

Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlara ve Verapamil Kombinasyonuna Maruz Bırakılan Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Klinik İzolatlarındaki Efluks Pompa Genlerinin Araştırılması

Investigation of Efflux Pump Genes in Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Clinical Isolates Exposed to First Line Antituberculosis Drugs and Verapamil Combination

Didem ÖZGÜR¹(ID), Leyla ERSOY²(ID), Mahmut ÜLGER³(ID), Seda TEZCAN ÜLGER²(ID), Gönül ASLAN²(ID)

¹ Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars.

¹ Kafkas University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kars, Türkiye.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Türkiye.

³ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Türkiye.

*Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2019-1-AP4-3321 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Makale Atfı: Özgür D, Ersoy L, Ülger M, Tezcan Ülger S, Aslan G. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara ve verapamil kombinasyonuna maruz bırakılan dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleks klinik izolatlarındaki efluks pompa genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2023;57(2):207-219.

ÖZ

Mycobacterium tuberculosis'in neden olduğu tüberküloz (TB) halen tüm dünyada sağlıklı tehdit eden en önemli enfeksiyöz hastalıklardan biridir. *M. tuberculosis*'te ilaç direnci başlıca, ilaç hedefi olan veya ilacı aktive edici enzimleri kodlayan genlerdeki spontan kromozomal mutasyonlara bağlı gelişse de direnç, sadece bu mutasyonlarla açıklanamamaktadır. Hücre duvar geçirgenliğinin düşük olması, inaktive edici enzimler ve özellikle efluks pompaları (EP) mikobakterilerde ilaç direncine neden olan diğer mekanizmalardır. *M. tuberculosis* EP'lerine bağlanan efluks pompa inhibitörlerinin (EPI), anti-TB ilaçların dışı atımını engellediği, *M. tuberculosis*'in öldürülmesini arttırdığı, ilaç direncini azalttığı ve birinci seçenek ilaçlar ile sinerjik etki yarattığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, primer anti-TB ilaçlara dirençli dokuz *M. tuberculosis* kompleks izolatında verapamil (VER) varlığında birinci seçenek anti-TB ilaçların minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin ve dirence neden olabilecek "ATP-binding cassette (ABC)", "major facilitator superfamily (MFS)" ve "resistance-nodulation-division (RND)" ailelerine ait 21 EP geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatların MİK değerleri renk değişimi prensibine dayanan rezazurin mikrotitre testi (REMA) yöntemi ile 96 kuyulu U tabanlı plaklarda belirlenmiştir. Her izolatin belirlenen MİK değerlerine göre, RNA ekstraksiyonu için Middlebrook 7H9 sıvı

İletişim (Correspondence): Dr. Öğr. Üyesi Didem Özgür, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 36100 Kars, Türkiye. Tel (Phone): +90 (474) 225 1150/3296, E-posta (E-mail): dido-ozgur@hotmail.com

besiyerinde taze üreyen kültürler 37°C'de 48 saat boyunca birinci seçenek anti-TB ilaçların (½ MİK) ve VER varlığında (½ MİK) birinci seçenek anti-TB ilaçların MİK'ine maruz bırakılmıştır. İlaça maruz bırakılmayan kültürler kontrol olarak kullanılmıştır. Toplam RNA, RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak elde edilmiş ve daha sonra DNase I (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA) ile muamele edilmiştir. Ekstrakte edilen RNA'lardan komplementer DNA (cDNA), oligo primerler kullanılarak "First strand cDNA synthesis kit (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA)" ile sentezlenmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative real-time polymerase chain reaction (qRt-PCR)] ile efluks genlerinin ekspresyon seviyeleri, QuantiTect SYBR Green Rt-PCR Kit (QIAGEN) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qRt-PCR analizlerinde housekeeping gen olarak sigma faktör Rv2703 (*sigA*) geni, internal kontrol olarak kullanılmıştır. Klinik izolatların relatif kantitasyonu; primer anti-TB ilaçlara ve VER'e maruz bırakılan kültürlerdeki efluks genlerinin ekspresyon seviyeleri ile ilaca maruz bırakılmayan kültürlerdeki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak 2-ΔΔCt yöntemi ile belirlenmiştir. REMA yöntemi ile dokuz izolatin MİK değerleri streptomisin (SM), izoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB) ve VER için sırasıyla 32-512 µg/mL, 1-128 µg/mL, 2-32 µg/mL, 4-16 µg/mL ve 15.62-250 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. ½ MİK VER varlığında SM MİK değerinde sekiz izolatta 2-32 kat, INH MİK değerinde dokuz izolatta 2-8 kat, RIF MİK değerinde sekiz izolatta 2-16 kat ve EMB MİK değerinde sadece beş izolatta 2-4 kat arasında değişen oranlarda azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda birinci seçenek anti-TB ilaçların ½ MİK'ine maruz bırakılan izolatlarda, ABC ailesinden Rv1273c, Rv1456c, Rv1457c ve Rv1819c; MFS ailesinden Rv1634 ve Rv0842; RND ailesinden Rv3823 efluks pompa genlerinin ekspresyonlarında artış olduğu tespit edilmiştir. ABC ailesinde yer alan Rv1456c ve Rv1819c'nin SM direnci; Rv1273c'nin EMB direnci; Rv1457c, Rv0842 ve Rv3823c'nin hem RIF hem de EMB direnci; Rv1634'ün ise INH, RIF ve EMB direnci ile ilişkili olduğu saptanmıştır. VER varlığında (½ MİK) birinci seçenek anti-TB ilaçların MİK'ine maruz bırakılan izolatlarda ise ABC ailesinden sekiz (Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv0194, Rv1272c, Rv1686c, Rv1687c, Rv1819c), MFS ailesinden altı (Rv0842, Rv0849, Rv1634, Rv2265, Rv2456c, Rv0876c) ve RND ailesinden iki (Rv0507, Rv0676c) adet efluks pompa geninin ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde gittikçe artan TB direncinden dolayı alternatif tedavide kullanılacak EPİ'lerin araştırılması ve EP'lerin direnç gelişimine olan katkısının belirlenmesi için klinik izolatlar ile yapılacak daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*; efluks pompaları; efluks pompa inhibitörü; verapamil; ilaç direnci.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis*, still one of the most common life-threatening infectious diseases worldwide. Although drug resistance in *M. tuberculosis* is mainly due to spontaneous chromosomal mutations in genes encoding drug target or drug activating enzymes, the resistance cannot be explained only by these mutations. Low permeability of the cell wall, drug inactivating enzymes and especially efflux pumps (EPs) are other mechanisms of drug resistance in mycobacteria. Efflux pump inhibitors (EPis) binding to *M. tuberculosis* EPs were shown to inhibit efflux of anti-TB drugs, to enhance *M. tuberculosis* killing, to reduce drug resistance and to produce synergistic effects with first line anti-TB drugs. In this study, we aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of first-line anti-TB drugs in the presence of verapamil (VER) and the expression of 21 putative EP genes belonged to the ATP-binding cassette (ABC), major facilitator superfamily (MFS) and resistance-nodulation-division (RND) families which might have caused the resistance in nine *M. tuberculosis* complex clinical isolates resistant to all of the first line anti-TB drugs. MIC values of the isolates were determined in 96-well U-bottom plates by the resazurin microtiter test (REMA) method based on the color change principle. According to the determined MIC values of each isolate, freshly grown cultures in Middlebrook 7H9 broth were exposed to first-line anti-TB drugs and MIC of first-line anti-TB drugs in the presence of VER (½ MIC) at 37°C for 48 hours for RNA extraction. The non-drug exposed cultures were used as control. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and then treated with DNase I (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA). Complementary DNA (cDNA) from the extracted RNAs was synthesized with the "First strand cDNA synthesis kit" (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA) using oligo primers. The expression levels of efflux pump genes by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRt-PCR) were performed using the QuantiTect SYBR Green Rt-PCR Kit (Qiagen, Germany). The housekeeping sigma factor gene *sigA* (Rv2703) was used as internal control in qRt-PCR assays. Relative quantification of the clinical isolates was determined by the 2-ΔΔCt method by

