



วารสาร ไทยไคเชียนนิเพนธ์

ปีที่ 2 ฉบับเดือนมิถุนายน 2548 (หน้า 131-142)

บทความพิเศษวิชาการ สำหรับนักศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์



## ปั๊มขับยาปฏิชีวนะและสารยับยั้ง

### (Antibiotic Efflux Pumps and Inhibitors)

ภก.ผศ.ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราชา

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

รหัส 1-000-SPU-000-0506-02

จำนวน 2.5 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง 1 มิถุนายน พ.ศ. 2548

วันที่หมดอายุ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2550

#### วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. อธิบายความหมาย ประเภทและการทำงานของปั๊มขับยาปฏิชีวนะได้
2. อธิบายความสำคัญของปั๊มขับยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียต่อปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะได้
3. อธิบายวัตถุประสงค์ของการพัฒนาสารยับยั้งปั๊มขับยาปฏิชีวนะ และกระบวนการพัฒนาโดยสังเขปได้

#### บทคัดย่อ

ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันทำให้ยาหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการรักษาลดลงจนอาจไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ กลไกหนึ่งของการดื้อยาเกิดจากการที่แบคทีเรียใช้ปั๊มขับยาออกจากเซลล์เพื่อลดระดับยาภายในเซลล์ให้ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ยาจะออกฤทธิ์ได้ การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างและการทำงานของปั๊มขับยานำไปสู่การแสวงหาและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของปั๊ม ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาใหม่ที่สามารถเอาชนะการดื้อยาด้วยกลไกนี้หรืออาจนำไปใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะบางชนิดที่มีมาแต่เดิม บทความนี้อธิบายคุณสมบัติ ประเภทของปั๊มขับยา และความสำคัญต่อปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ รวมถึงการพัฒนาสารยับยั้งปั๊มขับยาและตัวอย่างในปัจจุบัน

#### คำสำคัญ

ปั๊มขับยา, ยาปฏิชีวนะ, สารยับยั้ง, การดื้อยา

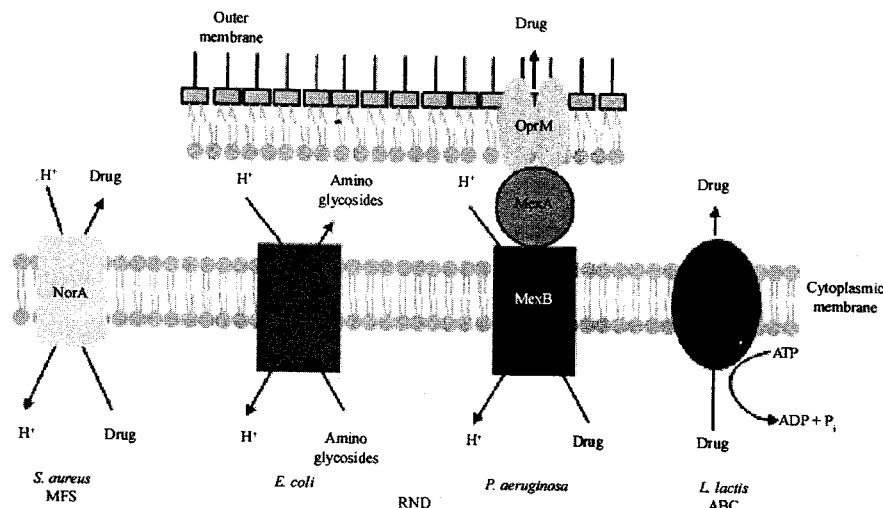
#### บทนำ

ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบันทำให้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการแสวงหายาใหม่ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากเดิม หรือสามารถเอาชนะการดื้อยาของจุลชีพได้ การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียอาจเกิดจาก (1) การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายหรือตัวรับของยา เช่น การที่แบคทีเรียทำให้โปรตีนที่จับกับเพนิซิลลิน (penicillin-binding protein) โรโบโซมหรือ b-subunit ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ลดสัมพรรคภาพ

(affinity) ต่อยากลุ่มเพนนิซิลลิน เตตราซัยคลินและควิโนโลน ตามลำดับ (2) การเปลี่ยนแปลงหรือทำลายยาให้หมดฤทธิ์หรือมีฤทธิ์ลดลง เช่น เอ็นไซม์เบต้าแลคแทมเมสสามารถทำลายโครงสร้างวงแหวนเบต้าแลคแทมของยาากลุ่มเพนนิซิลลิน และเซฟาโลสปอริน หรือเอ็นไซม์ที่สามารถเติมหมู่ฟอสฟอริล อะดีนิลหรืออะเซทิลให้กับยาากลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ และ (3) การขับยาออกจากเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อให้ระดับยาไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น การใช้ปั๊มขับยาออกจากเซลล์ ในอดีตการศึกษาส่วนใหญ่มักให้ความสำคัญกับกลไกการดื้อยาสองแบบแรกจนสามารถออกแบบและพัฒนายาให้สามารถจับกับเป้าหมายเดิมและเป้าหมายที่เปลี่ยนไปได้ดีขึ้น หรือมีโครงสร้างที่ทนต่อการถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโดยจุลชีพ ตลอดจนมีการใช้สารยับยั้งเอ็นไซม์ที่ทำลายยา เช่น การใช้ clavulanic acid เพื่อยับยั้งเอ็นไซม์เบต้าแลคแทมเมสร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มเพนนิซิลลิน ส่วนกลไกการดื้อยาโดยปั๊มขับยานั้นเพิ่งได้รับความสนใจในเวลาต่อมา สมมติฐานแรกในปี ค.ศ.1978 กล่าวว่าโปรตีนบางชนิดที่เมมเบรนของแบคทีเรียชนิดกรัมลบทำหน้าที่ขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ เช่น การขับยาเตตราซัยคลินออกของเชื้อ *Escherichia coli*<sup>1</sup> หลังจากการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าแบคทีเรียก่อโรคเกือบทุกชนิดมีปั๊มทำหน้าที่กำจัดยาปฏิชีวนะและสารพิษบางชนิดออกจากเซลล์ โดยเฉพาะสำหรับยาากลุ่มเตตราซัยคลิน เบต้าแลคแทม มาโครไลด์ ฟลูออโรควิโนโลน และอะมิโนกลัยโคไซด์<sup>2</sup> ปัจจุบันความพยายามในการแสวงหาและพัฒนาสารที่สามารถยับยั้งปั๊มขับยาจึงเกิดขึ้นด้วยความหวังที่จะทำให้ยาปฏิชีวนะบางชนิดที่ประสบปัญหาการดื้อยาโดยแบคทีเรียด้วยกลไกนี้กลับมามีประสิทธิภาพในการรักษาอีกครั้ง

