

В. В. Мінухін, Т. Ю. Колотова, Н. І. Скляр

## АНТИЕВОЛЮЦІЙНА ТЕРАПІЯ: НОВИЙ ПІДХІД ДО ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»



Антибіотики здійснили революцію у медицині. Завдяки їхньому застосуванню було врятовано незліченну кількість людей. Проте внаслідок розвитку стійкості до протимікробних препаратів у медицині виникла серйозна криза. Стійкість до протимікробних препаратів швидко розвивається до всіх нових терапевтичних засобів. Це є наслідком генетичної мінливості мікроорганізмів, зокрема й мутагенезу. Згідно із синтетичною теорією еволюції, генетичні перебудови та мутації виникають випадково, вони не локалізовані ні в часі, ні у просторі геному і немає молекулярних механізмів мінливості. Якщо це припущення правильне, то протистояти розвитку стійкості до протимікробних засобів неможливо.

Однак останнім часом панівні погляди на природу мінливості зазнають докорінних змін. Відкриття класифікованих регулярно розташованих коротких паліндромних повторів (CRISPR) системи адаптивного захисту прокариотів від бактеріофагів показало принципову можливість спрямованих локалізованих генетичних перебудов селективним фактором.

Революцію у поглядах на природу мінливості зробило відкриття адаптивного чи стрес-індукованого мутагенезу. Було доведено, що в умовах стресу у мік-

роорганізмів включаються молекулярні механізми мінливості, дія яких може бути локалізована в ділянці генів, що активно транскрибуються. Численні експериментальні дані підтвердили, що антибіотики, спричиняючи стрес, індукують адаптивний мутагенез. Отже, препарати, що пригнічують регуляторні шляхи та молекулярні механізми мутагенезу, можуть перешкоджати розвитку антибіотикостійкості. Саме цей принцип є основою нового напрямку у медицині антиеволюційної терапії.

**Ключові слова:** стійкість до протимікробних препаратів, антибіотики, бактеріофаги, CRISPR адаптивна система захисту прокариотів, адаптивний мутагенез, SOS відповідь, транслейзійні полімерази, Mfd фактор, антиеволюційні препарати.

### Стійкість до протимікробних препаратів – гостра проблема системи охорони здоров'я

Антибіотики здійснили революцію в медицині та врятували безліч життів. Однак нині через розвиток стійкості до протимікробних препаратів ситуація стає критичною. Антибіотикостійкість класифікована Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) як одна з 10 основних глобальних загроз для системи охорони здоров'я [1]. Всесвітня асамблея охорони здоров'я звернулася до ВООЗ із проханням запропонувати глобальний план дій щодо боротьби з проблемою стійкості до антибіотиків [2]. Якщо проблема не буде вирішена, то дуже багато захворювань стануть невиліковними.

Антибіотикостійкість призводить до хронічних захворювань часто з летальним вислідом. За оцінками, щорічно від інфекцій з медикаментозною стійкістю вмирає щонайменше 700 000 людей [3]. Це число може зрости до 10 млн до 2050 р., що набагато перевищить число смертей від раку – натеper основної причини смертності в усьому світі [4]. Терапія інфекційних захворювань зіткнулася із серйозною проблемою появи та швидкого поширення бактерій із множинною лікарською стійкістю [5].

Резистентність до антибіотиків виникає в результаті поглинання генів стійкості від інших бактерій або мутації нативних генів. При цьому мутагенез є основним шляхом набуття стійкості у пріоритетних патогенів, визначених ВООЗ [6]. Саме мутагенез лежить в основі розвитку стійкості *Helicobacter pylori* до тетрацикліну, *Mycobacterium tuberculosis* до ізоніазиду та *Enterobacteriaceae* до карбапенему. Мутагенез є основним шляхом набуття стійкості до фторхінолонів, колістину та антибіотика «останнього шансу» даптоміцину [7]. У разі *M. tuberculosis* набуття стійкості відбувається тільки за рахунок мутацій [8]. Мутації є основною причиною виникнення резистентних до терапії ентеробактерійних внутрішньолікарняних інфекцій [9].

Інвазивні грибкові інфекції є однією з найпоширеніших причин глобальної захворюваності та смертності, на їхню частку припадає майже 1,4 млн смертей на рік [10]. Протягом понад трьох десятиліть кандидозну інфекцію лікували азоловими протигрибковими препаратами, які впливають на мембрани грибів, пригнічуючи біосинтез ергостеролу. Однак майже 20 % штамів *Candida glabrata* виявляють природню стійкість до азолів, і навіть чутливі штами швидко набувають стійкості [11].

Стійкість до азолів у *Candida albicans* може бути викликана надекспресією транспортерів, які забезпечують видалення ліків із клітини. Надекспресія може бути досягнута за рахунок ампліфікації генів-переносників, хромосомних перебудов або збільшення числа хромосом, що призводить до збільшення кількості копій генів-переносників, а також за рахунок точкових мутацій факторів транскрипції, що регулюють експресію генів-переносників. Стійкість до азолів також може бути опосередкована мутаціями в гені, що кодує їх клітинну ціль – білок Erg11, або мутаціями в регуляторах транскрипції ERG11, що призводять до надекспресії Erg11 [11]. Навпаки, у *C. glabrata* єдиної мутації в транскрипційному активаторі транспортерів достатньо, щоб забезпечити високий рівень стійкості до азолів [11].

Формування стійкості до азолів призвело до того, що зараз широко використовуються ехінокандинові протигрибкові препарати. Резистентність до ехінокандинів майже завжди зумовлена мутаціями у двох високонсервативних «гарячих точках» генів, що кодують субодиниці β-глюкансинтази [11]. Стійкість до ехінокандину іноді набувається дуже швидко протягом 8 днів [12]. Багато стійких до ехінокандину *C. glabrata* також стійкі до азолу [11].

Взагалі слід зазначити, що після появи антибіотиків мікробіологи були впевнені, що ймовірність виникнення стійкості до них мізерно мала, оскільки швидкість мутацій, що викликають резистентність, яку було виявлено

в експериментальних дослідженнях, дуже низька [13]. Проте практично все сталося інакше. Нині немає жодного антибіотика, до якого не формувалась би резистентність.

Резистентність зазвичай оминають шляхом розробки нових антибіотиків. Проте темпи розвитку резистентності набагато перевищують темпи запровадження нових антибіотиків [14].

Наприклад, умови, що імітують ті, з якими кишкова паличка стикається у своїй ніші проживання, дозволяють набутти їй стійкість до ципрофлоксацину за 10 годин [15]. Для того, щоб розробити новий препарат, потрібно значно більше часу.

Альтернативою антибіотикотерапії є фаготерапія. У фаговій терапії для боротьби з бактерійними інфекціями використовуються віруси, які специфічно заражають бактерії. Найбільш ефективними були результати лікування інфекцій, що не піддаються лікуванню традиційними антибіотиками. Фаготерапія вперше з'явилася понад 100 років тому, а нині переживає відродження інтересу.

Нещодавно антибактерійні ферменти, отримані з бактеріофагів, так звані «ензибіотики», викликали інтерес через швидкий спосіб дії поряд з високою специфічністю [16].

Описано два класи ферментів фагового походження: гідролази пептидогліканів (так звані «лізини»), які руйнують клітинну стінку бактерій, та полісахариддеполімерази, які розщеплюють полісахариди, пов'язані з поверхнею бактерій. Отримані з фагів ензибіотики довели свою високу ефективність на тваринних моделях проти грампозитивних бактерій та грамнегативних патогенів. Лізини були задіяні у кількох клінічних дослідженнях [16].

Однак фаготерапія також зіткнулася із низкою проблем. Ці проблеми включають обмежений діапазон бактерійних мішеней, ймовірність опосередкованої фагами трансдукції бактерійної ДНК, зокрема перенесення антибіотикостійкості. Водночас розвиток фагорезистентності може стати найбільшою перешкодою на шляху успіху фаготерапії.

Для подолання цих проблем розроблено так звані фагові коктейлі [17, 18]. Коктейлі є препаратами, що містять кілька типів фагів. Якщо визначено вид бактерійної інфекції, що підлягає лікуванню, можна використовувати коктейлі, що містять специфічні для цього виду бактерій фаги. Як альтернативу можна використовувати фагові коктейлі, розроблені для конкретного типу захворювань. Оскільки механізм резистентності до фагів та антибіотиків різний, нині ведуться дослідження щодо використання фагів і фагових коктейлів для комбінованої з антибіотиками терапії бактерійних інфекцій [18, 19].

Битва між стійкими до протимікробних препаратів патогенами та організмом хазяїна, між фагами та бактеріями – це гонка «озброєнь», яка ніколи не припиняється. І щоб у ній перемагати, потрібні нові підходи для зниження темпів зростання кількості стійких до ліків патогенів.

До цього часу загальноприйнятою була думка, згідно з якою мутації виникають до зіткнення мікроорганізмів з антибіотиками або фагами, і уповільнити швидкість їх появи неможливо. Такий погляд паралізував пошук нових методів лікування інфекцій. Якщо виходити з припущення, що антибіотикостійкість і фагорезистентність виникають випадково з такою високою швидкістю, то немає способів запобігання їх розвитку. Це неминуче призведе до вичерпання можливостей антибіотикотерапії та фаготерапії. Проте останнім часом з'явилися експериментальні докази невідповідності мутацій та існування спеціалізованих еволюційних механізмів, що прискорюють мінливість мікроорганізмів. Ці дані дозволяють сформулювати нові підходи до пошуку препаратів, що пригнічують здатність бактерій генетично змінюватись та еволюціонувати, що може суттєво покращити результати терапії.