comparing the expression levels of efflux genes in cultures exposed to primary anti-TB drugs and VER with those of non-drug exposed cultures. MIC values of nine isolates by REMA method was determined between 32-512 µg/mL, 1-128 µg/mL, 2-32 µg/mL, 4-16 µg/mL and 15.62-250 µg/mL for streptomycin (SM), isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB) and VER, respectively. In the presence of ½ MIC VER, it was determined that the MIC of SM decreased 2-32 fold in eight isolates, the MIC of INH decreased by 2-8 fold in nine isolates, the MIC of RIF decreased by 2-16 fold in eight isolates, and the MIC of EMB decreased 2-4 fold in only five isolates. There was an increase in the expression of Rv1273c, Rv1456c, Rv1457 and Rv1819 efflux pump genes from the ABC family, Rv1634 and Rv0842 from the MFS family and Rv3823 efflux from the RND family in isolates exposed to ½ MIC of first-line anti-TB drugs stress. Rv1456c and Rv1819 were found to be associated with SM resistance, Rv1273c with EMB resistance, Rv1457, Rv0842 and Rv3823 with both RIF and EMB resistance, and Rv1634 with INH, RIF and EMB resistance. It was determined that there was a decrease in the expression levels of eight efflux pump genes from the ABC family (Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv0194, Rv1272c, Rv1686c, Rv1687c, Rv1819c), six from MFS family (Rv0842, Rv0849, Rv1634, Rv2265, Rv2456c, Rv0876c) and two from RND family (Rv0507, Rv0676c) in isolates exposed to MIC of first-line anti-TB drugs in the presence of VER (½ MIC). Further studies with clinical isolates are needed to investigate the EPIs that can be used in alternative therapy and to determine the contribution of EPs to the development of resistance due to the increasing TB resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; efflux pumps; efflux pump inhibitor; verapamil; drug resistance.

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) halen tüm dünya sağlığını tehdit eden en önemli enfeksiyöz hastalıklardan biridir. Özellikle çok ilaca dirençli (ÇİD) ve yaygın ilaç dirençli (YİD) TB'nin ortaya çıkışı, TB kontrol faaliyetlerini ciddi ölçüde engellemektedir¹. Dünya Sağlık Örgütü 2020 raporunda², 2019 yılında tahmini 1.4 milyon insanın TB'den öldüğü (208 000'i HIV ile ko-enfekte) ve ölümlerin yaklaşık %13 (182 000)'ünün ÇİD-TB'den kaynaklandığı bildirilmektedir.

Uzun süre TB'de direncin, yalnız anti-TB ilaç direnç genlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Mikobakteriler entrensek ilaç direncine sahip olmasına rağmen, bu durum etkili efluks mekanizmaları ile birlikte mikolik asit içeren olağan dışı hücre duvar yapısına bağlanmıştır^{3,4}. Mikobakterilerin direnç mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen olası mekanizmalar; ilaç direnci ile ilişkili özgül enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, hücre duvarı geçirgenliğindeki değişiklikler, intraselüler ve ekstraselüler ortama adaptasyonu düzenleyen iki-komponentli sistemin ve efluks pompalarının (EP) aşırı ekspresyonudur⁵. *M.tuberculosis* kompleksinde şimdiye kadar "major facilitator superfamily (MFS)", "ATP-binding cassette (ABC)", "small multidrug resistance (SMR)", "multidrug and toxic compound extrusion (MATE)" ve "resistance-nodulation-division (RND)" ailelerine ait EP'lerin varlığı gösterilmiştir^{1,3}. Efluks pompaları mikobakterilerde tanımlandıktan sonra, direnç ile ilişkili çalışmalar hızla artmış ve günümüze kadar pek çok gen bölgesi tanımlanmıştır⁶⁻⁹.