### คุณสมบัติและประเภทของปั๊มขับยา

ปั๊มขับยา (efflux pump) หรืออาจเรียกว่า efflux protein เป็นโปรตีนที่แทรกตัวอยู่ในเมมเบรน (transmembrane protein) ทำหน้าที่ขับยาปฏิชีวนะหรือสารพิษบางชนิดออกจากเซลล์ พบได้ทั้งในเซลล์ยูแคริโอตและโพรแคริโอต ในยูแคริโอตมีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับบทบาทของ P-glycoprotein<sup>3</sup> และ multidrug resistance-associated protein (MRP)<sup>4</sup> ในการทำให้เซลล์ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับปั๊มขับยาในยูแคริโอตอาจนำไปใช้อธิบายเภสัชจลนศาสตร์ของยาปฏิชีวนะและยาต้านมะเร็งได้ ส่วนการศึกษาปั๊มขับยาในโพรแคริโอตหรือแบคทีเรียนั้นมักมุ่งไปที่บทบาทในการดื้อยาปฏิชีวนะ จากการศึกษาพบว่าปั๊มขับยาของแบคทีเรียอาจทำหน้าที่ในการขับสารใดสารหนึ่งออกจากเซลล์ หรือเป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติต่างๆ ใกล้เคียงกัน เช่น โครงสร้างทางเคมี ประจุ หรือความไม่ชอบน้ำ ไปจนถึงสารอื่นๆ ที่มีโครงสร้างไม่สัมพันธ์กันก็ได้ การพิจารณาโดยอาศัยคุณสมบัติด้านกลไกและความต้องการพลังงานในการทำงานทำให้จำแนกปั๊มขับยาออกได้เป็น 2 ประเภท คือปั๊มที่ใช้พลังงานจากการสลาย ATP (adenosine triphosphate) ได้แก่ ATP-binding cassette proteins และปั๊มที่ใช้แรงขับจากปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าซึ่งเกิดจากความแตกต่างระหว่าง pH ภายในและภายนอกเซลล์ โดยเมื่อปั๊มทำงานจะเกิดการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ควบคู่ไปกับการขับยาออกจากเซลล์ ปั๊มขับยาประเภทหลังนี้แบ่งออกได้เป็น 5 ชูเปอร์แฟมิลี ประกอบด้วย small multidrug resistance (SMR) multidrug endosomal transporter (MET) multi antimicrobial resistance (MAR) resistance nodulation division (RND) และ major facilitator superfamily (MFS) (รูปที่ 1) จุลชีพชนิดหนึ่งอาจมีปั๊มขับยามากกว่าหนึ่งแบบ นอกจากนี้ปั๊มขับยาบางชนิดอาจทำงานร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์ทำให้ประสิทธิภาพในการขับยาเพิ่มขึ้น เช่น RND ทำงานร่วมกับ membrane fusion protein และ outer membrane factor ในการขับยาข้ามเมมเบรนชั้นในและชั้นนอกโดยไม่เกิดการสะสมในช่องว่างเพอริพลาซึม การเรียกชื่อปั๊มขับยามักเรียกตามชนิดของสารที่ถูกขับโดยปั๊มนั้นๆ เช่น โปรตีน AcrA และ AcrB สามารถขับ acridine โปรตีน NorA สามารถขับ norfloxacin หรือ Qac ทำหน้าที่ขับสารประกอบ quaternary ammonium และ disinfectants บางชนิดออกจากเซลล์



รูปที่ 1 ปัมป์ขับยาบางชนิดที่พบในแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Lactobacillus lactis* ปัมป์ขับยา NorA จัดอยู่ใน major facilitator superfamily (MFS) ส่วน AcrD และ MexAB-OprM จัดอยู่ใน resistance nodulation division (RND) ปัมป์ทั้งสามชนิดใช้การแลกเปลี่ยนโปรตอนเป็นแรงขับในการกำจัดยาออกจากเซลล์ ส่วน LmrA ซึ่งเป็น ABC-transporter ใช้พลังงานจากการสลาย ATP ในการทำงาน<sup>5</sup>

### ความสำคัญของปัมป์ขับยาต่อการดื้อยาปฏิชีวนะ

แม้ว่าปัมป์ขับยาจะมีผลในระดับปานกลางต่อการดื้อยาปฏิชีวนะเมื่อเทียบกับกลไกการดื้อยาแบบอื่นๆ เช่น อาจทำให้ความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อที่ต่ำที่สุดหรือ MIC (minimal inhibitory concentration) ของยาเพิ่มขึ้น 1-64 เท่า<sup>6,7</sup> แต่ประเด็นที่ควรคำนึงถึงเกี่ยวกับความสำคัญของการดื้อยาดังกล่าวนี้ ได้แก่

