



ГЕНЕТИКА

УДК 575.17

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА У СПОРТСМЕНОВ-ВОЛЕЙБОЛИСТОК

Ф.И. СОБЯНИН
И.К. АРИСТОВА
Н.А. РУДЫХ
М.И. ЧУРНОСОВ

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: aristova@bsu.edu.ru

В работе исследуются полиморфные варианты генов ангиотензин превращающего фермента (ACE) и эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) у спортсменов, занимающихся волейболом. Установлены частоты распределения полиморфизмов этих генов у спортсменов-волейболисток. Выполнен сравнительный анализ полученных данных с частотами распределения аллельных вариантов генов ACE и eNOS в популяционном контроле.

Ключевые слова: полиморфизм гена eNOS, полиморфизм гена ACE, спортсменки-волейболистки.

На сегодняшний день определение генетической предрасположенности спортсмена – одно из самых перспективных направлений развития современного спорта. Изучение генов позволит выявить факторы и причины, способствующие достижению спортсменами высоких результатов, что в дальнейшем даст информацию для формирования критериев, позволяющих осуществлять наиболее эффективный профессиональный отбор претендентов [1, 2, 3]. В настоящее время выявлены генетические маркеры, или гены предрасположенности, тесно ассоциированные с развитием и проявлением различных физических качеств [4]. Основным генетическим маркером, связь которого со спортивными результатами в разных видах спорта убедительно доказана в исследованиях последних лет, остается ген ангиотензин превращающего фермента (ACE) [5, 9]. Наряду с данным геном наиболее вероятным кандидатом на роль генетического маркера, который ассоциирован со спортивной успешностью, является и ген эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), определяющий функции сердечно-сосудистой системы [8, 10].

Цель исследования состояла в выявлении и анализе полиморфизма двух генов: ангиотензин превращающего фермента и эндотелиальной синтазы оксида азота у спортсменок-волейболисток.

Исследуемую выборку составила 31 спортсменка-волейболистка. В популяционную выборку (контроль) входило 492 жителя Центральной России [7].

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены индивида. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (рН=8.0) и хранили при температуре 4°C не более одной недели. ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции.

Проведено типирование двух генетических систем: инсерционно-делеционный



полиморфизм гена ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE) и VNTR-полиморфизм гена эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS). Анализ локуса ACE проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1). Реакция осуществлялась в 25 мкл общего объема смеси, содержащей 67 мМ трис-НСl (рН=8,8), 2,5мМ MgCl₂, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации (5 мин при 95°C) выполняли 33 цикла амплификации по схеме: денатурация – 40 сек при 94°C; отжиг праймеров – 40 сек при 57°C; элонгация – 30 сек при 72°C. Затем пробы выдерживали 6 мин при 72°C и охлаждали. Продукты амплификации разделяли в 2%-ном агарозном геле, окрашенным бромистым этидием, в течении 20 минут при 200V. В качестве электрофорезного буфера использовали 1xTAE (трис-ацетатный буфер). Затем пробы идентифицировали в проходящем УФ-свете. При анализе амплифицируемых фрагментов применяли следующую номенклатуру аллелей: аллель I (490 пн) – наличие (инсерция) Alu-повтора, аллель D (190 пн) – его отсутствие (делеция). Анализ полиморфизма гена eNOS проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1). Реакция осуществлялась в 12,5 мкл общего объема смеси, содержащей 33 мМ трис-НСl (рН=8,8), 1,25 мМ MgCl₂, 0,1 мкг геномной ДНК, по 5 пМ каждого праймера, по 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации (5 мин при 95°C) выполняли 30 циклов амплификации по схеме: денатурация – 1 мин при 94°C; отжиг праймеров – 1 мин при 56°C; элонгация – 1 мин при 72°C. Затем пробы выдерживали 5 мин при 72°C и охлаждали. Продукты амплификации анализировали в 2%-ном агарозном геле, окрашенным бромистым этидием в течение 1 часа 30 минут при 100V. В качестве электрофорезного буфера использовали 1xTAE (трис-ацетатный буфер). Затем пробы идентифицировали в проходящем УФ-свете. При анализе амплифицируемых фрагментов применяли следующую номенклатуру аллелей: аллель 4a (393 пн) – 4 копии 27-членного повтора, аллель 4b (420 пн) – 5 копий 27-членного повтора.