### Генетична мінливість із погляду синтетичної теорії еволюції

У середині минулого століття було створено синтетичну теорію еволюції [20]. Відповідно до цієї теорії, основним матеріалом для еволюції є не спрямовані випадкові мутації. Генетичні зміни випадкові стосовно селективних факторів, до інформації, яку отримує клітина із зовнішнього середовища, до метаболізму клітини, до історії розвитку самого геному, його функціональної активності та архітектури. Мутації відбуваються випадково як у часі, так і у геномному просторі. Якщо й існують гарячі точки мутагенезу, то виникають вони випадково через функціональну активність геному і зв'язану з нею архітектуру геному. Просте поєднання нуклеотидів може створювати гарячі точки мутагенезу, інсерцій мобільних елементів та перебудов геному.

У синтетичній теорії еволюції не передбачаються якісь особливі механізми генетичної мінливості. Згідно з теорією, джерелом мутацій є помилки при реплікації ДНК, дія внутрішніх і зовнішніх мутагенів, помилки систем репарації. Джерелом перебудов ДНК є одноланцюгові та дволанцюгові розриви ДНК, що виникають спонтанно або під впливом мутагенів.

Уявлення синтетичної теорії еволюції про випадковість мутацій значною мірою ґрунтуються на дослідах Лурія та Дельбрюка, здійснених у середині минулого століття [21]. Результати цих дослідів дозволили зробити вибір між двома припущеннями про походження

стійких до фага бактерій. Відповідно до однієї точки зору, стійкість до бактеріофага індукується самим бактеріофагом. Згідно з другою, – ще до впливу бактеріофага на культуру в ній вже є невелика кількість стійких клітин. Мутанти спонтанно виникають при поділі клітин через помилки ДНК-полімерази або дії мутагенів. При висіві культури бактерій на агар, що містить фаг, відбувається не індукція стійкості, а відбір стійких варіантів. Ці дві точки зору призводять до різних передбачень стосовно статистичних закономірностей формування стійких колоній. Так, у разі індукції при посіві на агар кількість стійких мутантних колоній у кожній чашці буде незначно відрізнятися від середньої кількості колоній, підрахованих на всіх чашках з агаром. У той же час, при випадковій появі мутантних варіацій очікуються значні флуктуації кількості стійких до бактеріофага колоній у чашках. У дослідах Лурія і Дельбрюка спостерігалися великі флуктуації числа бактерій в індивідуальних культурах. Отриманий вченими результат переконливо підтверджував виникнення стійких варіантів до зіткнення з фагом: великі коливання свідчать проти гіпотези індукованої стійкості, коли дисперсія має бути невеликою. Такий висновок підтверджено і результатами дослідів, поставленого подружжям Lederberg [22].

Як зазначається у роботі Rando та Verstrepen, в експериментах Лурія та Дельбрюка селективні умови дуже жорсткі і тому всі чутливі клітини гинуть дуже швидко [23]. Результати цих експериментів доводять, що деякі мутації відбуваються до селекції, проте не доводять, що стресові умови не здатні створювати нові варіанти стійкості шляхом спрямованого впливу селективного чинника на мінливість.

Зараз все очевиднішою стає суперечка між фундаментальними уявленнями синтетичної теорії еволюції про природу мінливості та експериментальним матеріалом, Цей факт дозволяє припустити, що генетичні зміни можуть бути як корисними, так і нейтральними, або навіть шкідливими. Але є механізми та закономірності, які лежать в основі їхньої появи.

### Адаптивний механізм виникнення стійкості до бактеріофагів

Парадоксально, але найточніші докази набуття під дією факторів довкілля успадкованих адаптивних змін геномів прокариотів отримані при вивченні розвитку резистентності до бактеріофагів. Бактеріофаги та плазмідні індукують розвиток резистентності до себе за допомогою адаптивної системи захисту бактерій.

В адаптивній захисній «імунній» системі прокариотів специфічність визначається спейсерами CRISPR (класифіковані регулярно розташовані короткі паліндромні повтори) локусу, а сама резистентність та її виникнення

– ферментами, що кодуються *cas* генами [24]. CRISPR локуси змінюються у відповідь на зіткнення з фагами і плазмідами за рахунок додавання нових спейсерів, джерелом яких є геном мобільного елемента, до лідируючого кінця CRISPR локусів, утворюючи успадковувани генетичні записи про спроби проникнення в клітину чужорідних елементів [25].

Таким чином, мобільні елементи, що переносяться горизонтально, не тільки відбирають стійкі варіанти, але й індукують їх появу. Зміни, що виникли, адаптивні до селективного фактора і успадковуються клітиною.

Відкриття CRISPR/*cas* системи захисту бактерій фактично доводить можливість спрямованої зміни геному селективними факторами. Якщо при адаптивній імунній відповіді антиген відіграє селективну роль, відбираючи варіанти антитіл (щоправда, він опосередковано індукує процес соматичного гіпермутагенезу), специфічність резистентності до бактеріофагів і плазмідів досягається за допомогою інструктивного процесу, при якому самі мобільні елементи дають інформацію. При імунній відповіді антиген відіграє селективну роль, відбираючи варіанти антитіл. Щоправда, він опосередковано індукує процес соматичного гіпермутагенезу. Специфічність резистентності до бактеріофагів і плазмідів досягається за допомогою інструктивного процесу, при якому самі мобільні елементи дають інформацію, що визначає специфічність відповіді. Результати, отримані під час процесу, адаптивні, успадковувани і є матеріалом для еволюції [26].

#### Адаптивний мутагенез прокариотів

Революційним етапом у вивченні процесу мутагенезу стало відкриття адаптивних мутацій або стрес-індукованих мутацій. Це мутації, які відбуваються в клітинах, що не діляться або дуже повільно діляться під час тривалої не летальної дії селективного фактора.

Найбільш вивченими на цей час є адаптивні мутації, виявлені щодо лактозного гена *Escherichia coli* [27]. FC40 штаму *E. coli* не використовує лактозу, тобто є *Lac*<sup>-</sup>; внаслідок мутації химерного гена *LacI-LacZ*, локалізованого на F-плазміді. При інкубації клітин *E. coli* на мінімальному середовищі, що містить лактозу як єдине джерело вуглецю, з'являються колонії *Lac*<sup>+</sup> ревертантів. На другий день з'являються колонії із клітин-ревертантів, які утворилися до поміщення бактерій на селективне середовище. Після другої доби колонії продовжують з'являтися з однаковою швидкістю протягом 5-7 днів, але їх формування є результатом виникнення ревертантних мутацій в клітинах, що перебувають у стаціонарній фазі, на середовищі, що містить лактозу [28]. Швидкість накопичення *Lac*<sup>+</sup> ревертантів та їх кінцевий рівень не підпорядковується розподілу Лурія-Дельбрюка, а підпо-

рядковується пуассонівському розподілу. Цей факт підтверджує появу мутацій на селективному середовищі. Тобто селективне середовище індукує утворення адаптивних ревертантів.

Подальші дослідження адаптивних мутацій наблизили вчених до розуміння того, що в стресових умовах, коли клітина повинна або змінитись, або загинути, активуються механізми мінливості геному [7, 29].

Виявилося, що для виникнення адаптивних мутацій в гені *Lac* кишкової палички, по-перше, повинні відбуватися подвійні розриви ДНК. По-друге, має активуватися SOS-відповідь, яка у свою чергу активує транслейзійні полімерази. Однак цього недостатньо для того, щоб транслейзійні полімерази почали працювати в режимі утворення мутацій [7]. Для того, щоб це сталося, потрібна третя подія, якою є активація так званої загальної відповіді на стрес [7].

У бактерій є специфічні реакції на стрес, які активуються конкретними сигналами навколишнього середовища та регулюють експресію генів, що допомагають клітині уникати або відновлювати конкретні ушкодження. Прикладом такої відповіді на стрес є SOS-відповідь. У нормальних умовах репресор транскрипції білок *LexA* зв'язується з регуляторними ділянками ряду генів та пригнічує їхню транскрипцію. Але з появою подвійних розривів чи зупинки реплікації ДНК утворюється одноланцюгова ДНК. До одноланцюгової ДНК приєднується білок *RecA*. Активованій *RecA* формує *RecA*-ДНК нитки (філаменти), що складаються з *RecA* мономерів, молекул АТФ і ДНК.

Філаменти виконують дві функції [30]. По-перше, вони індукують SOS програму транскрипції, стимулюючи автопротеоліз *LexA*. Після автопротеолізу *LexA* втрачає здатність зв'язуватися з ДНК, що активує транскрипцію генів SOS-відповіді. По-друге, філаменти прямо беруть участь у гомологічній рекомбінації та репарації ДНК [31]. Репарація подвійних розривів за допомогою гомологічної рекомбінації може відбуватися в клітинах, що перебувають у стаціонарній фазі, тому що 40 % з них містять більше, ніж одну хромосому. Щойно пошкодження ДНК відновлюється, відновлюється і реплікація ДНК, а SOS-регулон пригнічується.