1. การดื้อยาปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (intrinsic resistance) ในเชื้อแต่ละชนิดมักเกิดจากการที่แบคทีเรียมีระบบปัมป์ขับยาซึ่งอาจมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องตามลักษณะของเชื้อเอง (constitutive) หรือเมื่อถูกเหนี่ยวนำ (inducible) เช่น โดยปกติ *Pseudomonas aeruginosa* ทนต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดแต่เมื่อทำลายยีนที่ทำหน้าที่สร้างปัมป์ขับยา MexB พบว่าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบต้าแลคแทม เตตราไซคลิน ฟลูออโรควิโนโลนและคลอแรมเฟนิคอลเพิ่มขึ้นอย่างมาก<sup>8</sup> เช่นเดียวกับการทำลายยีนที่ทำหน้าที่สร้าง MdrL ใน *Listeria monocytogenes* ที่ทำให้ค่า MIC ของยา cefotaxime ลดลง 10 เท่า<sup>9</sup>

2. ระดับการดื้อยาอาจเพิ่มขึ้นหากแบคทีเรียชนิดหนึ่งมีปัมป์ขับยาหลายชนิดทำงานร่วมกัน ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียกรัมลบบางชนิดใช้ปัมป์ขับยาแบบ RND ขับยาจากซัยโทพลาซึมไปสู่เพอริพลาซึมในขั้นตอนแรก แล้วจึงใช้ปัมป์แบบ MFS ขับยาออกจากบริเวณนี้ออกสู่นอกเซลล์ นอกจากนี้ปัมป์ขับยาแต่ละระบบอาจทำงานเป็นอิสระจากกัน นั่นคือหากระบบหนึ่งถูกยับยั้งอาจมีระบบอื่นๆ ทำหน้าที่ทดแทนได้

3. การขับยาออกโดยปัมป์อาจเกิดขึ้นร่วมกับกลไกการดื้อยาแบบอื่นๆ ทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะในระดับที่สูงขึ้นและ/หรือเกิดการดื้อต่อยามากกว่าหนึ่งชนิด เช่น การดื้อยาในกลุ่มฟิเนมของ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นผลมาจากการขับยาออกด้วยปัมป์ขับยาชนิด MexAB-OprM ร่วมกับการทำลายยาด้วยเอนไซม์เบต้าแลคแทมเมส หรือการที่เชื้อดื้อยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนเกิดจากการขับยาออกโดยปัมป์ขับยาร่วมกับการกลายพันธุ์ (mutation) ของเอนไซม์ดีเอ็นเอ-ไจเรสและ/หรือโทโปไอโซเมอเรส IV

4. ยาปฏิชีวนะเองอาจเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของปัมป์ขับยาได้โดยเกิดอันตรกิริยากับระบบที่ควบคุมยีนซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างปัมป์นั้นๆ นอกจากนี้การที่เชื้อสร้างปัมป์ขับยาในระดับที่มากกว่าปกติอาจเป็นผลมาจาก

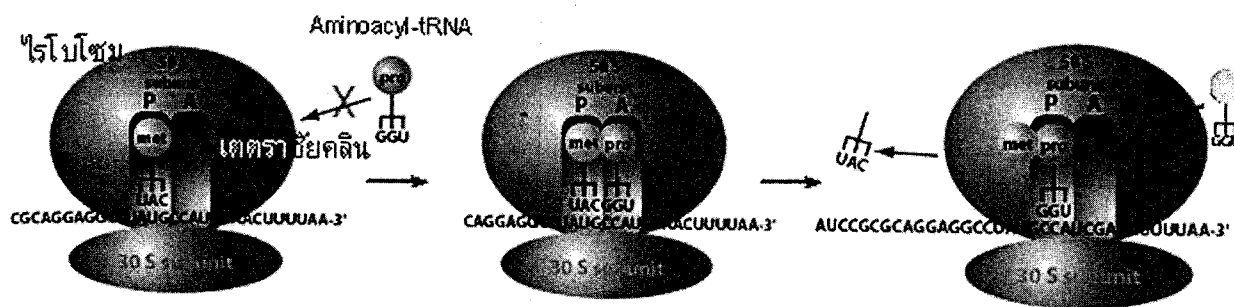
การกลายพันธุ์ของยีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุม (regulatory gene) ในระบบดังกล่าว เช่น สาเหตุสำคัญที่ทำให้ *Pseudomonas aeruginosa* ตื้อยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในผู้ป่วย cystic fibrosis คือ การกลายพันธุ์ของยีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุมยีนสำหรับการสร้าง MexCD-OprJ และ MexEF-OprN เป็นต้น การกลายพันธุ์ของยีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุมนี้อาจกลายเป็นปัญหาที่รุนแรงเพิ่มขึ้นหากยีนนั้นสามารถควบคุมหรือไปมีผลต่อระบบที่ประกอบด้วยยีนหลายยีนหรือโอเพอรอน หลายโอเพอรอนที่มีการควบคุมร่วมกัน ซึ่งเรียกว่า regulon เช่น mar regulon ใน *Escherichia coli* สามารถควบคุมการแสดงออกได้ทั้ง AcrB, porins และปั๊มขับยาอื่น ๆ<sup>10</sup>