Efluks pompa inhibitörleri (EPI), dışa atımı önlemek için bakteriyel EP'lere bağlanan moleküllerdir. *M.tuberculosis*'de EP'lere bağlanan EPI'lerin; anti-TB ilaçların dışa atımını engellediği, *M.tuberculosis*'in öldürülmesini artırdığı, ilaç direncini azalttığı ve birinci seçenek ilaçlar ile sinerjik etki yarattığı gösterilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi [U.S. Food and Drug Administration (FDA)] tarafından bedaquiline ve verapamilin (VER) hem in vivo hem de

in vitro deneylerde güçlü anti-TB etkiye sahip olmasından dolayı, antimikrobiyal terapide EPİ olarak kullanılmasına onay verilmiştir⁵.

Bu çalışmada, primer anti-TB ilaçlara dirençli dokuz *M.tuberculosis* kompleks izolatında; birinci seçenek anti-TB ilaçların, efluks pompa inhibitörü olarak VER'in, VER varlığında (½ MİK) birinci seçenek anti-TB ilaçların MİK değerlerinin ve dirence neden olabilecek ABC, MFS ve RND ailelerine ait 21 efluks pompa geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile (Karar No: 2018/85 ve Tarih: 22.02.2018) gerçekleştirildi.

Örneklerin Seçimi

Mersin Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarına TB şüphesi ile gönderilmiş klinik örneklerden izole edilen ve BACTEC MGIT 960 sistemi ile birinci seçenek anti-TB ilaçların tamamına [streptomisin (SM), izoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB)] dirençli olduğu tespit edilen dokuz *M.tuberculosis* kompleks izolatu dahil edildi. Kontrol suşu olarak *M.tuberculosis* H37Rv kullanıldı.

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu Belirlenmesi-Resazurin Mikrotitre Testi

Löwenstein-Jensen (LJ) ve sıvı MGIT besiyerinde üremiş ve +4°C'de saklanmış olan *M.tuberculosis* kompleks izolatları ilk önce %0.5 gliserol ve %10 OADC (Oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz) ilave edilmiş Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine, daha sonra LJ besiyerine pasajlanarak canlandırıldı. Her izolat için; birinci seçenek anti-TB ilaçların, EPİ olarak VER'in ve VER varlığında (½ MİK) birinci seçenek anti-TB ilaçların MİK değerleri renk değişimi prensibine dayanan resazurin mikrotitre testi (REMA) yöntemi ile 96 kuyulu U tabanlı plaklarda belirlendi¹⁰. Klinik izolatların MİK'ini belirlemede konsantrasyon aralığı; VER için 0.488-1000 µg/mL, SM için 0.5-1024 µg/mL, INH, RIF ve EMB için 0.125-256 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. Rifampisin stok çözeltisi metanolde; diğer primer anti-TB ilaçların ve VER'in stok çözeltileri deiyonize su içinde hazırlandı. Her ilaç konsantrasyonu üç kopya halinde çalışıldı ve test üç kez tekrar edildi. Kontrol suşu olarak H37Rv kullanıldı.

Verapamil'in primer anti-TB ilaçlar üzerine olan etkisi, fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK= MİK anti-TB ilaç + VER/MİK anti-TB ilaç) ve modülasyon faktörü (MF= MİK anti-TB ilaç/MİK anti-TB ilaç + VER) ile belirlendi. Hesaplanan FİK değerleri ≤ 0.25 ise sinerjik, 0.25 ile 2 arasında ise farksız ve ≥ 2 ise antagonistik; modülasyon faktörü ise ≥ 4 olduğunda (dört kat azalma) VER'in kombinasyonda yer alan anti-TB ilaçlarla kullanımının etkili olduğu kabul edildi¹¹.

RNA Ekstraksiyonu ve Komplementer DNA Sentezi

Klinik izolatların ve *M.tuberculosis* H37Rv'nin, %0.5 gliserol ve %10 OADC içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine kültürü yapıldı. Taze üreyen kültürlerin her biri 37°C'de 48 saat

boyunca birinci seçenek anti-TB ilaçların (½ MİK) ve VER varlığında (½ MİK) birinci seçenek anti-TB ilaçların MİK'ine maruz bırakıldı. Birinci seçenek anti-TB ilaçlara ve VER'e maruz bırakılmayan izolatlar kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyon sonunda, spin kolon yöntemi ile çalışan RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra DNase I (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA) ile muamele edildi. Elde edilen total RNA'nın konsantrasyonu "NanoDrop 2000 Spectrophotometer" (Thermoscientific, ABD) cihazı ile 260 nm dalga boyunda ölçülerek µg/µl değerleri belirlendi. Oligo primerler kullanılarak "First strand cDNA synthesis kit" (Thermo FischerScientific Inc., Waltham, MA) ile 1 µg total RNA'dan üretici firmanın talimatları doğrultusunda komplementer DNA (cDNA) elde edildi⁸.

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRt-PCR) üretici firmanın önerileri doğrultusunda "QuantiTect SYBR Green Rt-PCR Kit (Qiagen, Almanya)" kullanılarak "LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics, Almanya)" cihazında gerçekleştirildi. Literatürde yapılan araştırmalar sonucu belirlenen, ekspresyon seviyeleri araştırılması planlanan 21 olası EP geni Tablo I'de gösterilmiştir^{1,8}. Çalışmada 'housekeeping' gen olarak sigma faktör Rv2703 (*sigA*) geni, internal kontrol olarak kullanıldı.