Таблица 1

Структура праймеров, использованных для генотипирования ДНК-маркеров методом ПЦР

Название локуса	Последовательность праймеров	Литературный источник
ACE	5'- ctg gag acc act ccc atc ctt tct -3' 5'- gat gtg gcc atc aca ttc gtc aga-3'	[6]
eNOS	5'-agg ccc tat ggt agt gcc ttt-3' 5'-tct ctt agt gct gtg gtc ac-3'	[10]

Расчет фенотипических, генных частот, наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности, индекса фиксации Райта (D) проводили стандартными методами [6]. Для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайберга (HWE), применяли критерий χ^2 .

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 6.0.

Исследование полиморфизма локуса ACE выявило, что среди спортсменов-волейболисток наиболее часто встречался гетерозиготный генотип ID (58,07%). На долю гомозиготных генотипов II и DD приходилось, соответственно 19,35% и 22,58%. Результаты сравнительного анализа полученных данных с популяционной выборкой (I/I – 24,19%, I/D – 48,38%, D/D – 27,43%) весьма близки. В то же время в группе спортсменок можно отметить увеличение частоты встречаемости гетерозигот (генотип I/D), которое произошло за счет снижения количества гомозигот генотипа DD и генотипа II, однако различия не достигли значимого уровня ($\chi^2=2,68$; $p>0,05$). Следует отметить, что и в группе спортсменок-волейболисток, и в контроле наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому согласно равновесию Харди-



Вайнберга. Частоты аллелей ACE*I и ACE*D по данному гену среди спортсменов и в популяционной выборке оказались одинаковы (0,48 и 0,52 соответственно) (таб.2).

При изучение полиморфизма гена eNOS получено следующее распределение частот генотипов у спортсменов-стрелков: генотип 4a4a – 0%, генотип 4a4b – 25,81% и генотип 4b4b – 74,90%. В популяционной выборке частоты генотипов распределились следующим образом: генотип 4a4a – 3,84%, генотип 4a4b – 32,20% и генотип 4b4b – 63,96%. Сравнительный анализ распределения генотипов локуса eNOS среди спортсменок и в популяционном контроле достоверных различий не выявил. Однако следует отметить, что в группе спортсменок не обнаружен генотип 4a4a. Распределение наблюдаемых генотипов среди спортсменов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,09-0,72$; $p>0,05$).

Таблица 2

Инсерционно-делеционный полиморфизм гена ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE) и VNTR-полиморфизм гена эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS) среди спортсменок, занимающихся волейболом и в популяционном контроле

Локусы, показатели генетической изменчивости		Спортсменки-волейболистки (n=31)	Популяция [7] (n=492)	
I/D ACE	ΣN	31	463	
	$N_o(N_e)$	II	6 (7,26)	112 (108,37)
		ID	18 (15,48)	224 (231,30)
		DD	7 (8,26)	127 (123,37)
	$\chi^2(HWE) (p)$	0,81 (>0,05)	0,46 (>0,05)	
	$H_o (H_e)$	0,53 (0,50)	0,48 (0,49)	
	D (I)	+0,16 (0,11)	-0,03 (0,67)	
	ACE*I	0,48	0,48	
ACE*D	0,52	0,52		
4a/4b eNOS	ΣN	31	469	
	$N_o(N_e)$	4a4a	0 (0,52)	18 (18,64)
		4a4b	8 (6,97)	151 (149,72)
		4b4b	23 (23,52)	300 (300,64)
	$\chi^2(HWE) (p)$	0,68 (>0,05)	0,03(>0,05)	
	D (I)	+0,15 (0,33)	+0,01 (0,10)	
	$H_o (H_e)$	0,23 (0,26)	0,31 (0,32)	
	eNOS*4a	0,13	0,20	
eNOS*4b	0,87	0,80		

Примечание: ΣN – объем выборки, N_o – наблюдаемое распределение генотипов, N_e – ожидаемое распределение генотипов, H_o – наблюдаемый уровень гетерозиготности, H_e – ожидаемый уровень гетерозиготности, D – индекс фиксации Райта (отношение между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью).