5. การดื้อยาปฏิชีวนะโดยปั๊มขับยาสามารถถ่ายทอดและแพร่กระจายระหว่างแบคทีเรียได้ง่ายเนื่องจากยีนสำหรับสร้างปั๊มขับยามักอยู่บนพลาสมิด (เช่น ยีนสำหรับ Tet transporters ของแบคทีเรียชนิดกรัมบวก) หรือเป็นหน่วยพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนย้ายจากตำแหน่งหนึ่งไปยังอีกตำแหน่งหนึ่งได้ ซึ่งเรียกว่า transposon บนพลาสมิด (เช่น ยีนสำหรับ Tet transporters ของแบคทีเรียชนิดกรัมลบ) หรืออยู่บนโครโมโซม (เช่น ยีน *mef* ของ *Streptococcus pneumoniae*) และที่สำคัญไปกว่านั้นคือการดื้อยาโดยปั๊มขับยาอาจถ่ายทอดจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีความแตกต่างทางความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogeny) ได้ เช่น การแพร่กระจายของปั๊มขับยาบางชนิดสำหรับยาคลอสไตรซินได้เกิดเฉพาะระหว่างแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคคัสซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมบวกด้วยกันเท่านั้นแต่ยังถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียกรัมลบได้ด้วย<sup>11</sup> นอกจากนี้การแพร่กระจายของการดื้อยาโดยกลไกปั๊มขับยายังอาจเกิดขึ้นพร้อมกับการดื้อยาโดยกลไกอื่นๆ ด้วยหากยีนที่เกี่ยวข้องอยู่ใกล้กันบน transposon ขนาดใหญ่

### การพัฒนาสารยับยั้งปั๊มขับยา

จากแนวคิดที่จะทำให้ยาปฏิชีวนะบางชนิดซึ่งประสบปัญหาการดื้อยาโดยแบคทีเรียด้วยกลไกนี้กลับมามีประสิทธิภาพอีกครั้ง ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาสารที่สามารถยับยั้งปั๊มขับยาซึ่งอาจมีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยตัวเอง หรือไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพแต่ใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่มีอยู่เดิมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยานั้นก็ได้ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือสารยับยั้งควรออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์แบคทีเรียและไม่ส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์ยูแคริโอตเพื่อลดความเป็นพิษและอาการอันไม่พึงประสงค์อันอาจเกิดจากการใช้ยา ในกรณีที่สารยับยั้งปั๊มขับยาจะถูกนำไปใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ สารยับยั้งและยาปฏิชีวนะนั้นควรมีสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ใกล้เคียงกัน เช่น การดูดซึม การกระจายตัวเพื่อให้การออกฤทธิ์เป็นไปอย่างควบคุมประสานกัน

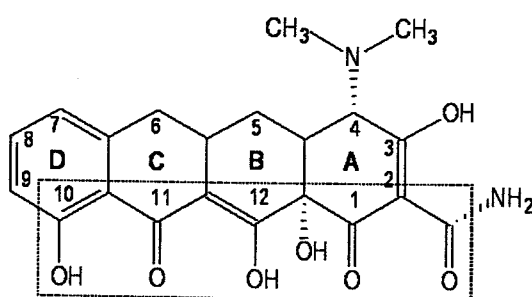
ในที่นี้ขอยกตัวอย่างเกี่ยวกับยาคลอสไตรซิน ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1948 เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเนื่องจากยาจะไปขัดขวางการจับกันระหว่าง aminoacyl-tRNA กับตำแหน่ง A บนไรโบโซมในขั้นตอนการแปลรหัส (รูปที่ 2) เนื่องจากเตตราซัยคลินออกฤทธิ์กว้างครอบคลุมทั้งต่อแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบ คลามัยเตีย ไมโคพลาสมา ริกเกตเซีย และโปรโตซัว อีกทั้งมีผลข้างเคียงต่ำ ทำให้ยาคลอสไตรซินถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายจนทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาขึ้นในปัจจุบัน กลไกที่ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยาคลอสไตรซินได้แก่ การที่เชื้อสร้างโปรตีนบางชนิดมาปกป้องไรโบโซมจากการจับของยา และการขับยาออกจากเซลล์ด้วยปั๊มขับยา ปัจจุบันพบว่ามียีนอย่างน้อย 19 ยีน เป็นรหัสของปั๊มชนิดต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่ขับยาคลอสไตรซิน เช่น *tetA tetB tetC* และ *tcr3* เป็นต้น ปั๊มขับยาเตตราซัยคลินเกือบทุกชนิดขับยาออกในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่มีประจุบวก เช่น สารประกอบเชิงซ้อนของยากับแคลเซียมควบคุมกับการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์โดยใช้ปั๊มขับยาชนิด 12-transmembrane proteins หรือ 14-transmembrane proteins ยกเว้นปั๊มขับยาเตตราซัยคลินที่พบใน *Corynebacterium striatum* ซึ่งสันนิษฐานว่าใช้ ATP เป็นพลังงานในการขนส่งยา<sup>12</sup>



รูปที่ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนประกอบด้วยการนำ aminoacyl-tRNA ที่มีรหัสเหมาะสมกับรหัสบน mRNA มาจับกับตำแหน่ง A บนไรโบโซมเพื่อสร้างพันธะเปปไทด์กับกรดอะมิโนที่อยู่ก่อนหน้าที่ตำแหน่ง P หลังจากนั้นไรโบโซมจะเคลื่อนที่ไปทาง 3' ของ mRNA และ tRNA ที่ไม่มีกรดอะมิโนแล้วจะหลุดออก ตำแหน่ง A เดิมจะกลายเป็นตำแหน่ง P และมีตำแหน่ง A ใหม่ว่างสำหรับ aminoacyl-tRNA ตัวต่อไป ยากลุ่มเตตราซัยคลินยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยขัดขวางการจับกันระหว่าง aminoacyl-tRNA กับตำแหน่ง A บนไรโบโซม (รูปดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 13)