Для ранньої фази SOS-відповіді характерні безпомилкові типи репарації: гомологічна рекомбінація та ексцизійна репарація нуклеотидів. Однак, якщо пошкодження було великим і не було повністю усунуто, активуються транслейзійні або мутагенні полімерази *Pol V* та *Pol IV* (меншою мірою) [32]. Є особливий клас полімераза, що синтезують ДНК при зупинці реплікації або при утворенні пошкоджень ДНК, які не може подолати звичайна ДНК-полімераза. У таких випадках реплікаційна ДНК-полімераза заміщається однією з позбавлених

функції редагування транслейзійних полімераз, що дозволяє подолати перешкоду введенням нуклеотиду, після чого синтез триває звичайною полімеразою, що знову приєдналася. Транслейзійний синтез може бути помилковим або безпомилковим, залежно від того, вводиться проти пошкодженого нуклеотиду правильний або неправильний нуклеотид.

В умовах SOS-відповіді більша частина мутагенезу відбувається в результаті дії транслейзійної полімерази Y-родини ДНК-полімерази V [30]. ДНК-полімераза V є гетеротримером, що складається з каталітичної субодиниці UmuC та димера UmuD', продукту автопротеолізу UmuD. Комплекс UmuC з UmuD'2, RecA та АТФ називають «мутасомою». Саме мутасома здійснює індукований мутагенез [33]. Щоб обмежити будь-який «безпричинний» мутагенез, активність мутасоми суворо регулюється в клітині на декількох рівнях [34, 35].

Відкриття мутасом свідчить про те, що, по-перше, у клітині поряд з такими метаболічними функціями як реплікація, рекомбінація, репарація є й така метаболічна функція як мутагенез. А по-друге, швидкість мутагенезу регулюється.

Крім специфічних реакцій на стрес бактерії мають генетичну програму загальної відповіді на стрес. Активація ж загальної відповіді на стрес викликається безліччю різних чинників, а в результаті з'являється перехресна стійкість до стресів, не використаних у початковій індукції. Глобальним регулятором, що опосередковує загальну реакцію на стрес, є сигма-фактор RpoS.

Бактерійні сигма-фактори, включаючи RpoS, є субодиницями РНК-полімерази, які при приєднанні перенаправляють полімеразу і транскрипцію від одних генів до інших. RpoS збільшує експресію більш ніж 140 генів кишкової палички у відповідь на різні стресові умови.

Таким чином, перш ніж приступити до мутагенезу, клітина повинна відчути як мінімум два різні стресорні сигнали: пошкодження ДНК, які індукують SOS-відповідь, та активацію загальної відповіді на стрес за допомогою RpoS [7].

Процес гіпермутагенезу активується не у всіх клітинах популяції. При попаданні на селективне середовище диференціюється субпопуляція гіпермутабельних клітин із підвищеною швидкістю мутагенезу [7, 36]. Збільшення швидкості мутагенезу тимчасове та припиняється після виникнення Lac<sup>+</sup> мутацій.

З усього викладеного випливає, по-перше, що швидкість виникнення мутацій не постійна в часі, а контролюється факторами зовнішнього середовища та внутрішніми програмами відповіді клітин на стресові умови, а, по-друге, є спеціалізовані механізми мутагенезу, які тимчасово підвищують швидкість мутагенезу у стресованій клітині. Активація механізмів мутагенезу у відпо-

відь стрес локалізує виникнення адаптивних мутацій у часі. Ці дані принципово змінюють наші уявлення про процеси мутагенезу та генетичної мінливості загалом. Швидкість мутацій не стала, вона регулюється, як і інші біохімічні процеси в клітині.

Крім кишкової палички, добре вивчений адаптивний мутагенез *Bacillus subtilis*. Спочатку мутагенез вивчали на штаммах, що містять ауксотрофні алелі трьох генів: hisC952, metB5 та leuC427 [37]. При інкубації на середовищі, що не містить однієї з необхідних амінокислот, через кілька днів з'являлися прототрофні ревертанти, здатні синтезувати відповідну амінокислоту. У *B. subtilis* адаптивні мутації генів не залежать від гомологів RpoS фактора та RecA білка [38]. У той же час виникнення адаптивних мутацій залежить від клітинного диференціювання. Нестача поживних речовин спричинює стрес і активує диференціювання клітин. Приблизно 10 % клітин від загальної популяції бактерій набувають компетентності в умовах стресу. У цій субпопуляції швидкість мутагенезу підвищена [38].

Мутагенез збільшується в генах, що транскрибуються з високою швидкістю, внаслідок дії селективного фактора на ці гени. Такий висновок підтверджується, по-перше, вивченням патерну транскрипції за допомогою мікроеррей-аналізу в умовах старвації за амінокислотами. Алелі, що утворюють адаптивні мутації, дерепресуються в умовах голодування та активації сильної відповіді на стрес [39]. По-друге, експериментально показано, що швидкість мутагенезу безпосередньо пов'язана з рівнем транскрипції мутантного leuC гена в селективних умовах [40]. Отже гіпермутагенез у цій системі локалізований транскрибованими генами.

Подальші дослідження підтвердили зв'язок між транскрипцією та виникненням адаптивних мутацій. Один із факторів елонгації транскрипції, так званий Mfd (від англ. *mutation frequency decline* – зниження частоти мутацій), виявився промутагенним фактором, необхідним для утворення адаптивних мутацій у *B. subtilis* [41]. Під час фази елонгації транскрипції перешкоди, створені ушкодженнями ДНК, ДНК-зв'язувальними білками або специфічними структурами ДНК, змушують РНК-полімеразу ковзати назад по матриці (проходити зворотний шлях) [42, 43]. АТФ-залежна транслоказа Mfd може або запобігти поверненню РНК полімерази, дозволяючи їй подолати перешкоду, або, якщо перешкода занадто велика, Mfd видаляє РНК полімерази, очищаючи ДНК для інших процесів [42].

Зміщуючи РНК-полімеразу, що зупинилася, Mfd приєднує UvrABC ендонуклеазний комплекс системи репарації ДНК за допомогою ексцизиї нуклеотидів (NER), який збільшує репарацію пошкоджень на ланцюгу, що транскрибується. Шлях репарації, пов'язаний з транскрип-

цією, який використовує білки ексцизійної репарації нуклеотидів, називається TC-NER.

Природно припустити, що за відсутності Mfd, швидкість мутацій повинна підвищуватися, оскільки ушкодження ДНК не репаруються. Проте виявилось навпаки. Інактивація *mfd* гена значно знижує кількість прототрофних Met<sup>+</sup>, His<sup>+</sup> ревертантів і практично повністю скасовує появу Leu<sup>+</sup> ревертантів у *B. subtilis* [41].

У ході подальших досліджень вдалося показати, що в умовах окисного стресу у сінної палички спільна дія принаймні двох ДНК-полімераз викликає NER-залежний мутагенез: реплікативної полімерази PolA і однієї з двох схильних до помилок транслейзійних полімераз Υ-родини PolY1 або PolY2 [44]. Під час TC-NER UvrA та UvrB білки приєднують UvrC нуклеазу, яка вирізає частину ДНК, що містить ушкодження. Утворений пробіл заповнюється PolA полімеразою. Припускають, що при заповненні прогалін з'являються мутації. Відбувається це так. PolA синтезує ДНК під час NER, але зупиняється за наявності перешкоди чи пошкодження ДНК. PolA, що зупинилася, приєднує одну з неточних полімераз PolY1 або PolY2 для подолання перешкоди, збільшуючи ймовірність виникнення мутацій.

Залежність виникнення мутацій від стану транскрипції створює механізм зворотного зв'язку між транскрипцією генів, що знаходяться під селективним тиском, і збільшенням швидкості мутагенезу цих генів. Тобто селективний чинник впливає спрямовано на швидкість транскрипції гена, а в результаті збільшується ймовірність мутагенезу та виникнення адаптивних мутацій цього гена. Отже селективний чинник може активувати не лише механізм виникнення мутацій, а й локалізувати мутагенез у просторі геному, змінюючи транскрипцію певних генів. Mfd діє як промутагенний фактор і в період активного росту [45, 46], а також у стаціонарній фазі [40, 47]. Тому цілком ймовірно, що мутагенез і в клітинах, що діляться, локалізований транскрипцією.

#### Адаптивний мутагенез грибів

Адаптивні мутації описані і в еукаріотичних мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* та *C. albicans* [48-51].

При дослідженні реверсії до прототрофії по амінокислоті лізину Lys у гаплоїдному штамі дріжджів *S. cerevisiae*, що містить мутацію гена *lys2*, клітини висівали на середовище, що не містить лізин [48]. Розподіл колоній ревертантів Lys<sup>+</sup>, що з'явилися рано, свідчить про те, що мутації виникли до посіву на селективне середовище. Навпаки, розподіл колоній Lys<sup>+</sup>, що з'явилися пізно, вказує на те, що ревертанти утворилися після посіву. В умовах неселективного голодування ревертантів не було, що свідчило про адаптивний характер мутагенезу.

Найбільш переконливі докази існування адаптивного мутагенезу були отримані при дослідженні формування стійкості до міді. Було виявлено, що поява варіацій кількості копій (CNV) гена стійкості до міді CUP1 індукуюється міддю, що знаходиться в навколишньому середовищі [49]. У дріжджових клітинах відбувається ампліфікація гена стійкості до міді CUP1, що призводить до швидкої появи адаптованих клонів. Утворення генетичної перебудови регулюється як активністю промотора гена, так і ацетилюванням лізину в положенні 56 гістону H3 (H3K56ac). Епігенетична модифікація гістонів виявилася необхідною для ампліфікації гена. Причому глобального збільшення ацетилювання H3K56 недостатньо для запуску CNV. Необхідне локальне збільшення.

