

**АСОЦІАЦІЯ G/C ПОЛІМОРФІЗМУ 7-ГО ІНТРОНУ ГЕНУ
α-РЕЦЕПТОРА, ЩО АКТИВУЄ ПРОЛІФЕРАЦІЮ
ПЕРОКСИСОМ (PPARA) З ФІЗИЧНОЮ ДІЯЛЬНІСТЮ
У СПОРТІ**

С.Б. Дроздовська

Національний університет фізичного виховання і спорту України

Вступ

Швидкий прогрес у розвитку молекулярної генетики м'язової діяльності та застосування сучасних молекулярно-біологічних методів дозволили встановити, що фізична працездатність у спорті залежить від комплексу поліморфізмів генів, білкові продукти яких приймають участь у процесах адаптації до м'язової діяльності [1, 17]. Поєднання сприятливих алелей генів призводить до створення оптимальних умов для напруженого функціонування всіх систем організму при інтенсивній м'язовій діяльності. Одним з генів-кандидатів, чий поліморфізм впливає на фізичну працездатність в різних видах спорту, є ген α - рецептора, що активує проліферацію пероксисом (PPARA). Цей ген кодує синтез білка α-рецептора (PPARα), який є транскрипційним фактором, що активує експресію декількох десятків генів, що приймають участь у ліпідному, вуглеводному, енергетичному обміні, контролюють масу тіла та запальні процеси в судинах. PPARα експресується у серцевому та скелетних м'язах, жировій тканині, печінці [4, 5, 11].

Встановлено, що рівень експресії PPARα є вищим у повільно-скоротливих м'язових волокнах [15], а тренування на витривалість призводять до збільшення окислювального потенціалу скелетних м'язів шляхом PPARα регуляції генної експресії [12,13].

PPARα регулює експресію генів, які кодують важливі м'язові ферменти, залучені до окислення жирних кислот [4, 16]. Існує ряд даних, які підтверджують важливу роль PPARα у адаптаційних процесах у відповідь на тренування з переважним розвитком витривалості [2, 7]. Ген PPARA локалізований на 22 хромосомі (22q13.31), складається з 93,230 баз і містить за даними бази NCBI (National center for biotechnology information) 2493 SNP (однонуклеотидні поліморфізми). Най-

більш вивченим поліморфізмом цього гену є заміна нуклеотида G на C в 2528 положенні 7-го інтрону (rs 4253778 G/C). Частота мінорного алелю C в європейській популяції за даними NCBI складає від 0,195 до 0,212, тоді як в афро-американській популяції вона значно вища (від 0,625 до 0,833), а у азіатській значно менше (≈0%).

G/C поліморфізм 7-го інтрону гену PPARA пов'язаний з переважанням метаболізму жирних кислот або глюкози. У носіїв G-алелю окислення жирних кислот у клітинах печінки, міокарду, скелетних м'язах і інших органах відбувається інтенсивніше, ніж у носіїв C-алелю [10, 11]. Недостатність окислення жирних кислот у останніх компенсується підвищенням утилізації глюкози. Тому алель G відноситься до алелей витривалості, а C- алель до алелей швидкості-сили. Кореляційний аналіз G/C поліморфізму гену PPARA з даними ехокардіографічного обстеження спортсменів продемонстрував асоціацію алеля PPARA C з ризиком розвитку гіпертрофії міокарду лівого шлуночка. Встановлена асоціація PPARA G - алелю з переважанням повільних м'язових волокон [2, 13].

Деякими авторами встановлено, що не існує вірогідних відмінностей у розподілі генотипів за A/C поліморфізмом 1 інтрону гену PPARA між спортсменами – спринтерами, спортсменами, які спеціалізуються в видах спорту на витривалість та контрольною групою [8]. Тому вказаний поліморфізм не може бути маркером спадкової схильності до різних видів спорту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконується згідно теми 2.22 «Розробка комплексної системи визначення індивідуально-типологічних властивостей спортсменів на основі прояву геному» зведеного плану науково-дослідної роботи у сфері фізичної культури і спорту на 2011 – 2015 рр. (номер державної реєстрації 0111U001729).

Мета – вивчити поширеність поліморфізму цього гену серед українських спортсменів, встановити його взаємозв'язок з фізичною працездатністю у спорті.