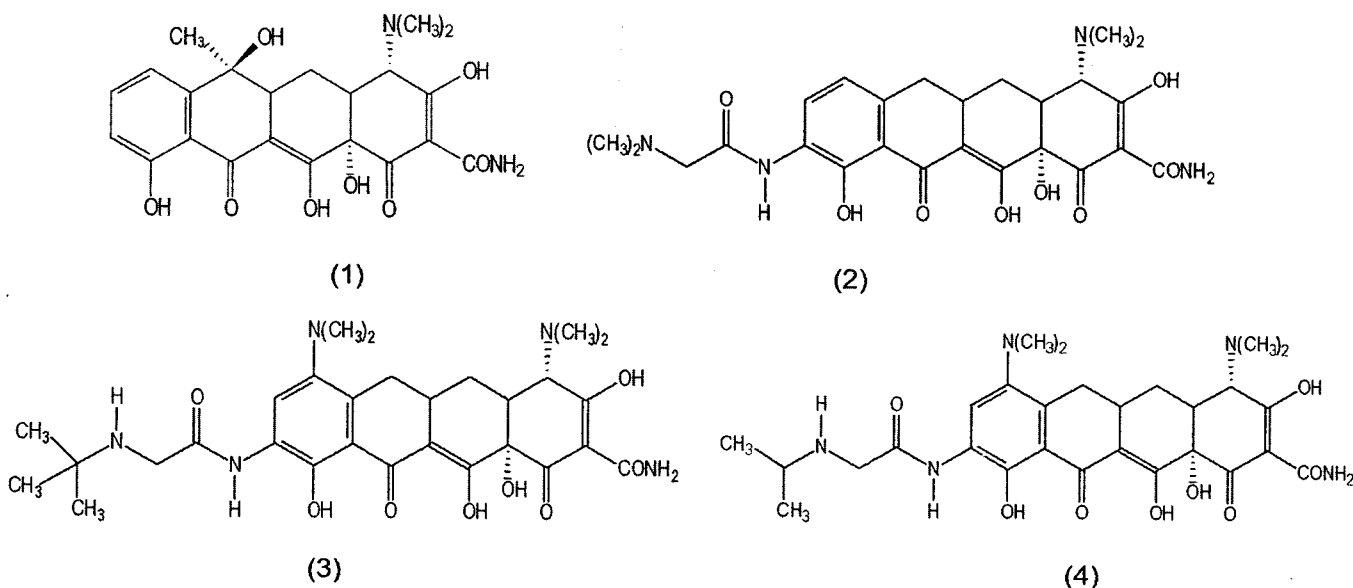
ในช่วงราว ค.ศ.1990 เริ่มมีการวิจัยและพัฒนายาเตตราซัยคลินที่สามารถออกฤทธิ์ได้กับจุลชีพทั้งชนิดที่ไวต่อยาและที่ดื้อยา ทั้งนี้ ยารุ่นใหม่นี้จะมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยา โดยอาจมีโครงสร้างที่ปั๊มขับยาไม่สามารถจดจำได้หรือแม้ว่าจดจำได้ก็ไม่สามารถขับยานั้นออกจากเซลล์ได้ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของยา (รูปที่ 3) กับการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยา พบว่า

- โครงสร้าง naphthacene A, B, C และ D จำเป็นต่อการยับยั้งการขับยาออกจากเซลล์
- โครงสร้าง phenolic keto-enol ที่ C10, C11, C12 และ C1 ที่ด้านล่างของโครงสร้าง naphthacene (ในกรอบเส้นปะ) จำเป็นต่อการยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยา เนื่องจากออกซิเจนที่บริเวณนี้จะเกิดพันธะโคออร์ดิเนต โควาลนต์กับไอออนบวกชนิดใดวาเลนซ์ที่ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน
- หมู่ dimethylamino ที่ตำแหน่ง C4 ไม่จำเป็นในการออกฤทธิ์ยับยั้งการขับยาออกเนื่องจากอนุพันธ์ที่ไม่มีหมู่ dimethylamino นี้ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งการขับยาออกได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ
- การดัดแปลงที่ตำแหน่ง 2, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการขับยาออกแตกต่างกันไป โดยพบว่าโครงสร้างที่มีหมู่แทนที่ N-alkyl glycydamido ที่ C9 ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยาได้ดีมาก



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของยากลุ่มเตตราซัยคลิน

จากการทดลองและข้อมูลดังกล่าวนำไปสู่การค้นพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่มีปั้มขับยาหรือดื้อต่อเตตราซัยคลิน (รูปที่ 4(1)) ได้แก่ ยากลุ่ม glycyclines เช่น 9-(*N,N*)-dimethylglycylamido-6-demethyl-6-deoxytetracycline (รูปที่ 4(2)) tigecycline (GAR 936 หรือ 9-*tert*-butylglycylamido-minocycline) (รูปที่ 4(3)) ซึ่งกำลังอยู่ในการทดลองทางคลินิกในระยะที่ 3<sup>14</sup>



รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ (1) เตตราซัยคลิน (2) 9-(*N,N*)-dimethylglycylamido-6-demethyl-6-deoxytetracycline (3) 9-*tert*-butylglycylamido-minocycline และ (4) 9-(*N,N*)-dimethylglycylamido-minocycline