Her bir örneğin PCR amplifikasyonu; 10 µl 2X RT² SYBR Green Master Mix, 1 mikromolar (µM) her bir primer ve 0.15 ng/µl kalıp cDNA içerecek şekilde 20 µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. PCR amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 45 döngü 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 54-58°C'de 40 saniye bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzama basamağı şeklinde uygulandı. Primerlerin özgünlüğünü doğrulamak için her amplifikasyondan sonra erime eğrisi analizi yapıldı. Klinik izolatların relatif kantitasyonu; primer anti-TB ilaçlara ve VER'e maruz bırakılan kültürlerdeki efluks genlerinin ekspresyon seviyeleri ile ilaca maruz bırakılmayan kültürlerdeki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak 2-ΔΔCt yöntemi ile belirlendi.

BULGULAR

Çalışmada, BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) ile primer anti-TB ilaçların tümüne dirençli dokuz izolatın REMA yöntemi MİK değerleri SM, INH, RIF, EMB ve VER için sırasıyla 32-512 µg/mL, 1-128 µg/mL, 2-32 µg/mL, 4-16 µg/mL ve 15.62-250 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. İzolatların primer anti-TB ilaçlar ve VER MİK değerleri ayrı ayrı saptandıktan sonra, farklı konsantrasyonda primer anti-TB ilaçlar içeren plaklara VER MİK değerinin ½'si oranında VER eklenerek elde edilen MİK değerlerine göre, MF ve FİK değerleri hesaplanmıştır. Belirlenen MF değerine göre; dirençli dokuz izolatın ½ MİK VER varlığında SM, INH ve RIF MİK değerlerinde yedi izolatta ve EMB MİK değerinde üç izolatta ≥ 4 kattan fazla azalma olduğu saptanmış ve bu izolatlar için VER'in kombinasyonda yer alan anti-TB ilaçlarla kullanımının etkili olduğu kabul edilmiştir. ½ MİK VER varlığında anti-TB ilaçların MİK değerinde dört kattan az azalma gösteren izolatların ise, FİK değerlerinin 0.25-1 arasında olduğu ve VER'in kombinasyonda yer alan anti-TB ilaçlarla kullanımının etkisi olmamakla birlikte antagonistik etki yapmadığı tespit edilmiştir (Tablo II).

Tablo 1. *Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRt-PCR)] Testinde Kullanılan Genler ve Sekansları*

Gen	Ürün Büyüklüğü (bp)	Sekans (5'-3')	Efluks Pompa Ailesi
Rv0194	202	F: CGA CCT ACT TGC TGA TGT ACG R: TTG GGC ACA TCG AAC AGC	ABC
Rv1272c	220	F: CAA GAC CAC GCT GGT GAA CCT G R: CCT GGC GGC TTC TAC TAT CTC G	ABC
Rv1273c	203	F: TAG TCA CCG AGC AGG AGA TG R: CAC GTC AAG TGC GGA GAA C	ABC
Rv1456c	195	F: ATC GCC GCA ATC GTC ATC C R: CAC CGC AAA CGT GAC CAT C	ABC
Rv1457c	229	F: TGC TGG TCG GGC TGA CTT TG R: AAC ACC ACG GCA ACC ACT G	ABC
Rv1458c	190	F: GCA GCA TTG AGG TAC TTG GAC R: TCG GTG AGA CCC AAG GTG TC	ABC
Rv1686c	211	F: GCT TGC CTG GTG CTA CTG G R: GGA ACC AGA ACG CCA CAA TG	ABC
Rv1687c	216	F: GGA CCC GAC CAT TTA CAA CG R: TCG AGC ACT AGC AGA TCA G	ABC
Rv1819c	200	F: GAT CAG TGC CAT CTG TGT GC R: TGT CGT TGC CTT GGT AGC TG	ABC
Rv0842	220	F: TCT GGC AAC GCT CAC GAC R: ACA AAG AGT CAC CCA CAC TCC	MFS
Rv0849	170	F: TGC GGT CAT GGC ATT GGT G R: CCA GAT TTC CGA CGA GGA CTC	MFS
Rv0876c	211	F: AGT GCC AAC CGC TAT CTC C R: AGG TCA ATG CCG TCA GTC C	MFS
Rv1250	200	F: GAA CTT CAG CTT GTC CAA CCT C R: ACA ACG GAT GGG ACC TGT C	MFS
Rv1634	206	F: CGT GAG CTA CTG AGC AGG TATC R: CGC AGC AAC ATC GTA TTG AC	MFS
Rv1877	201	F: GTG CCC TAT CAG GTC TTT G R: GGC TTC GAA TTG GTG GTC TG	MFS
Rv2265	195	F: TGC TGT CGT TTC ACA TGG TCA G R: CGT TGT CCG TGA AGG CGA ATA G	MFS
Rv2456c	200	F: GCT GAT GTC GTC GTG CAT C R: CTC CGA TAC CGT CGA GCA AC	MFS
Rv2459 (<i>jefA</i>)	235	F: TCG CCC TGA TCG CAT ACA R: ATC ACC ATC AGA GTC CCG A	MFS
Rv0507	210	F: GTG GGA ACG GCA ATT GTG R: CTC GAT CAA CAG CAC CTC AG	RND
Rv0676c	212	F: ATC CGC AGC TAC TTC TAC TGG R: TGC GCC TTC ATG CTC TTC	RND
Rv3823c	199	F: GGG CTG AAT GTA GAC CAA C R: ATC CGA CGA CAG ACA CCT TG	RND
Rv2703 (<i>sigA</i>)	200	F: GTG GCA GCG ACC AAA GCA AG R: GTG TCC TGG GGT GCC GAG	-

ABC: ATP-binding cassette, MFS: Major facilitator superfamily, RND: Resistance-nodulation-division.

