021;21(1):605.

92. Kim NY, Kim DY, Chu J, Jung S-H. *pncA* Large Deletion is the Characteristic of Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* belonging to the East Asian Lineage. *Infect Chemother*. 2023;55(2):247-56.

93. Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*. 1997;78(2):117-22.

94. Raynaud C, Lanéeelle MA, Senaratne RH, Draper P, Lanéeelle G, Daffé M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology (Reading)*. 1999;145 (Pt 6):1359-67.

95. Schaller A, Guo M, Gisanrin O, Zhang Y. *Escherichia coli* genes involved in resistance to pyrazinoic acid, the active component of the tuberculosis drug pyrazinamide. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;211(2):265-70.

96. Wade MM, Zhang Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(5):936-41.

97. Piddock LJ, Williams KJ, Ricci V. Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45(2):159-65.