При анализе аллельного полиморфизма локуса идентифицировано 2 аллеля с числом повторов 4 (аллель a) и 5 (аллель b). В группе спортсменок частоты аллелей eNOS*a и eNOS*b составили соответственно 0,13 и 0,87 (таб.2). Выявлена более высокая частота аллеля eNOS*b (0,87%) по сравнению с популяционной выборкой (0,80). Однако данные различия не достигли достоверного уровня.

Таким образом, для локусов ACE и eNOS значимых взаимосвязей с уровнем спортивных результатов у спортсменок-волейболисток не обнаружено. Однако следует отметить, что полученные результаты носят предварительный характер. Данное исследование будет продолжено на более многочисленной выборке волейболисток с



применением более широкого спектра генетических полиморфных систем, которые могут быть связаны с уровнем спортивных результатов у спортсменов, занимающихся волейболом.

Литература

1. Rogozkin, V.A. Перспективы использования ДНК-технологий в спорте / Ахметов И.И. Астратенкова И.В. // Теория и практика физической культуры. – 2006. – № 7. – С. 45-47.
2. Евсеев, С.П. Заметки с европейского колледжа спортивных наук/ Rogozkin V.A., Шелков О.М. // Адаптивная физическая культура. – 2007. – № 3.- С. 37-41.
3. Ахметов, И.И. Ассоциация полиморфизмов генов с типом мышечных волокон / Астратенкова И.В., Дружевская А.М., Комкова А.И., Любаева Е.В., Таракан П.П., Шенкман Б.С., Rogozkin V.A. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2006. – Т. 92, № 7. – С. 882-892.
4. Ahmetov, I.I. The use of molecular genetic methods for prognosis aerobic and anaerobic performance in athletes // Human Physiology. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 338-342.
5. Wang, X. Effects of angiotensinogen and angiotensin II type I receptor genes on blood pressure and left ventricular mass trajectories in multiethnic youth / Zhu H., Dong Y. et al. // Hum. Genet. – 2006. – № 9 (3). – P. 393-402.
6. Спиридонова, М.Г. Анализ генных комплексов подверженности к коронарному атеросклерозу / Степанов В.А., Пузырев В.П., Карпов Р.С. // Генетика. – 2002. – т. 38, №3. – С. 383-392.
7. Чурносков, М.И. Описание структуры генофонда русского населения юга Центральной России / Сорокина И.Н., Лепендина И.Н., Аристова И.К., Жерлицына М.С., Песик В.Ю., Рудых Н.А., Цапкова Л.А., Ващилин В.С., Балановская Е.В. // Медицинская генетика.- 2006. – т. 5, №6 – С. 16-20.
8. Шнайдер, О.В. Влияние структурных полиморфизмов генов ангиотензин-превращающего фермента, эндотелиальной синтазы окиси азота и рецептора брадикинина 2-го типа на состояние миокарда у спортсменов и больных гипертонической болезнью / Обрезан А.Г., Макеева Е.Д. и др. // Цитология. – 2004. – № 46. – С. 69-79.
9. Ворощин, И.Н. Зависимость общей выносливости от полиморфизма гена ACE у спортсменов / Астратенкова И. В. // Физиология человека: журнал РАН. – 2008. – Т.34, №1. – С. 129-131.
10. Casas, J.P. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects / Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D. // Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 1359-1365.

THE STUDY OF GENE POLYMORPHISMS OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME AND ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE IN ATHLETES, VOLLEYBALL PLAYERS

F.I. SOBAYNIN
I.K. ARISTOVA
N.A. RUDYH
M.I. CHURNOSOV

Belgorod National Research University

e-mail: aristova@bsu.edu.ru

The polymorphic variants of genes angiotensin converting enzyme (ACE) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were examined in athletes, volleyball players. The frequencies distribution of these genes polymorphisms was determined in athletes. A comparative analysis of the data obtained with the frequency distribution of allelic variants of genes ACE and eNOS in the control population.

Key words: gene polymorphism eNOS, gene polymorphism ACE, athletes, volleyball players.