

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЕНОМА У СПОРТСМЕНОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА

*Мельнов С.Б.*<sup>1</sup>, д-р биол. наук, профессор,  
*Суворова И.М.*<sup>2</sup>,  
*Снытков Е.В.*<sup>1</sup>,  
*Коляденко И.А.*<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова БГУ,  
Республика Беларусь,

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет физической культуры

Нами изучена распространенность полиморфизма гена PPAR $\alpha$  L162V у спортсменов циклических и ациклических видов спорта. Показано, что в распределении частот аллелей полиморфизма L162V гена PPAR $\alpha$  наблюдаются статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ), что может быть использовано при прогнозировании успешности у начинающих спортсменов.

Определение генетической детерминированности проявления определенных качеств человека играет важную роль во многих сферах профессиональной подготовки специалистов (спортсмены, спасатели, пожарные, космонавты, сотрудники специальных подразделений Министерства обороны, Министерства внутренних дел, Федеральной службы безопасности и других ведомств) [1].

Наиболее ярко это проявляется в спорте, и именно поэтому оценка врожденных генетических особенностей, определяющих формирование, развитие и проявление физических качеств, целесообразно изучать у спортсменов [2]. Именно у них, в силу специфических особенностей энергетического обмена в организме при выполнении различных по интенсивности и длительности физических нагрузок, можно с большой долей вероятности выявить генетические детерминанты, регулирующие этот процесс. В последнее десятилетие в связи с расшифровкой структуры генома человека появилась возможность определения генетических маркеров, ассоциированных с развитием и проявлением физических качеств, а также с биохимическими, антропометрическими и физиологическими показателями, значимыми в условиях спортивной деятельности. Генетические маркеры физической работоспособности, выявляемые с помощью молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК, представляют собой варианты генов, обуславливающие индивидуальные различия в развитии и проявлении фенотипических признаков.

Главным преимуществом молекулярно-генетического метода выявления наследственной предрасположенности человека к двигательной деятельности является высокая информативность при оценке потенциала развития физических качеств и возможность осуществления ранней диагностики. К отличительным свойствам такой диагностики также следует отнести возможность определения наследственной предрасположенности к развитию профессиональных патологий – факторов, лимитирующих физическую работоспособность человека и ухудшающих качество его жизни.

Таким образом, внедрение молекулярно-генетических методов в практику профессионального отбора может существенно повысить прогностические возможности, улучшить профессиональную ориентацию в разных сферах деятельности человека и сохранить его здоровье.

Ген PPAR $\alpha$  находится на длинном плече 22-й хромосомы и кодирует белок рецептора, активируемый пероксисомными пролифераторами. Является ядерным рецептором, функционирующим в качестве фактора транскрипции. Продукт данного гена играет существенную роль в регуляции обмена веществ у человека [3]. Изучаемая нами изоформа экспрессируется преимущественно в печени, почках, сердце, мышцах, жировой ткани.

Ген PPAR $\alpha$  кодирует белок, имеющий свойство специфически связываться с PPAR-чувствительными элементами промоторов генов жирового и углеводного метаболизма и регулировать их транскрипцию. Замена нуклеотида гуанин (G) на цитозин (C) в положении 2528 (Rs4253778) ассоциируется со снижением экспрессии гена, что приводит к нарушению регуляции липидного и углеводного обменов. То же происходит при замене нуклеотида G на C в гене PPAR $\alpha$  и приводит к переключению одного метаболизма на другой; у носителей двух копий нуклеотида G (генотип GG) превалирует аэробный, а у носителей аллеля C (генотипы GC или CC) – анаэробный метаболизм [4]. В ряде исследований это положение подтвердилось ассоциацией C аллеля с сахарным диа-

бетом 2 типа и атеросклерозом. Вариацию гена PPARA можно причислить к одному из важнейших генетических маркеров предрасположенности к физической деятельности человека.

Исследования в области фитнеса показали, что наилучших результатов в снижении лишнего веса добились индивиды с генотипом GG по PPARa по сравнению с носителями генотипа GC. С другой стороны, носители генотипа GC чаще, чем носители генотипа GG, обладали гиперстеническим телосложением и показывали более выраженные результаты в приросте силы на примере таких упражнений, как жим штанги от груди, тяга штанги и приседание со штангой. У носителей генотипа GG было отмечено повышенное содержание медленных мышечных волокон (предрасположенность к видам спорта на выносливость), а у носителей генотипа CC их содержание понижено (предрасположенность к скоростно-силовым видам спорта) [5].

Таким образом, вариации гена PPARA можно причислить к одному из генетических маркеров предрасположенности к определенному виду спортивной деятельности человека.

Цель настоящей работы – оценить роль однонуклеотидного полиморфизма L162V гена PPARA в успешности спортсменов циклических и ациклических видов спорта.

Объектом исследования послужил ДНК-содержащий материал (сухая кровь на целлюлозном носителе) спортсменов высокой квалификации (кандидаты в мастера спорта, мастера спорта, мастера спорта международного класса, заслуженные мастера спорта): 42 спортсмена (мужчины) циклических видов спорта и 18 спортсменов (мужчины) ациклических видов спорта. Сбор биологического материала проводился по методу «сухой капли». Все испытуемые были проинформированы о целях и условиях исследований.

Выделение ДНК проводили методом водно-метанольной экстракции.