อีกประเด็นหนึ่งที่ควรคำนึงถึงคือโอกาสในการดื้อยากลุ่ม glycyclines เนื่องจากยาดังกล่าวมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเตตราซัยคลินแบบดั้งเดิม เท่าที่มีการรายงานยังไม่พบเชื้อสายพันธุ์ตามธรรมชาติซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่ดื้อต่อยากลุ่ม glycyclines แต่มีรายงานการดื้อยา dimethylglycylamido-demethyl-deoxytetracycline และ dimethylglycylamido-minocycline (รูปที่ 4 (4)) ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella choleraesuis* ในสัตว์เนื่องจากการกลายพันธุ์ของปั้มขับยา Tet (A) อย่างไรก็ตามเชื่อดังกล่าวยังคงไวต่อยา tigecycline<sup>15</sup> นอกจากนี้ยังพบการดื้อยาทั้งสองที่กล่าวมาที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ Tet (B) แต่ปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นจากการทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้นในขณะนี้<sup>15,16</sup>

## สารยับยั้งปั้มขับยาอื่น ๆ

### กลุ่ม Indanes

นักวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น และ Hoffman-LaRoche laboratories<sup>17</sup> รายงานเกี่ยวกับสาร 1,1-dimethyl-5-(1-hydroxypropyl)-4,6,7-trimethylindan (Ro 07-3149) (รูปที่ 5(1)) และอนุพันธ์อีกสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งปั้ม Tet(K) ใน *Staphylococcus aureus* แบบ non-competitive และเมื่อทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* 743 ซึ่งมีทั้ง Tet (K) และกลไกป้องกันโรโซมพบว่า Ro 07-3149 ที่ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดค่า MIC ของยาเตตราซัยคลินลงได้ครึ่งหนึ่ง อย่างไรก็ตามสารนี้ไม่มีฤทธิ์กับเชื้อ *Escherichia coli* เนื่องจากไม่สามารถผ่านชั้นไลโปพอลิแซคคาไรด์ด้านนอกของเชื้อเพื่อเข้าสู่เซลล์ได้

### กลุ่ม Ginsenosides (รูปที่ 5(2))

Prosapogenins จากโสม (*Panax ginseng*) ที่มี  $\beta$ -D-glucopyranoside มีฤทธิ์ในการยับยั้ง Tet(K) ใน *Staphylococcus aureus*<sup>18</sup>

### กลุ่ม Indoles

โดยวิธีการ high-throughput screening ของบริษัท Pfizer ทำให้พบอนุพันธ์ของ indoles ชื่อ UK-57,562 (รูปที่ 5(3)) ที่เป็นสารต้นแบบซึ่งสามารถยับยั้งปั๊มขับยาของกลุ่มเตตราซัยคลินได้ เมื่อทดสอบกับเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจของวัว ได้แก่ *Pasteurella haemolytica* และ *Pasteurella multocida* ซึ่งมีปั๊ม Tet(C) พบว่าสารชนิดนี้ที่มีความเข้มข้น 25-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยลำพังแต่สามารถลดค่า MIC ของยาเตตราซัยคลินได้ถึง 8-32 เท่าในเชื้อทั้งสองชนิด<sup>19</sup>

### Reserpine

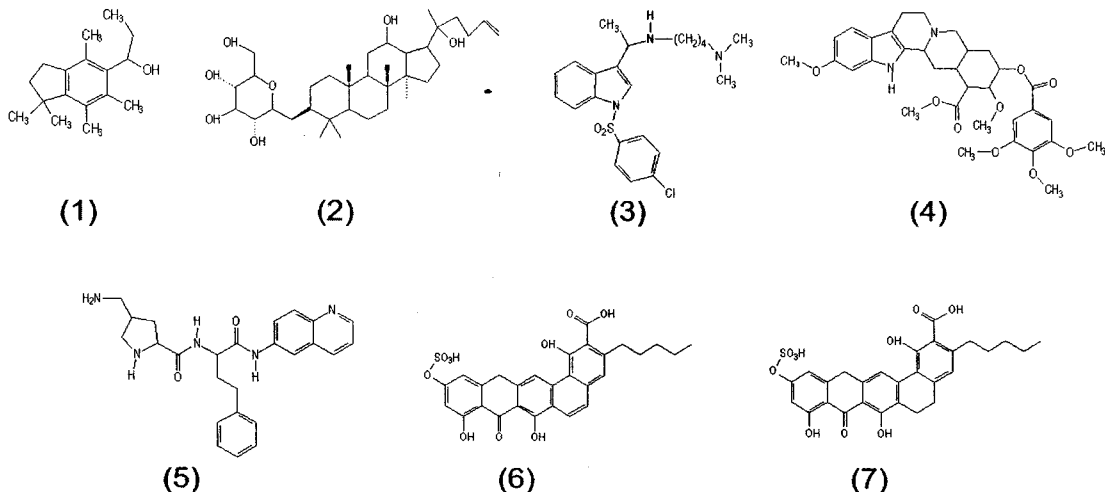
Reserpine (รูปที่ 5(4)) เป็นสารแอลคาลอยด์จากรากของต้นระย่อม (*Rauwolfia serpentina*) ใช้เป็นยาลดความดันโลหิตสามารถยับยั้ง Bmr และ NorA ซึ่งเป็นปั๊มขับยาที่ทำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ตื้อต่อยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงต่อระบบประสาททำให้ไม่สามารถนำสารนี้มาใช้ได้โดยตรง จึงต้องมีการพัฒนาอนุพันธ์ที่มี reserpine เป็นโครงสร้างต้นแบบ ซึ่งพบว่าอนุพันธ์ของสารนี้มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยาใน *Staphylococcus aureus* SA1199B ที่มียีน *norA* ได้แรงกว่า reserpine ถึง 8 เท่า และทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์เหล่านี้สามารถลดอัตราการดื้อยา ciprofloxacin ได้ด้วย<sup>20</sup>