İzolat	MİK (µg/mL)										½ MİK Verapamil Variğında														
	MİK (µg/mL)					MİK (µg/mL)					MİK (µg/mL)					MİK (µg/mL)									
	SM	INH	RIF	EMB	VER	SM	INH	RIF	EMB	VER	SM	INH	RIF	EMB	VER	SM	INH	RIF	EMB	VER	SM	INH	RIF	EMB	VER
1	128	1	16	4	62.5	32	0.5	1	4	62.5	32	0.5	1	4	62.5	32	0.5	1	4	62.5	32	0.5	1	4	62.5
2	32	8	32	8	15.62	8	1	16	8	15.62	8	1	16	8	15.62	8	1	16	8	15.62	8	1	16	8	15.62
3	512	16	32	8	31.25	16	4	1	2	31.25	16	4	1	2	31.25	16	4	1	2	31.25	16	4	1	2	31.25
4	128	32	32	16	62.5	32	8	8	4	62.5	32	8	8	4	62.5	32	8	8	4	62.5	32	8	8	4	62.5
5	64	128	2	4	250	8	32	0.5	4	250	8	32	0.5	4	250	8	32	0.5	4	250	8	32	0.5	4	250
6	256	32	32	8	31.25	16	4	8	8	31.25	16	4	8	8	31.25	16	4	8	8	31.25	16	4	8	8	31.25
7	256	2	32	8	62.5	32	0.5	2	4	62.5	32	0.5	2	4	62.5	32	0.5	2	4	62.5	32	0.5	2	4	62.5
8	32	32	32	4	62.5	32	4	8	2	62.5	32	4	8	2	62.5	32	4	8	2	62.5	32	4	8	2	62.5
9	64	16	8	4	62.5	32	8	8	1	62.5	32	8	8	1	62.5	32	8	8	1	62.5	32	8	8	1	62.5
H37Rv	0.0625	0.031	0.0039	0.25	62.5	0.031	0.00781	0.0009	0.125	62.5	0.031	0.00781	0.0009	0.125	62.5	0.031	0.00781	0.0009	0.125	62.5	0.031	0.00781	0.0009	0.125	62.5

SM: Streptomisin, INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin, EMB: Etambutol.

Birinci seçenek anti-TB ilaçların ½ MİK'ine maruz bırakılan izolatlarda, ilaca maruz bırakılmayan izolatlar ile karşılaştırıldığında olası 21 EP geninin ekspresyon seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. ½ MİK SM'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv1819c'nin; ½ MİK INH'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv1634'ün; ½ MİK RIF'e maruz bırakılan izolatlarda Rv0842, Rv1457c, Rv1634, ve Rv3823c; ½ MİK EMB'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv0842, Rv1457c, Rv1634 ve Rv3823c'nin aşırı eksprese (≥ 4 kat değişim) edildiği ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. ½ MİK SM'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv1456c ve ½ MİK EMB'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv1273c'nin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla iki ve üç kat artış olduğu tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (sırasıyla $p=0.032$ ve $p=0.046$; Tablo III).

Genler	½ MİK Streptomisin		½ MİK İzoniazid		½ MİK Rifampisin		½ MİK Etambutol	
	Kat Değişimi	p	Kat Değişimi	p	Kat Değişimi	p	Kat Değişimi	p
Rv0507	~1	0.116	~3	0.113	~3	0.956	~2	0.112
Rv0676c	~1	0.163	~2	0.564	~3	0.509	~2	0.681
Rv0842	~2	0.150	~3	0.961	≥ 4	0.005	≥ 4	0.016
Rv0849	~1	0.101	~1	0.373	~2	0.435	~2	0.258
Rv0876c	~1	0.119	~1	0.449	~2	0.294	~2	0.158
Rv0194	~1	0.086	~1	0.190	~3	0.701	~1	0.175
Rv1250	~1	0.108	~1	0.876	~2	0.547	~3	0.106
Rv1272c	~1	0.144	~2	0.800	~2	0.221	~3	0.392
Rv1273c	~1	0.204	~2	0.630	~2	0.651	~3	0.046
Rv1456c	~2	0.032	~1	0.198	~2	0.473	~3	0.119
Rv1457c	~1	0.123	~1	0.937	≥ 4	0.007	≥ 4	0.002
Rv1458c	~1	0.084	~1	0.726	2	0.512	3	0.276
Rv1634	~1	0.263	≥ 4	0.013	≥ 4	0.021	≥ 4	0.033
Rv1686c	~1	0.380	~2	0.386	~1	0.818	~3	0.156
Rv1687c	~2	0.115	~3	0.136	~1	0.611	~1	0.781
Rv1819c	≥ 4	0.018	~1	0.405	~1	0.223	~2	0.396
Rv1877	~1	0.234	~3	0.716	~3	0.561	~3	0.431
Rv2265	~1	0.163	~2	0.909	~1	0.727	~3	0.459
Rv2456c	~2	0.148	~1	0.463	~1	0.452	~2	0.303
Rv2459 (jetA)	~1	0.330	~1	0.829	~3	0.355	~2	0.173
Rv3823c	~1	0.123	~2	0.929	≥ 4	0.041	≥ 4	0.017

Verapamil varlığında ($\frac{1}{2}$ Mik) INH'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv0507, Rv0842, Rv1456c ve Rv1457c; RIF'e maruz bırakılan izolatlarda Rv0676c, Rv0842, Rv0849, Rv0194, Rv1272c, Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv1634, Rv1686c, Rv2265 ve Rv2456c; EMB'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv0676c, Rv0876c, Rv1458c, Rv1634, Rv1686c, Rv1687c, Rv1819c ve Rv2265'in ekspresyon seviyelerinde azalma görüldüğü ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Ayrıca VER varlığında INH'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv1877; EMB'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv0507, Rv0849, Rv1250, Rv1272c, Rv1456c ve 2456c'nin ekspresyon seviyelerinde ise artış olduğu tespit edilmiştir (Tablo IV).