Методи та матеріали дослідження

В обстеженні прийняло участь 287 осіб, з них 202 кваліфікованих спортсмена та 85 осіб, які не мають регулярного стажу занять спортом та склали контрольну групу. Всі обстежені спортсмени залежно від характеру енергозабезпечення м'язової діяльності в обраному виді спорту були поділені на 3 групи: 1) спортсмени, які спеціалізуються

у дисциплінах спорту, що вимагають прояву витривалості (n=80); 2) спортсмени, які спеціалізуються у дисциплінах, що вимагають прояву сили та швидкості (n=71); 3) спортсмени, які спеціалізуються у дисциплінах, що вимагають прояву витривалості та сили (n=51).

ДНК виділяли із букального епітелію за допомогою набору реактивів Diatom™ DNA Prep (Biokom). Поліморфізми генів визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR), з подальшою обробкою рестриктазами, та наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Генотипування спортсменів виконувалося на базі молекулярно-генетичної лабораторії відділу загальної і молекулярної патофізіології інституту фізіології імені О.О.Богомольця, Національної академії наук України.

G/C поліморфізм 7-го інтрону гену *PPARA* (rs4253778) визначали у відповідності з методикою, запропонованою Flavell et al. (2002), ампліфікуючи ділянку гена за участю прямого: 5'-ACAATCACTCCT-TAAATATGGTGG-3', та зворотнього: 5'-AAGTAGGGACAGACAG-GACCAGTA-3' праймерів [10] (праймери синтезовані фірмою «Metabion», Німеччина). До складу реакційної входили: 5 мкл -PCR-буфера («АмпліСенс», Росія), 2,5 мкл dNTP, по 30 пмоль/л кожного з праймерів і 0,1 ОД Tag-полімерази («АмпліСенс», Росія), обсяг доводили до 25 мкл деіонізованою водою. До реакційної суміші додавали 1 мкл ДНК і використовували наступний температурний режим ПЦР на термоциклері «Applied Biosystems 2700» (США). Продуктами ампліфікації даної ПЛР є фрагменти ДНК довжиною 266 п.о. Присутність заміни нуклеотида G на C в 2528 положенні 7 інтрона гену *PPARA* створює для ендонуклеази *Taq I* сайт рестрикції (T↓CGA). Наявність сайту рестрикції обумовлює розподіл ампліконів на два фрагменти довжиною 216 і 50 п.о. Генотипу G/G відповідали нерестрифіковані фрагменти довжиною 266 п.о., генотипу G/C – три фрагменти довжиною 266, 216 і 50 п.о., а генотипу C/C – два фрагменти довжиною 216 і 50 п.о.

Для виявлення однонуклеотидної заміни амплікони інкубували разом з *Taq I* ендонуклеазою рестрикції (*Taq I* refSNP ID: rs4253778) («Fermentas», Литва). Склад рестрикційної суміші: деіонізована вода - 0,8 мкл; буфер - 0,8 мкл, *Taq I* рестриктаза - 0,4 мкл. Інкубацію рестрикційної суміші (2 мкл) с продуктами ампліфікації (6 мкл) проводили в окремі пробірці в термостаті при 65 °C (на ніч).

Ампліфікати після рестрикції розділяли у 2,5% агарозному гелі, який містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізація ДНК після

горизонтального електрофореза (160 V на протязі 40 хв) проводилася за допомогою трансільомінатора ("Біоком", Росія) і відеосистеми ViTran (Росія). Вірогідність відмінностей у розподілі вибірок визначали за критерієм χ^2 . Значення $P < 0,05$ вважали вірогідним.

Отримані результати та їх обговорення

Серед дослідників затвердилася думка про те, що G/C поліморфізм 7-го інтрону гену *PPARA* може виступати маркером схильності до м'язової роботи [1]. За допомогою нашого аналізу виявлено, що тільки автори одного дослідження зтверджують, що обидві алелі даного поліморфізму є прогностичними маркерами схильності до виконання м'язової роботи, решта – схильні до думки, що тільки G- алель може бути вірогідним маркером витривалості (табл.1).