Последовательность выделения по методу водно-метанольной экстракции:

- 1) в стерильных условиях с помощью пинчера (диаметр 3 мм) вырезали диск (сухая кровь на целлюлозном носителе) из расчета один диск на пробирку-эппендорф (объем 1,5 мл);
- 2) в пробирку добавляли 130 мкл метанола, инкубировали при температуре +35 °C в течение 20 минут при постоянном встряхивании (400 об/мин);
- 3) метанол, высушивали естественным путем (20–25 мин);
- 4) процедуру инкубирования и высушивания повторяли трижды;
- 5) добавляли 65 мкл бидистиллированной воды и проводили инкубацию в два этапа – 20 минут при +65 °C и еще 10 минут при +98 °C. Инкубировали при постоянном встряхивании (400 об/мин);
- 6) пробу центрифугировали в течение 10–15 с при 10000 об/мин. Образцы делили на аликвоты и хранили при –20 °C.

Определение концентрации ДНК, РНК и белка в пробах осуществляли с помощью спектрофотометра The NanoDrop® ND-1000 (объем пробы 2 мкл).

Молекулярно-генетическую диагностику проводили методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализа).

Информация о свойствах праймеров была получена при помощи онлайн-сервиса <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Нами была отработана оптимальная температура плавления праймеров  $T_m$ , которая составила 60 °C. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности используемых праймеров

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
PPARa forward	ACAATCACTCCTTAAATATGGTGG
PPARa reverse	AAGTAGGGACAGACAGGACCAGTA

Рабочая смесь состояла из 2X T-buffer F (15 мкл), смеси четырех дезоксиолигонуклеотидов (3 мкл), прямого и обратного праймера (по 0,6 мкл на пробу), ДНК-матрицы (1–4 мкл, в зависимости от концентрации), Tornado Taq-полимеразы 2U (0,5 мкл на пробу), H<sub>2</sub>O (объем пробы доводили до 30 мкл).

Условия полимеразной цепной реакции (ПЦР): первичная денатурация 15 мин при 95 °C; 35 циклов, состоящие из 20 с при 95 °C, 30 с при 60 °C, 1 мин при 72 °C, и 5-минутной заключительной элонгации при 72 °C.

Для выявления однонуклеотидных замен продукты ПЦР инкубировали с эндонуклеазами рестрикции (TaqI, производства Jena Bioscience) в течение 4 ч при 37 °С, после чего проводили их электрофоретическое разделение в 6 % геле.

Визуализация результатов исследования проводилась при помощи трансиллюминатора CN-1000 Darcroom (Vilber Lourmal, Германия) и оригинального программного обеспечения Vision-Capt Version 14.3 for Windows.

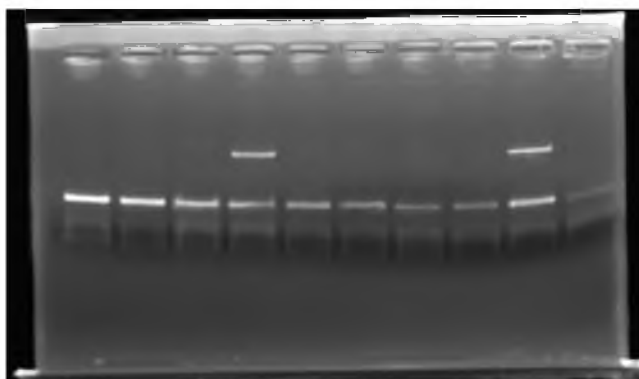


Рисунок – Визуализация продуктов рестрикции в 6 % агарозном геле. На рисунке показано, что 4 и 9 образцы имеют нуклеотидную замену G на C

Анализ результатов проводили с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента, так как с помощью «ФТЕСТА» было установлено, что дисперсии двух выборок статистически не различаются (ФТЕСТ=0,21).

Таблица 2 – Частоты распределения аллелей полиморфизма L162V гена PPARα

Частота распространённости генотипов и аллелей	Виды спорта		Достоверность различия
	циклические	ациклические	
GG	14 (32,6 %)	10 (55,6 %)	p<0,05
GC	28 (65,2 %)	8 (44,4 %)	p<0,05
CC	1 (2,3 %)	0 (0 %)	–
G	56 (65,1 %)	28 (77,8 %)	p<0,1
C	30 (34,9 %)	8 (22,2 %)	p<0,1

Представленные в таблице 2 данные свидетельствуют о существенной разнице в структуре генотипов по гену PPARα. Так, для ациклических видов спорта характерно нарастание на уровне тенденции доли аллеля G (77,8 % против 65,1 %, p<0,1) и снижение доли аллеля C (22,2 % против 34,9 %, p<0,1). Изменение соотношения аллелей генотипов: частоты гомозиготного носительства его аллели G статистически достоверно выросла (55,6 % против 32,6 %, p<0,05) у представителей ациклических видов спорта, а гомозиготы CC в этой группе не встречаются вовсе.

Таким образом, суммируя изложенное выше, можно констатировать, что состояние гена PPARα может служить одним из прогностических факторов для прогнозирования начинающих спортсменов.

1. Ахметов, И. И. Молекулярная генетика спорта: монография / И. И. Ахметов. – М.: Советский спорт, 2009.
2. Волков, В. М. Спортивный отбор / В. М. Волков, В. П. Филин. – М.: Физкультура и спорт, 1983.
3. Ахметов, И. И. Роль полиморфизма гена PPARα в энергетическом обеспечении мышечной деятельности спортсменов / И. И. Ахметов // Генетические, психофизические и педагогические технологии подготовки спортсменов: сб. науч. ст. – СПб., 2006. – С. 81–90.
4. Finck, B. N. A critical role for PPARα-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content / B. N. Finck.
5. Ахметов, И. И. Взаимосвязь полиморфизмов генов с успешностью соревновательной деятельности элитных гребцов / И. И. Ахметов, Д. В. Ребриков // Вестник спортивной науки. – 2008. – № 4. – С. 70–72.