

С. А. Усанов, Г.В. Сергеев, А.В. Василевская, А.С. Бабенко, А. А., Гилеп  
Институт биоорганической химии Национальной Академии Наук Беларуси

Бурное развитие методов молекулярной биологии и секвенирования ДНК, коренным образом изменили отношение к методам диагностики. Если раньше, основным объектом определения для диагностических систем являлись продукты экспрессии генов или продукты, катализируемых ферментами, реакций, то в последнее время основным объектом диагностики является РНК и ДНК, а основным методическим подходом для реализации этих подходов является полимеразная цепная реакция (ПЦР), что позволяет делать заключение при наличии лишь отдельных молекул РНК или ДНК. Основные методы диагностики с использованием ПЦР условно могут быть разделены на три группы:

1. методы определения чужеродной ДНК;
2. методы определения нарушений в собственной ДНК;
3. методы определения уровня экспрессии генов на основе обратной транскрипции РНК с последующей полимеразной реакцией.

Основным компонентом полимеразной цепной реакции является фермент – термостабильная ДНК полимераз. В институте биоорганической химии НАН Беларуси в лаборатории белковой инженерии разработана технология получения рекомбинантных *Tac* и *Pfu* термостабильных ДНК-полимераз, которая состоит в гетерологической экспрессии ферментов в бактериях *E. coli*, с последующей аффинной очисткой рекомбинантного белка.

Определение чужеродной ДНК имеет первостепенное значение при ранней диагностике инфекционных заболеваний. С целью ранней диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота, нами разработана эффективная тест-система, которая не только позволяет обнаружить присутствие возбудителя данного заболевания - *Mycobacterium tuberculosis*, но, и позволяет идентифицировать комплекс *Mycobacterium tuberculosis* с высокой специфичностью и дифференцировать его от других представителей микобактерий.

Значительный практический интерес представляет определение нарушений в собственной ДНК с целью ранней диагностики врожденных наследственных заболеваний, полиморфизма важнейших ферментов, предсказания возможности развития ряда серьезных заболеваний. Ферменты семейства цитохрома P450 (CYP2D6, CYP2C9 и CYP2C19) принимают участие в метаболизме ~40% применяемых лекарственных средств, а также оказывают влияние на их фармакокинетику и фармакодинамику. Наличие мутантных аллельных вариантов данных генов сопровождается синтезом ферментов с измененной ферментативной активностью, что, в конечном итоге, детерминирует метаболизм, определяющий индивидуальные и этнические различия.

С учетом полиморфной экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма лекарств, популяцию человека можно разделить на две группы: «медленно» и «быстро» метаболизирующих некоторые биологически активные вещества. При этом скорость метаболизма у представителей разных групп может отличаться в 10–100 раз. Соответственно в ответ на прием лекарственных препаратов в обычных дозах возможно развитие побочных реакций, токсического действия либо отсутствие терапевтического эффекта. Таким образом, выявление основных полиморфных вариантов систем метаболизма и трансмембранного транспорта лекарственных соединений позволяет определить индивидуальную чувствительность пациентов, а также оценить эффективность терапии. С этой целью, нами разработаны методы генотипирования гена фермента CYP2D6 с целью определения полиморфизма данного фермента (выявление CYP2D6\*4, неактивного CYP2D6 полиморфа, обусловленное нарушением

сплайсинга фермента), позволяющие идентифицировать нарушения в кодируемой области гена и предсказывать метаболизм комплекса лекарственных препаратов, используемых в медицине. Разработан метод генотипирования гена фермента CYP2C9 для определения полиморфизма (CYP2C9\*2) данного фермента, обусловленного заменой одного нуклеотида в кодирующей области гена (3-й экзон), влекущего за собой изменение скорости метаболизма и биотрансформации лекарственных средств и ксенобиотиков. Проведены работы по клонированию кДНК, кодирующих CYP2D6, CYP2C19 и CYP2C9 человека, сконструированы экспрессионные плазмиды для гетерологической экспрессии белков в *E. coli* и получены высокоочищенные ферментные препараты, которые используются для определения субстратной специфичности и каталитических свойств CYP2D6 и CYP2C19 человека, а также для определения метаболизма лекарственных веществ, используемых в практике спортивной медицины.

Наконец, методы определения уровня экспрессии генов на основе обратной транскрипции РНК с последующей полимеразной реакцией, позволяют предсказать вероятность возникновения или развития заболевания. С этой целью, нами разработан метод определения уровня экспрессии онкогена ERBB2, относящегося к группе генов, кодирующих рецепторы эпидермального фактора роста. Повышенный уровень экспрессии этого гена сочетается с развитием опухоли молочной железы с высоким метастатическим потенциалом.

Таким образом, использование новых инновационных подходов, включающих методы молекулярной биологии и генетической инженерии, позволяет коренным образом изменить предсказательную ценность диагностических методов и существенно расширить диапазон их применения.