Таблиця 1

Основні тенденції впливу G/C поліморфізму 7-го інтрону гену *PPARA* на спортивну працездатність [2, 6, 9, 14]

Автор	Суб'єкти	Кількість	Вид тестування	Асоціація
Cieszczyk P, 2011	Елітні спортсмени, які спеціалізуються у єдиноборствах	60	випадок-контроль	Частота G алелю вірогідно вища у елітних спортсменів, які спеціалізуються у єдиноборствах, ніж у контрольній групі.
Ахметов І., 2006	Елітні спортсмени різних видів спорту	1034	випадок-контроль	G алель асоційований з схильністю і до прояву витривалості, С алель до розвитку швидкісно-силових якостей
Ахметов І., 2006	Здорові чоловіки, які не займаються спортом	40	Генотип-фенотип	У осіб з G/G вищий відсоток повільних м'язових волокон, ніж у осіб з C/C генотипом
Eynon N., 2010	Елітні спортсмени	155	Випадок-контроль	G/G генотип асоційований з схильністю до розвитку витривалості
Maciejewska A., 2011	Елітні веслувальники	55	Випадок-контроль	G алель асоційований з розвитком витривалості

Оскільки, частота зустрічі різних генотипів за цим поліморфізмом в українській популяції раніше не вивчалася, ми встановили розподіл генотипів в групі осіб, які не займаються спортом (табл. 2).

Порівняльний аналіз поширення G/C поліморфізму 7-го інтрону гена PPARA у східно-європейських популяціях [2, 6]

Країна	Генотип, %			Частота G алелі	Кількість обстежених	Автор
	G/G	G/C	C/C			
Польща	54,7	30,94	14,36	0,70	181	Cieszczyk P. 2011
Росія	69,2	28,0	2,8	0,83	1275	Ахметов І., 2006
Україна	67,1	30,6	2,3	0,82	85	Наші результати

Як бачимо, наші результати збігаються з результатами, отриманими у інших слов'янських популяціях, зокрема, серед росіян [2]. Розподіл генотипів у нашій вибірці відповідає рівновазі Харді-Вайнберга ($p_{\chi^2}=0,64$).

Таблиця 3

Частота зустрічі алельних варіантів G/C поліморфізму 7-го інтрону гена PPARA серед спортсменів різних видів спорту (n=287)

Генотип	Спортсмени, які спеціалізуються в видах спорту на витривалість		Спортсмени, які спеціалізуються в швидкісно-силових видах спорту		Змішана група		Всі спортсмени		Контрольна група	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
G/G	59	73,8	52	73,2	39	76,5	150	74,3	57	67,1
G/C	21	26,3	17	23,9	12	23,5	50	24,8	26	30,6
C/C	0	0	2	2,8	0	0	2	1,0	2	2,3
Частота G алелі	0,86		0,85		0,88		0,86		0,82	
Частота C алелі	0,13		0,14		0,11		0,134		0,176	
Загальна кількість	80		71		51		202		85	
P_1	0,29		0,64		0,34		0,37		1	
P_2	0,26		0,5		0,19		0,19		1	
P_3	0,31									

Примітки: P_1 - статистична вірогідність відмінностей за розподілом генотипів у порівнянні з контрольною групою; P_2 - статистична вірогідність відмінностей за розподілом алелей у порівнянні з контрольною групою; P_3 - статистична вірогідність відмінностей за розподілом генотипів у порівнянні зі спортсменами на витривалість.

Оскільки прогностичне значення цього маркера для спортсменів різних видів спорту остаточно не встановлено, тому ми провели дослідження поширеності алельних варіантів цього поліморфізму серед українських спортсменів різних видів спорту (табл. 3). Порівняльний аналіз розподілу генотипів та алелей у загальній групі спортсменів та у контрольній групі не дозволив встановити вірогідні відмінності між цими вибірками ($p_{\chi^2_{gen}}=0,37$), ($p_{\chi^2_{al}}=0,19$). Але в групі спортсменів, частота зустрічі генотипу G/G на 7,2% перевищувала частоту в контрольній групі, частота зустрічі генотипу G/C і C/C були на 5,8% і 1,3%, а частота G-алелю на 4,2% вище, ніж у контрольній групі (рис.1). Отже, G/G-генотип та G алель G/C поліморфізму 7-го інтрону гена PPARA можуть сприяти високій спортивній працездатності.

Аналіз результатів генотипування спортсменів різних видів спорту свідчить, що в усіх групах видів спорту, яких ви вивчали, спостерігається переважання частоти G алелі та G/G генотипу у порівнянні з контролем (рис. 1).