Припускають, що мідь, тобто селективний фактор, надає сигнал шлях, який, у свою чергу, переважно активує транскрипцію того гена, який важливий у цьому середовищі, порівняно з генами, які не важливі [49]. Зміна копій такого гена з більшою ймовірністю дасть корисний адаптивний результат, ніж CNV випадкового гена. Однак більшість перебудов геному призводили до скорочення копій гена CUP1, що знижувало стійкість до міді. Але порівняно з випадковими мутаціями ймовірність появи адаптивних варіантів CNV однаково значно вища.

Таким чином, еукаріоти мають механізми мінливості, які можуть діяти локально в просторі геному, а їх активність регулюється селективним фактором за допомогою сигнальних систем.

#### Індукція антибіотиками адаптивного мутагенезу

Оскільки лікування антибіотиками викликає стрес у клітинах мікроорганізмів, можна припустити, що антибіотики активують механізми адаптивної генетичної мінливості.

Протягом десятиліть було відомо, що субінгібіторні концентрації хінолонів збільшують частоту мутацій у різних бактерій. Незважаючи на ці спостереження, залишалось незрозумілим, за яким механізмом антибіотики індукують мутагенез. Однак останнім часом отримано переконливі докази того, що ципрофлоксацин та інші хінолони активують механізми геномної мінливості. Це призводить до тимчасового збільшення швидкості виникнення мутацій та розвитку резистентності до себе [52].

Топоізомерази II типу утворюють подвійні розриви ДНК та видаляють суперспіралізацію ДНК як під час реплікації, так і під час транскрипції. Хінолони стабілізують тимчасові подвійні розриви ДНК, що утворюються топоізомеразою II, і тим самим активують SOS-відповідь у всіх клітинах. Однак виявилось, що ципрофлоксацин активує не тільки SOS-відповідь, але і так званий суворий контроль або сувору відповідь на стрес [53].

При активації суворої відповіді на стрес, що викликається насамперед нестачею різних поживних речовин, синтезуються гуанозинтетра- і пентафосфати, що спільно позначаються як (p)ppGpp, які є вторинними месенджерами. Синтезує (p)ppGpp фермент RelA.

Як і всі вторинні месенджери, (p)ppGpp, що генерується стресом, регулює величезну кількість сигнальних шляхів, впливаючи на безліч реакцій клітинного метаболізму. У кишкової палички (p)ppGpp регулює експресію приблизно 700 генів. Найбільш поширеним ефектом (p)ppGpp є індукція або пригнічення промоторів транскрипції. Однак часто пригнічення за допомогою (p)ppGpp включає пряме зв'язування з білком-мішенню. Так у *E. coli* (p)ppGpp безпосередньо зв'язується з РНК-полімеразою у двох ділянках [53, 54].

Ципрофлоксацин у кишкової палички активує синтез (p)ppGpp. (p)ppGpp взаємодіють з РНК-полімеразою, що зупинилася при зіткненні з розривом ДНК, в двох сайтах. При зв'язуванні (p)ppGpp з першою ділянкою РНК полімерази виникає сигнал, який спільно з індукованими хінолонами пошкодженнями ДНК активує залежну від SOS-відповіді програму репарації розривів ДНК. А зв'язування (p)ppGpp з другим сайтом РНК-полімерази активує транскрипційну програму суворої відповіді на стрес та RpoS фактор загальної відповіді на стрес, який перемикає високоточну репарацію подвійних розривів ДНК на мутагенну. Для індукції хінолонами мутагенезу необхідне зв'язування з обома сайтами РНК полімерази [53].

Згідно з даними іншої групи авторів, (p)ppGpp дійсно приєднується до двох окремих сайтів РНК полімерази, але при приєднанні до першого сайту посилюється пов'язана з елонгацією транскрипції репарація TC-NER. Зв'язування (p)ppGpp із сайтом 2 під час ініціації транскрипції викликає сувору відповідь [54].

На підставі цих двох робіт можна припустити, що вторинний месенджер безпосередньо локалізує різні процеси репарації ДНК локусами, що транскрибуються, і сприяє перемиканню режиму роботи репараційних комплексів на мутагенні, можливо, через активацію RpoS фактора.

Клітини, в яких активовані всі три програми відповіді на стрес: SOS-відповідь, відповідь на загальний стрес та сувору відповідь диференціюються у гіпермутабельні клітини. Це приблизно 20 % бактерійної субпопуляції. Гіпермутабельні клітини утворюють більшість ~ 90 % індукованих ципрофлоксацином мутацій, і швидкість мутацій у яких у 400 разів вище, ніж в інших клітинах [53].

Водночас мутагенез, опосередкований антибіотиками, не завжди залежить від транслейзійних полімераз. Наприклад, для делецій, викликаних ципрофлоксаци-

ном, *E. coli* полімерази не потрібні [55]. Але потрібна ДНК pol I, яка зазвичай синтезує ДНК точно. Однак вона починає помилятися, якщо на своєму шляху натрапляє на особливі структури ДНК, які називаються D-петлями [56]. Останні виникають при вбудовуванні одностандартної ДНК в гомологічний район двостандартної ДНК. Двостандартні розриви ДНК, викликані ципрофлоксацином, створюють D-петлі при опосередкованій RecA філаментами гомологічної рекомбінації і тим самим сприяють незалежному від транслейзійних полімераз мутагенезу.

Тривала терапія та використання кількох антибіотиків для лікування мікобактерійних захворювань потребують розуміння механізмів формування антибіотикостійкості. У *M. tuberculosis* при індукції SOS-відповіді активуються дві реплікативні ДНК полімерази: DnaE1 і схильна до помилок ДНК-полімераза C-родина DnaE2. DnaE2-полімераза необхідна для розвитку резистентності до рифампіцину та ципрофлоксацину [57]. DnaE2 полімераза утворює комплекс з гомологом RecA білка ImuA' та каталітично неактивною ДНК полімеразою ImuB. Комплекс, що складається з цих трьох білків, є мутасомою та функціонально аналогічний мутасомі кишкової палички [58]. Відповідно до моделі, запропонованої Gessner зі співавторами, DnaE2 отримує доступ до сайту репарації ДНК, взаємодіючи з ImuB. ImuB функціонує як білок-концентратор, приєднуючись до β-субодиниці ДНК полімеразного комплексу, яка називається β-затискачем, а потім приєднуючи до себе DnaE2 полімеразу та ImuA'. У районі пошкодження ДНК β-затискач одночасно може пов'язувати реплікативну полімеразу та мутасому, сприяти їх обміну для продовження синтезу ДНК мутагенною полімеразою.

Стрес у мікобактерій активує як SOS-відповідь, яка контролюється LexA та RecA, так і другий незалежний шлях, контрольований активатором транскрипції PafBC. Обидва шляхи регулюють експресію мікобактерійної мутасоми [59].

Геном *M. tuberculosis* кодує ще дві DinB транслейзійні полімерази – DinB1, DinB2 – гомологічні Pol IV кишкової палички. Обидві полімерази мають мутагенний ефект *in vivo* і сприяють виникненню стійкості до антибіотиків, у тому числі й до рифампіцину [60].

Вивчення еволюції стійкості *Salmonella typhimurium* до рифампіцину, фосфоміцину, триметоприму, канаміцину та ванкомицину показало, що стійкість до всіх антибіотиків виникла значно швидше і на вищих рівнях у штаммах, що містять Mfd фактор, ніж у штаммах з делецією гена *mfd* [61]. А в експериментах з еволюції стійкості до рифампіцину *M. tuberculosis in vitro* було виявлено, що різниця в середньому рівні стійкості до рифампіцину між штаммами, що містять *mfd*, і штаммами, що не містять *mfd*, складала 1000 разів [61].

Рифампіцин у чотирьох видів бактерій: *B. subtilis*, штаму *Staphylococcus aureus* з множинною медикаментозною стійкістю, *Salmonella enterica Typhimurium* та *Pseudomonas aeruginosa* викликав окислювальний стрес, що стимулює появу антибіотикостійкості [44]. Аналогічні результати були отримані, коли використовували інгібітор трансляції канаміцин та інгібітор синтезу фолату триметоприм у *B. subtilis*, а також інгібітор синтезу клітинної стінки фосфоміцин у *S. aureus*.

У всіх досліджених ситуаціях антибіотики викликали окислювальний стрес та індукували мутагенез за допомогою залучення Mfd фактором системи, пов'язаної з транскрипцією репарації нуклеотидів TC-NER [44]. Для еволюції стійкості до антибіотиків необхідна взаємодія Mfd фактора з бета-субодиницею РНК-полімерази RpoB та з репараційним комплексом NER UvrABC [61]. Відсутність будь-якого білка комплексу UvrABC знижує набуття адаптивних мутацій [44]. Для мутагенезу також потрібна реплікативна полімераза PolA і одна з двох схильних до помилок транслейзійних полімераз Y-родини PolY1 або PolY2 [44].

Індукція антибіотиками мутагенезу переважно вивчалася *in vitro*. Однак у деяких роботах дія антибіотиків була підтверджена *in vivo*. Видалення гена полімерази dnaE2 у *M. tuberculosis* різко знижує появу резистентних мутантів після терапії ципрофлоксацином у мишей [57]. А запобігання розщепленню LexA робить *E. coli* нездатною розвивати стійкість до ципрофлоксацину та рифампіцину на моделі інфекції стегна у мишей [52]. Відповідно до цих спостережень було показано, що пригнічення SOS-відповіді на моделі мишей з нейтропенією повністю усуває появу резистентних мутантів *E. coli* при лікуванні ципрофлоксацином [62].