Genler	$\frac{1}{2}$ Mik Verapamil + Streptomisin		$\frac{1}{2}$ Mik Verapamil + Isoniazid		$\frac{1}{2}$ Mik Verapamil + Rifampisin		$\frac{1}{2}$ Mik Verapamil + Etambutol	
	Kat Değişimi	p	Kat Değişimi	p	Kat Değişimi	p	Kat Değişimi	p
Rv0507	~ 1	0.310	≥ 4	0.032	~ 1	0.488	≥ 4*	0.020
Rv0676c	~ 1	0.368	~ 2	0.565	≥ 4	0.002	~ 3	0.009
Rv0842	~ 3	0.669	≥ 4	0.001	≥ 4	0.001	~ 1	0.051
Rv0849	~ 3	0.737	~ 2	0.483	~ 4	0.001	~ 3*	0.025
Rv0876c	~ 1	0.323	~ 2	0.358	3	0.216	≥ 4	0.032
Rv0194	~ 1	0.454	~ 2	0.087	≥ 4	0.001	~ 1	0.069
Rv1250	~ 2	0.475	~ 2	0.077	~ 1	0.077	≥ 4*	0.028
Rv1272c	~ 1	0.723	~ 2	0.287	≥ 4	0.001	~ 3*	0.012
Rv1273c	~ 1	0.308	~ 1	0.707	~ 1	0.858	~ 3	0.053
Rv1456c	~ 2	0.451	≥ 4	0.018	≥ 4	0.001	~ 3*	0.031
Rv1457c	~ 3	0.314	≥ 4	0.003	≥ 4	0.001	~ 3	0.069
Rv1458c	~ 1	0.330	~ 3	0.273	~ 4	0.008	≥ 4	0.028
Rv1634	~ 1	0.361	~ 2	0.928	≥ 4	0.001	≥ 4	0.023
Rv1686c	~ 1	0.389	~ 1	0.900	~ 3	0.011	~ 3	0.018
Rv1687c	~ 1	0.314	~ 1	0.345	~ 1	0.538	≥ 4	0.023
Rv1819c	~ 1	0.320	~ 1	0.291	~ 1	0.246	≥ 4	0.018
Rv1877	~ 1	0.974	≥ 4*	0.043	3	0.287	~ 3	0.062
Rv2265	~ 2	0.457	~ 1	0.655	≥ 4	0.002	≥ 4	0.007
Rv2456c	~ 2	0.665	~ 3	0.645	≥ 4	0.012	≥ 4*	0.013
Rv2459 (jeFA)	~ 1	0.407	~ 1	0.896	~ 1	0.316	~ 2	0.061
Rv3823c	~ 2	0.358	~ 2	0.826	~ 1	0.201	~ 2	0.077

*: Ekspresyon seviyelerinde artış gözlenen eflüks pompa genleri.

TARTIŞMA

M.tuberculosis'te ilaç direnci uzun süre ilaç hedefini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile ilişkilendirilirken, son zamanlarda yapılan çalışmalarda farklı bileşiklerin taşınmasında rol alan farklı ailelerdeki çeşitli EP'lerin aktivitesinin, ilaca dirençli fenotiplerin gelişimine önemli katkı sağladığı gösterilmiştir. Günümüze kadar pek çok gen bölgesi tanımlanmış olup, en bilinenleri; ABC ailesinden Rv0933 (*pstB*), Rv1217c-1218c INH ve RIF direnci, birden çok ilacın taşınmasında DrrAB, Rv1456c-57c-58c, Rv1819c, Rv2686c-87c-88c; MFS ailesinden Rv0037c ve Rv0842 RIF direnci, Rv0783c (*emrB*), Rv0849, Rv1250, Rv1258c, Rv1410c (p55), Rv1634, Rv2265, Rv2456c, Rv2459 (*jefA*), Rv2846c (*efpA*) ve Rv3239c INH hem de RIF direnci; RND ailesinden Rv2942 (*mmpL7*) düşük düzey INH direnci; SMR ailesinden Rv3065 (*mmr*), Rv0342 (*iniA*), Rv03419 (*iniB*) ile Rv0343 (*iniC*) ise azalmış INH duyarlılığı ile ilişkili bulunmuştur^{6-9,12-17}.