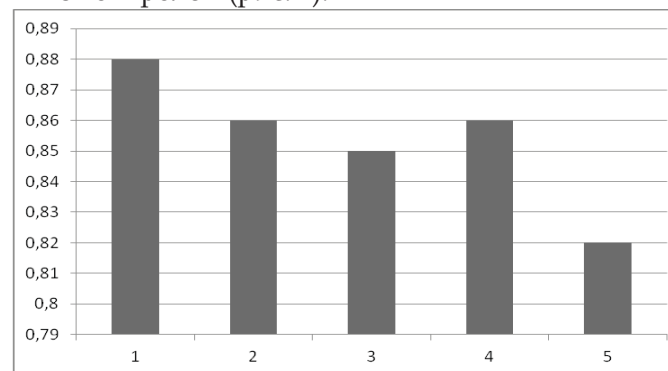


Рис.1. Частота G - алеля в групах спортсменів та контрольній групі, де 1 - група змішаних видів спорту, 2 - види спорту з переважним розвитком витривалості, 3-швидкісно-силові види спорту, 4- всі спортсмени, 5-контрольна група.

Найвища частота G алеля у спортсменів, які займаються тими видами спорту, де необхідне поєднання сили та витривалості, а найменша у спортсменів в швидкісно-силових видах спорту. Вірогідної різниці між спортсменами, які займаються на витривалість та спортсменами швидкісно-силових видів спорту встановлено не було. Але спостерігається тенденція до зростання частоти G-алеля зі зростанням спортивної майстерності в видах спорту з переважним проявом витривалості: КМС (0,58)→МС (0,59)→МСМК (0,68).

Аналогічні результати спостерігалися в дослідженнях ізраїльських спортсменів [9]. Аналіз по видах спорту дозволив помітити розкид результатів між різними видами спорту (табл. 4).

Таблиця 4

Розподіл алельних варіантів G/C поліморфізму 7-го інтрону гена PPARA серед спортсменів різних видів спорту

Вид спорту	Метання	Спринт	Стрибки	Вітрильний спорт	Єдиноборства	Академічне веслування	Лижні гонки
N	16	18	23	28	23	65	12
G/G	93,8	83,3	60,9	78,6	73,9	75,4	58,3
G/C	6,3	16,7	34,8	21,4	26,1	24,6	41,7
C/C	0	0	4,3	0	0	0	0
Частота G-алеля	0,969*	0,917	0,783	0,893	0,87	0,877	0,79
Частота C-алеля	0,031*	0,083	0,217	0,107	0,130	0,123	0,21
P	0,1	0,37	0,79	0,43	0,67	0,31	0,6

Примітки: P – статистична вірогідність відмінностей за розподілом генотипів між контрольною групою та спортсменами, $p < 0,05$; * – вірогідні відмінності у частоті алелей у порівнянні з контрольною групою за χ^2 -критерієм.

Найвищою частотою G-алеля серед обстежених нами груп, характеризуються спортсмени, які спеціалізуються у легкоатлетичних метаннях та бігу на короткі дистанції.

Результати нашої комбінованої групи, до якої належать спортсмени різних видів єдиноборств, співпадають з результатами отриманими на польських спортсменах, які спеціалізуються у єдиноборствах [6] було також встановлено високу частоту G-алеля (0,83).

Відомо, що у носіїв G-алелю окислення жирних кислот у клітинах печінки, міокарду, скелетних м'язах і інших органах відбувається інтенсивніше, ніж у носіїв C-алеля, очевидно, тому алель G відноситься до алелей, що сприяють високій спортивній працездатності.

Висновки

1. Розподіл генотипів та алелей в групі спортсменів та контрольній групі відрізняється. Частота зустрічі генотипу G/G та алеля G за G/C поліморфізмом 7-го інтрону гена PPARA у спортсменів вищі, ніж у контрольній групі. G/G-генотип та G-алель G/C поліморфізму 7-го інтрону гена PPARA сприяють високій фізичній працездатності.

2. Даний поліморфізм можна використовувати у якості маркера схильності до високої фізичної працездатності в усіх видах спорту.