Антибіотики індукують адаптивний мутагенез і у грибів [50, 51]. При дії азолів на *C. albicans* було виявлено ампліфікацію великих ділянок геному до більш ніж 12 копій [50]. Ампліфікації утворюються швидко та викликають підвищення медикаментозної стійкості. Ампліфікації рееструються по всьому геному, і всі формулюються між двома різними за послідовністю інвертованими повторами, які фланкують ампліфіковану ділянку. Ампліфікувалися гени, які відіграють пряму роль у формуванні стійкості та толерантності до ліків, а також забезпечують інші функції, важливі для адаптації. Як тільки азоли видалюються, кількість копій швидко повертається до норми.

#### Антиеволюційні препарати

Оскільки є механізми мутагенезу, і вони сприяють адаптивній генетичній мінливості мікроорганізмів, то природним є пошук інгібіторів, що пригнічують активність

цих механізмів, або, як їх називають останнім часом, антиеволюційних препаратів.

SOS-відповідь є «машиною стійкості до антибіотиків» оскільки робить істотний внесок в еволюцію стійкості до протимікробних препаратів [63]. Вона може бути інактивована або втраченою RecA, або пригніченням здатності LexA до автопротеолізу. Порушення функцій LexA або RecA призводять до значного пригнічення мутагенезу, індукованого більшістю класів антибіотиків [64].

RecA – дуже консервативний білок, отже він може відігравати подібну роль у різних бактерій. Тому RecA є релевантним об'єктом для антиеволюційних препаратів.

Серед успішних прикладів пошуку інгібіторів RecA – відкриття полісульфатованих і полісульфованих нафтильних сполук, включаючи природний фенол (куркумін), сурамін, біс-АНС та барвник конго червоний [65, 66].

Сурамін пригнічує мікобактерійну RecA, знижуючи ймовірність виникнення стійкості у *M. smegmatis* та *M. tuberculosis*. Цікаво, що сурамін включений до списку основних ліків ВООЗ та використовується для лікування африканської сонної хвороби, спричиненої *Trypanosoma brucei*. Сурамін, ацетат цинку, біс-АНС та конго червоний блокують АТФ-азну активність RecA [66].

Куркумін пригнічує SOS-відповідь кишкової палички, спричинену левофлоксацином. Механізм дії куркуміну не з'ясований [65].

SOS-відповідь блокується фенольною сполукою пі-кумарової кислоти [67], яка *in vitro* пригнічує зв'язування RecA з одноланцюговою ДНК, гідроліз АТФ та копротеазну активність RecA *E. coli* та *Listeria monocytogenes*.

Флавоноїди, такі як геністеїн, даїдзеїн та байкалеїн є природними інгібіторами мутагенезу, опосередкованої SOS-відповіді [68, 69]. У *S. aureus* байкалеїн (5,6,7-тригідроксифлавонон), виділений з коренів *Scutellaria baicalensis* і *Scutellaria lateriflora*, пригнічує експресію генів recA, lexA та гена мутагенної ДНК-полімерази V [69].

Інгібітор RecA фталоціанінтетрасульфоновна кислота блокує індуковану антибіотиками активацію SOS-відповіді та посилює дію хінолонів, β-лактамів та аміноглікозидів щодо грамнегативних і грампозитивних бактерій, пригнічуючи мутагенез як *in vitro*, так і *in vivo* [62].

Серед сполук, що виявляють інгібіторну активність щодо RecA, є нуклеотидні аналоги [70]. Також досліджено невеликі органічні молекули-інгібітори, синтезовані на основі 2-аміно-4,6-діарилпіридину, 1,2,4-оксадіазолу, хіназолінону, бензімідазолу та діазепінону [71].

Ацетат цинку блокує SOS-відповідь, викликаний ципрофлоксацином, мітоміцином С, триметопримом та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у кишкової палички [72].



Повідомляється про застосування пептидів як анти-еволюційних препаратів. Білок RecX є одним із клітинних інгібіторів RecA. Він блокує взаємодію RecA з одноланцюговою ДНК. Синтезований пептид 4E1 має таку ж здатність, що і природний білок RecX, – розбирати філаменти, що утворюються RecA *in vitro* та *in vivo* [73]. Він повністю пригнічує активацію SOS-відповіді бактерій та розвиток стійкості до антибіотиків. Більше того, пептид блокує активність мутасоми, що призводить до скасування PolV-залежного мутагенезу навіть без виключення SOS-відповіді.

На жаль, всі ці сполуки на практиці поки не застосовуються. Білок Rad51 є еукаріотичним гомологом RecA. Rad51 подібний до RecA як біохімічно, так і структурно, що значно погіршує використання RecA як мішені для антиеволюційної терапії. LexA не має людських гомологів [74]. Штами з інактивованим LexA життєздатні та ефективно конкурують зі штамом дикого типу за відсутності стресу. Але пригнічення автопротеолізу LexA теж не є ідеальним варіантом, оскільки пригнічення автопротеолізу LexA не збільшує чутливість бактерій до антибіотиків такою мірою, як пригнічення активності RecA [75].

Новий поляризаційний флуоресцентний аналіз дозволив здійснити скринінг 1,8 мільйона сполук, в результаті якого виявили триазоловмісні трицикли, які специфічно пригнічують автопротеоліз LexA [75]. Інгібітори пригнічували мутагенез, індукований ципрофлоксацином. Подальші модифікації каркасу ядра з 1,2,3-триазолу були досліджені Jagamillo зі співавторами [76]. При скринінгу виявлено перспективну сполуку 5-аміно-1-(карбамоїлметил)-1H-1,2,3-триазол-4-карбоксамід, що блокує автопротеоліз LexA.

Для пригнічення SOS відповіді був застосований і принципово інший підхід. Було створено фаг M13mp18, надекспресуючий lexA [77]. Пригнічення SOS відповіді у кишкової палички за допомогою бактеріофага посилює знищення бактерій хінолонами на кілька порядків *in vitro* та значно збільшує виживання інфікованих мишей *in vivo*. Крім того, сконструйований бактеріофаг значно збільшує дію аміноглікозидів та β-лактамів.

Вперше описаний специфічний інгібітор активатора загальної відповіді на стрес RpoS фактора, який може стати ефективним протиеволюційним засобом [78]. Препарат деквалінію хлорид схвалений управлінням з контролю за продуктами та ліками США та Європейським агентством з лікарських засобів. Деквалінію хлорид використовується з кліндаміцином як місцевий бактеріостатичний засіб для лікування вагінальних інфекцій. Однак у результаті скринінгу вдалося показати, що він пригнічує індуковану ципрофлоксацином активацію RpoS фактора у кишкової палички.

Але, як докладно розбиралося вище, RpoS є активатором мутагенезу. І дійсно, мутагенез, викликаний ципрофлоксацином, знижується при застосуванні деквалінію хлориду. Більше того, при лікуванні ципрофлоксацином інфекції стегна у мишей у бактерійних клітинах активується стрес-індукований мутагенез, який знижується при введенні деквалінію хлориду спільно з антибіотиком. Таким чином, деквалінію хлорид є лікарським засобом, що уповільнює еволюцію бактерій навіть *in vivo*, і, як вважають автори, його можна використовувати для клінічних випробувань.

Наступними мішенями для антиеволюційних препаратів є транслейзійні полімерази. Однак загальні характеристики бактерійних і людських схильних до помилок полімераз створюють серйозну перешкоду для використання цього класу білків як мішеней антиеволюційної терапії.

Дуже перспективним кандидатом для антиеволюційної терапії є фактор Mfd, делеція якого не знижує пристосованість бактерій. Крім того, Mfd дуже консервативний серед патогенів. І нарешті, еукаріоти не мають гомолога Mfd, тому такий препарат не буде токсичним для організму людини [74].

За допомогою скринінгу *in vivo* ідентифікували 43 потенційні сполуки, що пригнічують Mfd. Серед цих речовин найбільш ефективною виявилася сполука, названа ARM-1. ARM-1 зв'язує Mfd і модулює його взаємодію з РНК-полімеразою. Пригнічення активності Mfd за допомогою ARM-1 затримує розвиток мутацій та набуття стійкості як у чистій культурі, так і під час інфекції *in vivo*. Ця сполука запобігає розвитку стійкості серед патогенів, що сильно різняться між собою, включаючи *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* і *S. enterica*. Автори вважають, що відкрита ними речовина може стати клінічно корисним антиеволюційним препаратом [79].

За допомогою антибіотика гризеліміцину у живих мікобактеріях пригнічується функція мутасом. Гризеліміцин порушує утворення комплексу між компонентом мутасоми ImuV і субодиницею ДНК полімерази, яка називається β-затискачем. Ці спостереження дозволяють припустити, що гризеліміцин може бути використаний як антиеволюційний антибіотик для лікування туберкульозу [58].

Антиеволюційна терапія може застосовуватись і проти грибів. Однак на даний момент цей напрямок розроблений вкрай слабо. Адаптація дріжджів до міді, описана вище, може бути ефективно пригнічена шляхом видалення гістонової ацетилтрансферази Rtt109, білка, для якого були описані хімічні інгібітори [80].

Антиеволюційні препарати можна призначати одночасно з антибіотиками під час лікування інфекцій, що

знижує можливість розвитку резистентності на початку лікування. Зокрема, при лікуванні інфекцій, спричинених кишковою паличкою, спільне застосування інгібіторів RecA і хінолонів або бета-лактамів знижує ефективну концентрацію останніх у кілька разів [81].