Günümüzde TB ilaç direncinin araştırıldığı çalışmalarda özellikle ÇİD-TB'ye neden olan INH ve RIF direncine önem verildiği görülmektedir^{8,10,13,14,18-20}. Dünyada tüm birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli örnekler üzerinde yapılan çalışmalar yok denecek kadar sınırlı sayıdadır¹⁵. Çalışmamızda birinci seçenek anti-TB ilaçların ½ MİK'ine maruz bırakılan izolatlarda, ABC ailesinden Rv1273c, Rv1456c, Rv1457c ve Rv1819c; MFS ailesinden Rv1634 ve Rv0842; RND ailesinden Rv3823c EP genlerinin ekspresyonlarında artış olduğu tespit edilmiştir. ABC ailesinde yer alan Rv1456c ve Rv1819c'nin SM direnci; Rv1273c'nin EMB direnci; Rv1457c, Rv0842 ve Rv3823c'nin hem RIF hem de EMB direnci; Rv1634'ün ise INH, RIF ve EMB direnci ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Li ve arkadaşlarının yaptıkları iki farklı çalışmada^{14,16}, kullanılan izolatlar her ne kadar tüm birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli olmasa da, çalışmamızda olduğu gibi SM ve RIF/EMB direncinden sorumlu Rv1819c ve Rv0842 genlerinin RIF direnci ile, Rv1634 geninin ise INH ve RIF direnci ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Eflüks pompa inhibitörlerinin kombinasyon tedavisinde kullanımı, izolatların direncinde azalmaya yol açması ve yeni tedavi seçeneği olabilmesi açısından önemlidir. Bugüne kadar en çok çalışılan anti-TB EPİ, VER'dir. INH ve RIF dirençli klinik örneklerde ve *M.tuberculosis* kompleks suşlarında VER'in INH veya RIF ile kombine kullanımının MİK değerini ve her iki ilaca karşı ilaç direncini azalttığı tespit edilmiştir²¹. Çalışmamızda da, primer anti-TB ilaçların tamamına dirençli *M.tuberculosis* izolatlarının (n= 9) ½ MİK verapamil varlığında; SM MİK değerinde sekiz izolatta 2-32 kat, INH MİK değerinde dokuz izolatta 2-8 kat, RIF MİK değerinde sekiz izolatta 2-16 kat ve EMB MİK değerinde sadece beş izolatta 2-4 kat arasında değişen oranlarda azalmanın olduğu REMA yöntemiyle tespit edilmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda; karbonil siyanür m-Klorofenilhidrazon (CCCP), fenotiazinler, klorpromazin, 2,4-dinitrofenol (DNP), rezepin (RES) ve piperin gibi bazı EPİ'lerin de tedavide umut verici etkilere sahip olduğu görülmüştür⁵. Jaiswal ve arkadaşlarının REMA yöntemi ile INH dirençli 18 *M.tuberculosis* kompleks klinik izolatu üzerinde EPİ'nin etkinliğini araştırdıkları çalışmada¹⁰, izolatların %83'ünde VER, %55'inde DNP, %61'inde CCCP, CPZ ve RES ile INH MİK değerlerinde düşüş gözlenmiştir. VER'in ilaçların *M.tuberculosis* hücrelerinde etkinliğini arttırmak için EP'leri engellediği ve etkisinin CCCP, RES ve klorpromazinden daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda kombinasyon kemoterapisinde VER kullanımının; *M.tuberculosis*

ile enfekte makrofajlarda basilin uzaklaştırılmasını sağladığı, hücre içi basilin büyümesini ve toleransını inhibe ettiği, ilaç dozajının, tedavi süresinin ve nüks oranının azalması şeklinde etkileri olduğu görülmüştür^{22,23}.

Mikobakterilerde efluks pompalarına bağlı ilaç direnciyle ilgili yapılan çalışmalar genellikle duyarlı ve H37Rv suşlarında pompa inhibitörleri ile ilacın MİK değerindeki azalmanın gösterilmesi veya moleküler yöntemlerle pompa genlerinin tespit edilmesine dayanmaktadır^{1,5,6}. Tüm dünyada dirençli *M.tuberculosis* klinik izolatlarında EPİ'lerin; anti-TB ilaçlarının MİK değerleri ve aynı zamanda aşırı eksprese edilen efluks sistemleri üzerindeki etkilerinin belirlendiği çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. Bu çalışmada ise VER varlığında (1/2 MİK) birinci seçenek anti-TB ilaçların MİK'ine maruz bırakılan izolatlarda ABC ailesinden sekiz (Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv0194, Rv1272c, Rv1686, Rv1687c, Rv1819c), RND ailesinden iki (Rv0507, Rv0676c) ve MFS ailesinden altı (Rv0842, Rv0849, Rv1634, Rv2265, Rv2456c, Rv0876c) adet efluks pompa geninin ekspresyon seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Ekspresyon seviyelerinde azalma tespit edilen Rv1458c Rv1686, Rv0676c, Rv1634 ve Rv2265'in hem INH hem de EMB direnci; Rv1456c, Rv1457c ve Rv0842'nin hem INH hem de RIF direnci; Rv0194, Rv1272c, Rv0849, Rv0849 ve Rv2456c'nin RIF direnci; Rv0507'nin INH direnci; Rv1687c, Rv1819c ve Rv0876c'nin EMB direnci ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ayrıca VER varlığında INH'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv1877; EMB'ye maruz bırakılan izolatlarda Rv0507, Rv0849, Rv1250, Rv1272c, Rv1456c ve 2456c'nin ekspresyon seviyelerinde ise artış olduğu tespit edilmiştir. VER varlığında EMB'ye maruz bırakılan izolatlarda ekspresyon seviyesinde artış saptanan Rv0849, Rv1272c ve 2456c'nin RIF'e; Rv0507'in INH'ye; Rv1456c'nin hem RIF hem de INH'ye maruz bırakıldığında ise ekspresyon seviyelerinde azalış olduğu görülmüştür. Caleffi-Ferracioli ve arkadaşlarının RIF ve VER kombinasyonuna maruz kalan *M.tuberculosis* H37Rv suşunda 16. ve 72. saatte meydana gelen morfolojik değişiklikleri ve 12 adet efluks pompa geninin ekspresyonu araştırdıkları çalışmada²⁴; RIF + VP kombinasyonuna 16 ve 72 saatlik maruziyette sırasıyla, altı EP geninin (Rv1218, Rv1457, Rv1819, Rv1217, Rv2459 ve Rv1258) ve dört EP genin (Rv1457, Rv1258, Rv2846 ve Rv2942) ekspresyon seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır.