### เปปไทด์ยับยั้งปั๊มขับยา Acr-AB

ปั๊มขับยาระบบหนึ่งที่พบใน *Escherichia coli* และแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ AcrA-AcrB-TolC ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสามชนิดทำหน้าที่ร่วมกันในขับยาปฏิชีวนะออกจากชัยโทพลาซึมข้ามชั้นเพอริพลาซึมสู่ภายนอกเซลล์โดยตรง โดยการเชื่อมเมมเบรนชั้นในและชั้นนอกเข้าด้วยกัน โปรตีน AcrB ทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจดจำโมเลกุลของยา ขณะที่โปรตีน AcrA ทำหน้าที่ส่งผ่านยาข้ามเมมเบรนไปสู่ช่องโปรตีนที่ผิวเซลล์ (channel protein) อันได้แก่ TolC ปัจจุบันบริษัท Microcide Pharmaceuticals ค้นพบสารชื่อว่า MC-04,124 (รูปที่ 5(5)) ซึ่งเป็นไดเปปไทด์ที่มี quinoline ที่ปลายด้านคาร์บอกซี และ aminomethylproline ที่ปลายด้านอะมิโน สามารถยับยั้งปั๊มขับยาระบบ AcrA-AcrB<sup>21</sup> และเพิ่มฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของยา azithromycin clarithromycin และ erythromycin ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดกรัมลบหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenza*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อให้ MC-04,124 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ azithromycin ในขนาด 25 เปอร์เซ็นต์ ของ MIC ปกติ เพื่อฆ่าเชื้อ *Escherichia coli* และ *Haemophilus influenza* สามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงได้ในปริมาณที่เทียบเท่ากับการใช้ azithromycin ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ ของ MIC ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

### Benastatins

Benastatins A และ B (รูปที่ 5(6,7)) ซึ่งสร้างโดยแอคทีโนมายซีท (Actinomycete) สามารถเพิ่มฤทธิ์ของ levofloxacin ต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เนื่องจากสามารถยับยั้ง MexA-MexB-OprM ทำให้ค่า MIC ของ levofloxacin ลดลง 4 เท่า (0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)<sup>22</sup>



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ (1) Ro 07-3149 (2) ginsenoside (3) UK-57,562 (4) reserpine (5) MC-04,124 (6) benastatin A และ (7) benastatin B

### บทสรุป

กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะโดยการใช้ปั๊มขับยาออกจากเซลล์เป็นประเด็นที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนาใหม่หรือเพื่อทำให้ยาที่ใช้ในปัจจุบันแต่ประสบปัญหาการดื้อยากลับมามีประสิทธิภาพอีกครั้ง การแสวงหาสารยับยั้งปั๊มขับยาอย่างเป็นระบบเริ่มต้นจากการทำความเข้าใจเกี่ยวกับการทำงานของปั๊ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับสัมพรรคภาพต่อโมเลกุลแบบต่างๆ และการหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารกับการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยา จากนั้นจึงออกแบบโมเลกุลที่มีโครงสร้างแบบต่างๆ แล้วคัดเลือกสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดและมีความจำเพาะต่อเซลล์แบคทีเรียโดยไม่ส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์ยูแคริโอต หากสารยับยั้งปั๊มขับยาจะถูกนำไปใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ สารยับยั้งและยาควรมีสัมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์คล้ายคลึงกันเพื่อให้การออกฤทธิ์ที่ควบคุมประสานกัน และในลำดับต่อไป คือการพัฒนาสารที่สามารถยับยั้งปั๊มขับยาได้หลายระบบทั้งที่พบในแบคทีเรียชนิดกรัมบวกและกรัมลบ

### เอกสารอ้างอิง

1. Levy SB, McMurry L. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature* 1978 ; 276(5683) : 90-2.
2. Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol* 2001 ; 9(2) : 71-9.
3. Beck WT. Cellular pharmacology of Vinca alkaloid resistance and its circumvention. *Adv Enzyme Regul* 1984 ; 22 : 207-27.
4. Berger W, Erich H, Leonilla, et al. Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells. *Int J Cancer* 1997 ; 71(1) : 108-15.
5. Herbert PS. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2003 ; 2(1) : 48-62.

6. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida, H, et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999 ; 43 : 1340-6.
7. Mazzariol A, Cornaglia G, Nikaido H. Contributions of the AmpC beta-lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to beta-lactams. Antimicrob Agents Chemother 2000 ; 44 : 1387-90.
8. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mex-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 :1948-53.
9. Mata MT, Baquero F, Perez-Diaz JC. A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett 2000 ; 187 :185-8.
10. George AM. Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett 1996 ; 139 : 1-10.
11. Luna VA, Cousin S, Whittington WL, et al. Identification of the conjugative *mef* gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2000 ; 44 : 2503-6.
12. Chopra I, Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. Curr Opin Pharmacol 2001 ; 1 : 464-9.
13. Anonymous. Translation: elongation (online). Available at <http://www.emunix.emich.edu/~rwinning/genetics/transl4.htm> (18 April 2005).
14. Anonymous. Tigecycline - antibiotic evaluated in surveillance trial (online). Available at [http://www.eurekalert.org/pub\\_releases/2004-05/pn-ta051904.php](http://www.eurekalert.org/pub_releases/2004-05/pn-ta051904.php) (19 May 2004)
15. Tuckman M, Petersen PJ, Projan SJ. Mutations in the interdomain loop region of the *tetA(A)* tetracycline resistance gene increase efflux of minocycline and glycylcyclines. Microbiol Drug Res 2000 ; 6 : 277-82.
16. Guay GG, Tuckman M, Rothstein DM. Mutations in the *tetA(B)* gene that cause a change in substrate specificity of the tetracycline efflux pump. Antimicrob Agents Chemother 1994 ; 38 : 857-60.
17. Hirata T, et al. A novel compound, 1,1-dimethyl-5(1-hydroxypropyl)-4,6,7-trimethyl-indan, is an effective inhibitor of the *tet(K)* gene-encoded metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter of *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett 1997 ; 412(2) : 337-40.
18. Hasegawa HS, Kitamura H, Matsumiya S, et al. Interactions of triterpenoids from *Panax* (Araliaceae) and *Glycyrrhiza* (Leguminosae) spp. with membrane transporters. Saengyak Hakhoechi 1995 ; 26 : 204-21.
19. Silvia AM, Gavitt NE, Pere WD, et al. Identification of a tetracycline efflux resistance reverser UK-57, 562. in 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999. San Francisco, CA, American Society for Microbiology

20. Markham PN, Westhaus E, Klyachko K, et al. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1999 ; 43(10) : 2404-8.
21. Cho D, Lofland D, Blais J, et al. An efflux pump inhibitor, MC-04,124, enhances the activity of macrolides against Gram negative bacteria. in 40<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000, Toronto, Canada, American Society for Microbiology.
22. Lee JC, Galazzao JL, Ianiro T, et al. MF-EA371-a and MF-EA371-d, novel bacterial efflux pump inhibitors from microbial fermentation. in 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000, Toronto, Canada, American Society of Microbiology.

## คำถาม

1. ข้อใดผิดเกี่ยวกับปั๊มขับยาในแบคทีเรีย
  1. มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ
  2. พบบริเวณเมมเบรนของเซลล์
  3. อาจทำหน้าที่ขับสารประกอบ หรือสารพิษบางชนิดออกจากเซลล์ได้ด้วย
  4. ทำหน้าที่ทั้งนำยาเข้าและออกจากเซลล์
  5. ไม่มีข้อใดผิด
2. ข้อใดไม่ใช่ปั๊มขับยาในแบคทีเรีย
  1. P-glycoprotein
  2. TetA
  3. AcrA
  4. NorA
  5. QacA
3. ปั๊มขับยาในแบคทีเรียอาจส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของยาใดมากที่สุด
  1. Omeprazole
  2. Methotrexate
  3. Doxycycline
  4. Propanolol
  5. Fluoxetine
4. ปั๊มขับยาในแบคทีเรียทำงานโดยอาศัยหลักการใด
  1. การแพร่ (simple diffusion)
  2. พลังงานจากการสลาย ATP
  3. พลังงานจากความแตกต่างของ pH (pH gradient)
  4. ข้อ 2 และ 3 ถูกต้อง
  5. ข้อ 1, 2 และ 3 ถูกต้อง
5. ปั๊มขับยาในข้อใดทำงานได้โดยไม่มีการแลกเปลี่ยนโปรตอนเข้าสู่เซลล์
  1. MSF
  2. RND
  3. MAR
  4. MET
  5. ABC
6. เหตุใดปั๊มขับยาจึงมีความสำคัญต่อปัญหาการดื้อยา
  1. เพราะแบคทีเรียเกือบทุกชนิดมีปั๊มขับยา
  2. เพราะยาปฏิชีวนะเองอาจเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของปั๊มขับยา
  3. เพราะการดื้อยาโดยปั๊มขับยาอาจเกิดร่วมกับการดื้อยาแบบอื่น ๆ
  4. เพราะยีนที่ควบคุมการแสดงออกของปั๊มขับยาแพร่กระจายได้ง่าย
  5. ถูกทุกข้อ

7. เป้าหมายของการพัฒนาสารที่ยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยาคือข้อใด
  1. ให้ได้สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของปั๊มและมีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยตัวเอง
  2. ให้ได้สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของปั๊ม ที่อาจไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยตัวเองแต่สามารถให้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเดิมที่ประสบปัญหาการดื้อยา
  3. ให้ได้สารที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อแบคทีเรียโดยไม่ส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์ยูแคริโอต
  4. ให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียหลายชนิด
  5. ถูกทุกข้อ
8. ข้อใดกล่าวไม่ถูกต้อง
  1. ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของปั๊มเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสารยับยั้ง
  2. การดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งปั๊มขับยามีโอกาสเกิดขึ้นได้
  3. ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นเมื่อให้ยาร่วมกับสารยับยั้งปั๊มเป็นตัวบ่งชี้ว่าสารนั้นสามารถยับยั้งปั๊มได้ดี
  4. สารยับยั้งและยาปฏิชีวนะที่จะใช้ร่วมกันควรมีสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ใกล้เคียงกัน
  5. ไม่มีข้อใดผิด
9. ข้อใดมีฤทธิ์ยับยั้งปั๊มขับยากลุ่มเตตราซัยคลิน
  1. Glycylcycline
  2. Doxycycline
  3. Minocycline
  4. TetB
  5. ถูกทุกข้อ
10. แหล่งที่มาของสารยับยั้งการทำงานของปั๊มขับยา ได้แก่
  1. พืช
  2. จุลชีพ
  3. ไดเพปไทด์
  4. การสังเคราะห์ทางเคมี
  5. ถูกทุกข้อ