Фаги також вступають у гонку озброєнь з бактеріями та намагаються пригнітити механізм мінливості, що забезпечується CRISPR-Cas системою, виробляючи білки анти-CRISPR, що призводить до пригнічення росту та лізису бактерій [82]. Білки анти-CRISPR є групою інгібіторних білків, що виробляються бактеріофагами для боротьби з адаптивною системою захисту бактерій CRISPR-Cas [82]. Фаги, що несуть анти-CRISPR, можуть використовуватися як антибактерійні сполуки в коктейлях, уповільнюючи швидкість утворення резистентних до фагів бактерій.

Підсумовуючи, можна зробити висновок, що хоча неможливо знайти якийсь універсальний метод пригнічення одночасно всіх шляхів еволюційної адаптації, створення блокаторів, що мають широкий спектр мішеней, можливий і необхідний для того, щоб надалі перемагати в гонці озброєнь між мікроорганізмами та людиною.

Передбачається також, що препарати, які уповільнюють еволюцію мікроорганізмів, можуть уможливити лікування інфекцій без антибіотиків. Уповільнення еволюції патогена може дозволити імунній відповіді випередити патоген і забезпечити знищення інфекції без шкоди для природного мікріобіому людини [7].

### Висновки

Медикаментозна стійкість у мікроорганізмів розвивається внаслідок еволюційного процесу. Проте в основі наших уявлень про еволюцію лежить догма, за якою мутації виникають випадково. Вони не локалізовані ні в просторі геному, ні у часі і немає спеціалізованих механізмів мутаційної мінливості та інших генетичних змін. Якщо це положення правильне, неможливо протистояти розвитку стійкості до лікарських препаратів.

Однак незламна протягом тривалого часу догма про випадковість мутагенезу починає піддаватися корінному перегляду. Відкрито CRISPR адаптивний механізм формування стійкості до бактеріофагів та інших мобільних елементів, який по суті є прикладом ламарксівського успадкування [26]. CRISPR-відповідь є, по-перше, генетично закодованою програмою мінливості. По-друге, CRISPR-відповідь індукує зіткнення з чужорідною генетичною інформацією, тобто із селективним фактором. По-третє, саме селективний фактор дає інформацію для генетичних змін, які адаптивні та успадковуються клітиною.

Революційні зміни у поглядах на природу мінливості внесло вивчення адаптивних мутацій, що виникають

у стресових ситуаціях. Було показано наявність молекулярних механізмів мутагенезу, які принципово не відрізняються від механізмів реплікації, транскрипції та репарації. Але існування молекулярних механізмів генетичної мінливості передбачає, що їхня просторова (як їхня діяльність буде розподілена в геномі) і часова (коли вони діятимуть) активності знаходяться під контролем клітини та зовнішнього середовища. Ці припущення були експериментально доведені спочатку при вивченні мікроорганізмів з різними ауксотрофними мутаціями, а потім підтверджені й доповнені при вивченні розвитку стійкості до лікарських препаратів.

Натепер можна уявити наступний сценарій спрямованого селективним фактором утворення адаптивних мутацій. Селективні фактори сприймаються рецепторним апаратом клітини, активуючи двокомпонентні сигнальні системи, або сенсорами всередині клітин, які контролюють експресію генів, що кодують формуючі мутасомні комплекси білки, або регулюють білки пост-трансляційно. Активація цих біохімічних механізмів мінливості значно збільшує швидкість мутагенезу та перебудов геному.

З другого боку, сигнальні системи та внутрішньоклітинні рецептори під дією селективного фактора можуть змінювати режим транскрипції генів. Зміни в режимі транскрипції можуть створювати перешкоди для просування РНК-полімеразного комплексу, його зупинку та умови для залучення механізмів мутагенезу. Це локалізує мутагенез у просторі геному тими районами, які мають особливе навантаження під час стресу, викликаного селективним фактором. Збільшення швидкості мутагенезу та його локалізація у певному патерні геномних локусів, які функціонують в особливому режимі в умовах стресу, значно збільшує ймовірність виникнення адаптивних мутацій.

Якщо мутагенез і еволюція визнаються активними і регульованими процесами, які мають свої молекулярні механізми і закономірності, їх можна пізнавати й можна вчитися керувати ними. Фундаментальні зміни у поглядах на природу мінливості дозволяють шукати засоби антиеволюційної терапії.

Активацію регуляторних програм стресу та мутасомних комплексів можна блокувати за допомогою хімічних речовин різної природи, що уповільнить еволюційний процес формування стійкості. Зараз ведеться інтенсивний пошук антиеволюційних інгібіторів і хоча успіхи поки що скромні, однак, виявлені перші речовини, які, як вважають вчені, що їх розробили, можна застосовувати для клінічних випробувань [57, 78, 79]. Саме антиеволюційна терапія дає принципову можливість перемогти у тій гонці озброєнь, яку людство почало програвати мікроорганізмам.

### Література

- World Health Organization (2022). *Antimicrobial resistance*. Geneva, Switzerland: WHO. <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
- Hoffman, S. J., Caleo, G. M., Daulaire, N., (2015). Strategies for achieving global collective action on antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ*, 93(12). 867–876. <https://doi:10.2471/BLT.15.153171>
- Jasovský D, Littmann J, Zorzet A, Cars O (2016). Antimicrobial resistance-a threat to the world's sustainable development. *Ups. J. Med. Sci.* 121, 159–164. <https://doi:10.1080/03009734.2016.1195900>
- O'Neill J, Davies S, Rex J, White LJ, Murray R. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. London: Wellcome Trust and UK Government.
- Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019. A systematic analysis. *Lancet*, 399. 629–655. [https://doi:10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Govindaraj Vaithinathan, A., Vanitha, A. (2018). WHO global priority pathogens list on antibiotic resistance: An urgent need for action to integrate One Health data. *Perspect. Public Health*. 138, 87–88. <https://doi:10.1177/1757913917743881>
- Pribis, J. P., Zhai, Y., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. (2022). Stress-Induced Mutagenesis, Gambler Cells, and Stealth Targeting Antibiotic-Induced Evolution. *MBio*. 13(3), e0107422. <https://doi:10.1128/mbio.01074-22>.
- Almeida Da Silva, P.E., Palomino, J.C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*. 66(7), 1417–1430. <https://doi:10.1093/jac/dkr173>.
- Mehrad, B., Clark, N.M., Zhanel, G.G., Lynch, J.P., III, (2015). Antimicrobial resistance in hospital-acquired Gram-negative bacterial infections. *Chest*. 147, 1413–1421. <https://doi.org/10.1378/chest.14-2171>.
- Papon, N., Bougnoux, M.-E., d'Enfert. C. (2020). Tracing the Origin of Invasive Fungal Infections. *Trends Microbiol*, 28, 240–242. <https://doi:10.1016/j.tim.2020.01.007>
- Shor, E., Perlin, D.S. (2015). Coping with Stress and the Emergence of Multidrug Resistance in Fungi. *PLoS Pathog*. 11, e1004668. <https://doi:10.1371/journal.ppat.1004668>.
- Lewis, J.S., 2nd., Wiederhold, N.P., Wickes, B.L., Patterson, T.F., Jorgensen, J.H. (2013). Rapid emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and microbiologic failure. *Antimicrob. Agents Chemother*, 57. 4559–4561. <https://doi:10.1128/AAC.01144-13>
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264, 375–382. <https://doi:10.1126/science.8153624>
- Baker, S.J., Payne, D.J., Rappuoli, R., De Gregorio E. (2018). Technologies to address antimicrobial resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115, 12887–12895. <https://doi:10.1073/pnas.1717160115>
- Zhang, Q., Lambert, G., Liao, D., Kim, H., Robin, K., Tung, C.K., Pourmand, N., Austin, R.H. (2011). Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments *Science*, 333, 1764–1767. DOI:10.1126/science.1208747
- Danis-Wlodarczyk, K.M., Wozniak, D.J., Abedon, S.T. (2021). Treating Bacterial Infections with Bacteriophage-Based Enzybiotics: In Vitro, In Vivo and Clinical Application. *Antibiotics (Basel)*, 10(12), 1497. <https://doi:10.3390/antibiotics10121497>.
- Mani, I. (2023). Phage and phage cocktails formulations. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 200. 159–169. <https://doi:10.1016/bs.pmbts.2023.04.007>.
- Duc, H.M., Zhang, Y., Hoang, S.M., Masuda, Y., Honjoh, K.I., Miyamoto, T. (2023). Phage Cocktail and Various Antibacterial Agents in Combination to Prevent the Emergence of Phage Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 12(6). 1077. <https://doi:10.3390/antibiotics12061077>.
- Diallo. K., Dublanchet, A. (2022). Benefits of combined phage antibiotic therapy for the control of antibiotic-resistant bacteria: a literature review. *Antibiotics (Basel)*. 11(7). 839. <https://doi:10.3390/antibiotics11070839>
- Mayr, E. (1982). The growth of biological thought: diversity, evolution, and inheritance. Belknap Press, Cambridge, MA
- Luria, S.E., Delbruck, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28. 491–511. <https://doi:10.1093/genetics/28.6.491>
- Lederberg, J., Lederberg, E.M. (1952). Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol*. 63. 399–406. <https://doi:10.1128/jb.63.3.399-406.1952>
- Rando, O.J., Verstrepen, K.J. (2007). Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. *Cell*. 128. 655–668. <https://doi:10.1016/j.cell.2007.01.023>
- Karginov, F.V., Hannon, G.J. (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol. Cell*. 37. 7–19. <https://doi:10.1016/j.molcel.2009.12.033>
- Hampton H.G., Watson, B.N.J., P.C. Fineran, (2020). Affiliations expand The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*. 577 (7790). 327–336. <https://doi:10.1038/s41586-019-1894-8>.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I. (2009). Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? *Biol. Direct*. 4. 42–56. <https://doi:10.1186/1745-6150-4-42>
- Cairns, J., Overbaugh, J., Miller, S. (1988). The origin of mutants. *Nature*. 335. 142–145. <https://doi:10.1038/335142a0>
- Cairns, J., Foster, P. L. (1991). Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics*. 128. 695–701. <https://doi:10.1093/genetics/128.4.695>
- Deaconescu, A.M (2021). Mfd - at the crossroads of bacterial DNA repair, transcriptional regulation and molecular evolvability. *Transcription*. 12(4). 156–170. <https://doi:10.1080/21541264.2021.1982628>.
- Masłowska, K.H., Makiela-Dzubska, K., Fijałkowska, I.J. (2019). The SOS System: A Complex and Tightly Regulated Response to DNA Damage. *Environ Mol Mutagen*. 60(4). 368–384. <https://doi:10.1002/em.22267>.
- Roca, A.I., Cox, M.M. (1997). RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol*. 56. 129–223. [https://doi:10.1016/s0079-6603\(08\)61005-3](https://doi:10.1016/s0079-6603(08)61005-3)
- Godoy, V.G., Jarosz, D.F., Simon, S.M., Abyzov, A., Ilyin, V., Walker, G.C. (2007). UmuD and RecA directly modulate the mutagenic potential of the Y family DNA polymerase DinB. *Mol. Cell*. 28. 1058–1128. <https://doi:10.1016/j.molcel.2007.10.025>
- Goodman, M.F., McDonald, J.P., Jaszczur, M.M., Woodgate, R. (2016). Insights into the complex levels of regulation imposed on *Escherichia coli* DNA polymerase V. *DNA Repair*. 44. 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep>.
- Erdem, A.L., Jaszczur, M., Bertram, J.G., Woodgate, R., Cox, M.M., Goodman, M.F. (2014). DNA polymerase V activity is autoregulated by a novel intrinsic DNA-dependent ATPase. *Elife*. 3. e02384. <https://doi.org/10.7554/eLife>.
- Robinson, A., McDonald, J.P., Caldas, V.E.A., Patel, M., Wood, E.A., van Oijen, A.M. (2015). Regulation of Mutagenic DNA Polymerase V Activation in Space and Time. *PLOS Genetics* 11: e1005482. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen>.
- Torkelson, J., Harris, R.S., Lombardo, M.J., Nagendran, J., Thulin, C., Rosenberg, S. M. (1997). Genome-wide hypermutation in