Ülkemizde, dirençli klinik izolatlarda direnç ile ilişkili EP genlerinin ekspresyon seviyelerinin ve EPİ'lerin araştırıldığı çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. Yapılan çalışmalarda sadece EPİ'lerin MİK değerleri üzerine etkilerinin ve dirence neden olan mutasyonların belirlendiği veya primer anti-TB ilaçlara maruz bırakılmayan ya da sadece EPİ/INH/RIF ile muamele edilen izolatlardaki EP genlerinin ekspresyon seviyelerinin araştırıldığı görülmüştür^{13,25-28}. Çalışmamız, INH ve RIF direncinin yanı sıra diğer anti-TB ilaçlara da dirençli klinik örneklerin dahil edildiği, dirence neden olabilecek efluks pompa genlerinin belirlendiği, hem de artan dirençten dolayı alternatif tedavide kullanılabileceği düşünülen EPİ'lerden VER'in etkinliğini sağlayan mekanizmaların moleküler düzeyde ortaya konulduğu çok kapsamlı bir çalışmadır. Bu çalışmanın en önemli kısıtlılığı, artan efluks mekanizmaları ile ilişkilendirilen ve ilaç direncine neden olan gen bölge-lerindeki mutasyonların belirlenmemiş olmasıdır.

Sonuç olarak, *M.tuberculosis* suşlarında EP'lerin aşırı aktivitesinin direnç seviyesine olan katkısını araştırmak için klinik izolatlar ile yapılacak daha fazla çalışmaya gereksinim bulunmak-

tadır. Ayrıca, anti-TB tedavisinin adjuvanları olarak da EPI'lerin kullanımının yeni ve daha kısa terapötik stratejilerin geliştirilmesi konusunda umut verici olduğu düşünülmüştür.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışma, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Sayı: 2018/85, Tarih: 22/02/2018).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Garima K, Pathak R, Tandon R, Rathor N, Sinha R, Bose M, et al. Differential expression of efflux pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. *Tuberculosis* 2015; 95(2): 155-61. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.01.005>
2. World Health Organization (WHO) (2020). Global Tuberculosis Report, 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131> (Accessed date: 29.04.2022).
3. 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*. *Front Microbiol* 2017; 8: 711. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00711>
4. Coelho T, Machado D, Couto I, Maschmann R, Ramos D, von Groll A, et al. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Front Microbiol* 2015; 6: 330. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00330>
5. Song L, Wu X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 47(6): 421-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.007>
6. Black PA, Warren RM, Louw GE, van Helden PD, Victor TC, Kana BD. Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(5): 2491-503. <https://doi.org/10.1128/AAC.02293-13>
7. 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.01577-08>
8. Narang A, Giri A, Gupta S, Garima K, Bose M, Varma-Basil M. Contribution of putative efflux pump genes to isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mycobacteriol* 2017; 6(2): 177-83. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_26_17
9. 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4775-4777.2005>
10. Jaiswal I, Jain A, Verma SK, Singh P, Kant S, Singh M. Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *Lung India* 2017; 34(6): 499-505. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.217567>
11. Amaral RCRD, Caleffi-Ferracioli KR, Demitto FDO, Almeida ALD, Siqueira VLD, Scodro RBDL, et al. Is the efflux pump inhibitor Verapamil a potential booster for isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*? *Braz J Pharm Sci* 2020; 56:e18309. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000218309>
12. 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. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.001>
13. AlMatar M, Var I, Kayar B, Köksal F. Differential expression of resistant and efflux pump genes in MDR-TB isolates. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020; 20(2): 271-87. <https://doi.org/10.2174/1871530319666191009153834>

14. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119013>
15. Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, et al. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb Drug Resist* 2010; 16(1): 21-8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0054>
16. Li G, Zhang J, Guo Q, Wei J, Jiang Y, Zhao X, et al. Study of efflux pump gene expression in rifampicin-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Antibiot (Tokyo)* 2015; 68(7): 431-5. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.9>
17. Li P, Gu Y, Li J, Xie L, Li X, Xie J. *Mycobacterium tuberculosis* major facilitator superfamily transporters. *J Membr Biol* 2017; 250(6): 573-85. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9982-x>
18. Shahi F, Khosravi AD, Tabandeh MR, Salmanzadeh S. Investigation of the Rv3065, Rv2942, Rv1258c, Rv1410c, and Rv2459 efflux pump genes expression among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Heliyon* 2021; 7(7): e07566. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07566>
19. Sharma S, Kumar M, Sharma S, Nargotra A, Koul S, Khan IA. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(8): 1694-701. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq186>
20. Kardan-Yamchi J, Kazemian H, Haeili M, Harati AA, Amini S, Feizabadi MM. Expression analysis of 10 efflux pump genes in multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Glob Antimicrob Resist* 2019; 17: 201-8. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.003>
21. Souza JVP, Murase LS, Caleffi-Ferracioli KR, Palomo CT, de Lima Scodro RB, Siqueira VLD, et al. Isoniazid and verapamil modulatory activity and efflux pump gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2020; 24(6): 591-6. <https://doi.org/10.5588/ijtld.19.0458>
22. Gupta S, Tyagi S, Almeida DV, Maiga MC, Ammerman NC, Bishai WR. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 600-7. <https://doi.org/10.1164/rccm.201304-0650OC>
23. Adams KN, Szumowski JD, Ramakrishnan L. Verapamil, and its metabolite norverapamil, inhibit macrophage-induced, bacterial efflux pump-mediated tolerance to multiple anti-tubercular drugs. *J Infect Dis* 2014; 210(3): 456-66. <https://doi.org/10.1093/infdis/jju095>
24. Caleffi-Ferracioli KR, Amaral RC, Demitto FO, Maltempe FG, Canezin PH, Scodro RB, et al. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. *Tuberculosis* 2016; 97: 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.12.010>
25. Çalgın MK, Şahin F, Türegün B, Gerçek D, Atasever M, Köksal D, et al. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76(3): 291-7. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.033>
26. Tuncer Ö. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks klinik izolatlarında izoniazid direncine neden olan dışa atım pompalarının saptanması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2016, Ankara.
27. Alakbarova G. *Mycobacterium tuberculosis* ilaç direncinde dışa atım (efflüks) pompasının etkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017, Samsun.
28. Al-Bayati A. Efflux pump gene expression and efflux proteins in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2019, Adana.