a subpopulation of stationary-phase cells underlies recombination-dependent adaptive mutation. *EMBO J.* 16. 3303–3311. [https://doi: 10.1093/emboj/16.11.3303](https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3303)

37. Sung, H.-M., Yasbin, R.E. (2002). Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184. 5641–5653. [https://doi:10.1128/JB.184.20.5641-5653.2002](https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5641-5653.2002)

38. Sung, H.M., Yeaman, G., Ross, C.A., Yasbin, R.E. (2003). Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185. 2153–2160. [https://doi:10.1128/JB.185.7.2153-2160.2003](https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2153-2160.2003)

39. Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C., Hecker, M. (2002). *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 184. 2500–2520. [https://doi:10.1128/JB.184.9.2500-2520.2002](https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2500-2520.2002)

40. Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Ross, C.A., Martin, H., Ona, K., Yasbin, R.E., Robleto, E. (2010). Transcription Associated Mutation in *Bacillus subtilis* Cells under Stress. *J. Bacteriol.* 192. 3321–3328. [https://doi:10.1128/JB.00354-10](https://doi.org/10.1128/JB.00354-10)

41. Ross, C., Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Sung, H.M., Yasbin, R.E., Robleto, E. (2006). Novel role of *mfd*: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188. 7512–7520. [https://doi:10.1128/JB.00980-06](https://doi.org/10.1128/JB.00980-06)

42. Le, T.T., Yang, Y., Tan, C., Suhanovsky, M.M., Fulbright, R.M., Wang, M.D. (2018). *Mfd* dynamically regulates transcription via a release and catch-up mechanism. *Cell.* 172. 344–357 e15. [https://doi:10.1016/j.cell.2018.06.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.002)

43. Ermi, T., Vallin, C., García, A., Bravo, M., Cordero, I., Martin, H., Pedraza-Reyes, M., Robleto, E. (2021). Non-B DNA-forming Motifs promote *Mfd*-Dependent stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *Microorganisms*. 9(6). 1284. [https://doi: 10.3390/microorganisms9061284](https://doi.org/10.3390/microorganisms9061284)

44. Carvajal-García, J., Samadpour, A.N., Hernandez Viera, A.J., Merrih, H. (2023). Oxidative stress drives mutagenesis through transcription-coupled repair in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 120. e2300761120. [https://doi: 10.1073/pnas.2300761120](https://doi.org/10.1073/pnas.2300761120)

45. Million-Weaver, S., Samadpour, A.N., Moreno-Habel, D.A., Nugent, P., Brittnacher, M.J., et al. (2015). An underlying mechanism for the increased mutagenesis of lagging-strand genes in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112. 1096–1105. [https://doi: 10.1073/pnas.1416651112](https://doi.org/10.1073/pnas.1416651112)

46. Paul, S., Million-Weaver, S., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Merrih, H. (2013). Accelerated gene evolution through replication-transcription conflicts. *Nature.* 495. 512–515. [https://doi: 10.1038/nature11989](https://doi.org/10.1038/nature11989)

47. Gomez-Marroquin, M, Martin, H.A., Pepper, A., Girard, M.E., Kidman, A.A., Vallin, C., Yasbin, R.E., Pedraza-Reyes, M., Robleto, E.A. (2016). Stationary-Phase mutagenesis in stressed *Bacillus subtilis* cells operates by *Mfd*-Dependent mutagenic pathways. *Genes (Basel).* 7(7). 33. [https://doi: 10.3390/genes7070033](https://doi.org/10.3390/genes7070033)

48. Steele, D.F., Jinks-Robertson, S. (1992). An examination of adaptive reversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 132. 9–21. [https://doi: 10.1093/genetics/132.1.9](https://doi.org/10.1093/genetics/132.1.9)

49. Hull, R.M., Cruz, C., Jack, C.V., Houseley, J. (2017). Environmental change drives accelerated adaptation through stimulated copy number variation. *PLoS Biol.* 15. e2001333. [https://doi: 10.1371/journal.pbio.2001333](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001333)

50. Todd, R.T., Selmecki, A. (2020). Expandable and reversible copy number amplification drives rapid adaptation to antifungal drugs. *eLife.* 9. e58349. [https://doi:10.7554/eLife.58349](https://doi.org/10.7554/eLife.58349)

51. Liu, H., Zhang, J. (2019). Yeast spontaneous mutation rate and spectrum vary with environment. *Curr Biol.* 29(10). 1584–1591. [https://doi: 10.1016/j.cub.2019.03.05](https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.05)

52. Cirz, R.T., Chin, J.K., Andes, D.R., Crecy-Lagard, V.D., Craig, W.A., Romesberg F. E. 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol.* 3. e176. [https://doi: 10.1371/journal.pbio.0030176](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030176)

53. Zhai, Y, Minnick P.J, Pribis JP, Garcia-Villada L, Hastings PJ, Herman C, Rosenberg SM. (2023). ppGpp and RNA-polymerase backtracking guide antibiotic-induced mutable gambler cells. *Mol Cell.* 83(8).1298-1310.e4. [https://doi: 10.1016/j.molcel.2023.03.003](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.03.003)

54. Weaver, J.W., Proshkin, S., Duan, W., Epshtein, V., Gowder, M., Bharati, B.K., Afanaseva, E., Mironov, A., Serganov, A., Nudler, E. (2023). Control of Transcription Elongation and DNA Repair by Alarmone ppGpp. *Nature Struct Mol Biol.* 30(5). 600–607. [https://doi: 10.1038/s41594-023-00948-2](https://doi.org/10.1038/s41594-023-00948-2)

55. Song, L.Y., Goff, M., Davidian, C., Mao, Z., London, M., Lam, K., Yung, M., Miller, J.H. (2016). Mutational consequences of ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60. 6165–6172. [https://doi: 10.1128/AAC.01415-16](https://doi.org/10.1128/AAC.01415-16)

56. Pomerantz, R.T., Goodman, M.F., O'Donnell, M.E. (2013). DNA polymerases are error-prone at RecA-mediated recombination intermediates. *Cell Cycle* 12. 2558–2563. [https://doi: 10.4161/cc.25691](https://doi.org/10.4161/cc.25691)

57. Boshoff, H. I., Reed, M. B., Mizrahi, V. (2003). DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* 113. 183–193. [https://doi: 10.1016/S0092-8674\(03\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00270-8)

58. Gessner, S., Martin, Z.A., Reiche, M.A., Santos, J.A., Dinkele, R., Ramudzuli, A., Dhar, N., Warner, D.F. (2023). Investigating the composition and recruitment of the mycobacterial ImuA'-ImuB-DnaE2 mutasome. *Elife.* 12. e75628. [https://doi: 10.7554/eLife.75628](https://doi.org/10.7554/eLife.75628)

59. Adefisayo, O.O., Dupuy, P., Nautiyal, A., Bean, J.M., Glickman Michael, S. (2021). Division of labor between SOS and PafBC in mycobacterial DNA repair and mutagenesis. *Nucleic Acids Research.* 49(22). 12805–12819 [https://doi: 10.1093/nar/gkab1169](https://doi.org/10.1093/nar/gkab1169)

60. Dupuy, P., Ghosh, S., Adefisayo, O., Buglino, J., Shuman, S., Glickman, M.S.. (2022). Distinctive roles of translesion polymerases *DINB1* and *dnae2* in diversification of the mycobacterial genome through substitution and frameshift mutagenesis. *Nature Communications.* 13. 4493. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32022-8>

61. Ragheb, M.N., Thomason, M.K., Hsu, C., Nugent, P., Gage, J., Samadpour, A.N., Kariisa, A., Merrih, C.N., Miller, S.I., Sherman, D.R., Merrih, H. (2019). Inhibiting the evolution of antibiotic resistance. *Molecular Cell.* 73. 157–165. [https://doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.015](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.015)

62. Alam, M.K., Alhazmi, A., DeCoteau, J.F., Luo, Y., Geyer, C.R. (2016). RecA inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. *Cell Chem. Biol.* 23. 381–391. [https://doi: 10.1016/j.chembiol.2016.02.010](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.02.010)

63. Erill, I., Campoy, S., Barbé, J. (2007). Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev.* 31. 637–656. [https://doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00082](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00082)

64. Mo, C.Y., Manning, S.A., Roggiani, M., Culyba, M.J., Samuels, A.N., Sniegowski, P.D., Goulian, M., Kohli, R.M. (2016). Systematically Altering Bacterial SOS Activity under Stress Reveals Therapeutic Strategies for Potentiating Antibiotics. *MSphere.* (4). e00163-16. [https://doi: 10.1128/mSphere.00163-16](https://doi.org/10.1128/mSphere.00163-16)

65. Bellio, P., Brisdelli, F., Perilli, M., Sabatini, A., Bottoni, C., Segatore, B. (2014). Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in *Escherichia coli*. *Phytomedicine.* 21(4). 430–434. [https://doi:10.1016/j.phymed.2013.10.011](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.10.011)

66. Wigle, T.J., Singleton, S.F. (2007). Directed molecular screening for RecA ATPase inhibitors. *Bioorgan Med Chem Lett.* 17(12). 3249–3253. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.04.013>.
67. Ojha, D., Patil, K.N. (2019). p-coumaric acid inhibits the *Listeria monocytogenes* RecA protein functions and SOS response: an antimicrobial target. *Biochem Biophys Res Commun.* 517(4). 655–661. [doi:10.1016/j.bbrc.2019.07.093](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.093).
68. Yang, Y., Fix, D. (2006). Genetic analysis of the anti-mutagenic effect of genistein in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 600. 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.024>.
69. Peng, Q., Zhou, S., Yao, F., Hou, B., Huang, Y., Hua, D. (2011). Baicalein suppresses the SOS response system of *Staphylococcus Aureus* induced by ciprofloxacin. *Cell Physiol Biochem.* 28(5). 1045–1050. <https://doi.org/10.1159/000335791>.
70. Lee, A.M., Ross, C.T., Zeng, B.B., Singleton, S.F. (2005). A molecular target for suppression of the evolution of antibiotic resistance: inhibition of the *Escherichia coli* RecA protein by N6-(1-naphthyl)-ADP. *J Med Chem.* 48(17). 5408–5411. <https://doi.org/10.1021/jm050113z>.
71. Sexton, J.Z., Wigle, T.J., He, Q., Hughes, M.A., Smith, G.R., Singleton, S.F. (2010). Novel inhibitors of *E. coli* RecA ATPase activity. *Curr Chem Genomics.* 4. 34–42. <https://doi.org/10.2174/1875397301004010034>.
72. Bunnell, B.E., Escobar, J.F., Bair, K.L., Sutton, M.D., Crane, J.K. (2017). Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli*. *PLoS ONE.* 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178303>.
73. Yakimov, A., Pobegalov, G., Bakhlanova, I., Khodorkovskii, M., Petukhov, M., Baitin, D. (2017). Blocking the RecA activity and SOS-response in bacteria with a short  $\alpha$ -helical peptide. *Nucl Acids Res.* 45(16). 9788–9796. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx687>.
74. Merrikh, H., Kohli, R.M. (2020). Targeting evolution to inhibit antibiotic resistance. *FEBS J.* 287. 4341–4353. <https://doi.org/10.1111/febs.15370>.
75. Mo, C.Y., Culyba, M.J., Selwood, T., Kubiak, J.M., Hostetler, Z.M., Jurewicz, A. J., Kohli, R.M. (2018). Inhibitors of LexA autoproteolysis and the bacterial SOS response discovered by an academic–industry partnership. *ACS Infect. Dis.* 4. 349–359. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.7b00122>.
76. Jaramillo, A.V.C., Cory, M.B., Li, A., Kohli, R.M., Wuest, W.M. (2022). Exploration of inhibitors of the bacterial LexA repressor-protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 65. 128702. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128702>.
77. Lu, T.K., Collins, J.J. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4629–4634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>.
78. Zhai, Y., Pribis, S.W., Dooling, J.P., Garcia-Villada, L., Minnick, P.J., Xia, J., Liu, J., ..., Rosenberg, S.M. (2023). Drugging evolution of antibiotic resistance at a regulatory network hub. *Sci Adv.* 9(25), eadg0188. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg0188>.
79. Johnson, A. E., Bracey H., Viera, A.J.H., Carvajal-Garcia, J., Simsek, E.N., Kim, K., Merrikh, H. (2022). A small molecule that inhibits the evolution of antibiotic resistance. *BioRxiv [Preprint]* <https://doi.org/10.1101/2022.09.26.509600>.
80. Lopes da Rosa, J., Bajaj, V., Spoonamore, J., Kaufman, P.D. (2013). A small molecule inhibitor of fungal histone acetyltransferase Rtt109. *Bioorg Med Chem Lett.*; 23(10), 2853–2859. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.112>.
81. Recacha, E., Machuca, J., de Alba, P.D., Ramos-Güelfo, M., Docobo-Pérez, F., Rodríguez-Beltrán, J. (2017). Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *MBio.* 8(5). e00971–17. <https://doi.org/10.1128/mbio.00971-17>.
82. Pinilla-Redondo, R., Shehreen, S., Marino, N.D., Fagerlund, R.D., Brown, C.M., Sørensen, S.J., Fineran, P.C., Bondy-Denomy, J. (2020). Discovery of multiple anti-CRISPRs highlights anti-defense gene clustering in mobile genetic elements. *Nat. Commun.* 11, 5652. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19415-3>.

## ANTI-EVOLUTION THERAPY: A NEW APPROACH TO THE TREATMENT OF INFECTIOUS DISEASES

V. V. Minukhin, T. Y. Kolotova, N. I. Skliar

I. I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**SUMMARY.** Antibiotics revolutionized medicine. Countless people have been saved through their use. However the development of antimicrobial resistance has created a serious crisis in medicine. Antimicrobial resistance is developing rapidly to all new therapeutic agents. This is a consequence of genetic variability of microorganisms, including mutagenesis. According to the synthetic theory of evolution, genetic rearrangements and mutations occur randomly, they are not localized either in time or in genome space, and there are no molecular mechanisms of variability. If this assumption is correct, then it is impossible to counter the development of antimicrobial resistance.

However, recently, the views on the nature of variability that have been dominant for a long period have undergone fundamental changes. The discovery of the CRISPR system of adaptive defense of prokaryotes against bacteriophages showed the fundamental possibility of localized genetic rearrangements directed by a selective factor.

A revolution in views on the nature of variability was made by the discovery of adaptive or stress-induced mutagenesis. It was discovered that under stress conditions, microorganisms activate molecular mechanisms of variability, the action of which can be localized in the region of the transcribed genes. Numerous experimental data have confirmed that antibiotics, causing stress, induce adaptive mutagenesis. Consequently, drugs that suppress regulatory pathways and molecular mechanisms of mutagenesis can prevent the development of antibiotic resistance. It is this principle that underlies the new direction in medicine of anti-evolution therapy.

**Key words:** antimicrobial resistance; antibiotics; bacteriophages; CRISPR adaptive prokaryotic defense system; adaptive mutagenesis; SOS response; translesional polymerases; Mfd factor; anti-evolution drugs.

**Відомості про авторів:**

Мінухін Валерій Володимирович – д. мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: present.mikro1922@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9682-9686>

Колотова Тетяна Юріївна – старша наукова співробітниця лабораторії протимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: taniatatanova60@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7599-3105>.

Скляр Надія Іванівна – канд. мед. наук, старша наукова співробітниця, заступник директора з наукової роботи Державної Установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: sklyarimi@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

**Information about the authors:**

Minukhin V. V. – MD, Professor, Director of I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: present.mikro1922@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9682-9686>

Kolotova T. Yu. – Senior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Agents of I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: taniatatanova60@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7599-3105>.

Skliar N. I. – PhD, Senior Researcher, Deputy Director for Scientific Work of I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: sklyarimi@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Конфлікт інтересів: немає.

Authors have no conflict of interest to declare.

Отримано 12.10.2023 р.