Література

1. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта: монография / И.И. Ахметов. - М.: Советский спорт, 2009. - 268 с.
2. Ахметов И.И. Ассоциация полиморфизмов генов-регуляторов с физической деятельностью, адаптацией сердечно-сосудистой системы к физическим нагрузкам и типом мышечных волокон: автореф. диссерт. на соискание ученой степени канд. мед.н.: спец. 14.00.51 «Восстановительная медицина» / И.И. Ахметов. - СПб, 2006. - 22 с.
3. Ассоциация полиморфизмов генов-регуляторов с аэробной и анаэробной работоспособностью спортсменов / И.И. Ахметов, Д.В. Попов, И.А. Можайская [и др.] // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. - 2007. - Т. 93, № 8. - С. 837-843.
4. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) / T. Aoyama, J.M. Peters, N. Iritani, T. Nakajima, K. Furihata, T. Hashimoto [et al.] // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol. 273. - P. 5678-5684.
5. Braissant O. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β and - γ in the adult rat / O. Braissant, F. Foulfelle, C. Scotto, M. Dauca, W. Wahli // Endocrinology. - 1996. - Vol. 137. - P. 354-366.
6. Cieszczyk P. Variation in peroxisome proliferator activated receptor α gene in elite combat athletes / P. Cieszczyk, M. Sawczuk, A. Maciejewska [et al.] // Eur. J. of Sport Science. - 2011. - 11 (2). - P. 119-123.
7. Cresci S. Activation of a novel metabolic gene regulatory pathway by chronic stimulation of skeletal muscle / S. Cresci, L.D. Wright, J.A. Spratt [et al.] // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. - 1996. - Vol. 270. - P. 1413-1420.
8. Eynon N. PPARA intron 1 A/C polymorphism and elite athlete status / N. Eynon, A.J. Alves, C.Y. Amin, Y. Meckel // Eur. J. of Sport Science. - 2011. - Vol. 11 (3). - P. 177-181.
9. Eynon N. Do PPARGC1A and PPARalpha polymorphisms influence sprint or endurance phenotypes? / N. Eynon, Y. Meckel, M. Sagiv [et al.] // Scand. J. Med. Sci. Sports. - 2010. - № 20. - P. 145-150.
10. Flavell D.M. Peroxisome proliferator-activated receptor gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease / D.M. Flavell, Y. Jamshidi, E. Hawe [et al.] // Circulation. - 2002. - Vol. 105. - P. 1440-1445.
11. Foucher C. Response to micronized fenofibrate treatment is associated with the peroxisome-proliferator-activated receptors alpha G/C intron7 polymor-

phism in subjects with type 2 diabetes / C. Foucher, S. Rattier, D.M. Flavell [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 2004. – Vol. 14 (12). – P. 823-829.

12. Horowitz J.F. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training / J.F. Horowitz, T.C. Leone, W. Feng [et al.] // *Amer. J. of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. – 2000. – Vol. 279. – P. 348–355.

13. Jamshidi Y. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension / Y. Jamshidi, H.E. Montgomery, H.W. Hense [et al.] // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105. – P. 950-955.

14. Maciejewska A. Variation in the PPARalpha gene in Polish rowers / A. Maciejewska, M. Sawczuk, P. Cieszyzyk // *J. Sci. Med. Sport*. – 2011. – Vol. 14 (1). – P. 58-64.

15. Russell A.P. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle / A.P. Russell, J. Feilchenfeldt, S. Schreiber [et al.] // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52. – P. 2874–2881.

16. Schmitt B. Transcriptional adaptations of lipid metabolism in tibialis anterior muscle of endurance-trained athletes / B. Schmitt, M. Fluck, J. Decombaz // *Physiol. Genomics*. – 2003. – № 15. – P. 148-157.

17. Williams A. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance / A. Williams, J. Folland // *J. Physiol.* – 2008. – Vol. 586 (1). – P. 113-121.

Резюме

Дроздовська С.Б. Асоціація G/C поліморфізму 7-го інтрону гену α - рецептора, що активує проліферацію пероксисом (PPARA) з фізичною діяльністю у спорті.

Проведено аналіз літературних джерел з метою виявлення прогностичного значення цього маркера для різних видів спорту. У роботі встановлено частоту зустрічі G/C поліморфізму 7-го інтрону гену PPARA серед українського населення та спортсменів різних видів спорту. В обстеженні прийняло участь 287 осіб, з них 202 кваліфікованих спортсменів (80 спортсменів, які спеціалізуються у дисциплінах спорту, що вимагають прояву витривалості; 71 спортсмен, який спеціалізується у дисциплінах, що вимагають прояву сили та швидкості; 51 спортсмен, який спеціалізується у дисциплінах, що вимагають прояву витривалості та сили) та 85 осіб, які не мають регулярного стажу занять спортом та склали контрольну групу. Встановлено, що частота зустрічі генотипу G/G та алеля G за G/C поліморфізмом 7-го інтрону гену PPARA у спортсменів вища, ніж у контрольній групі, що дозволяє використовувати даний поліморфізм у якості маркера схильності до високої фізичної працездатності у спорті.

Ключові слова: поліморфізм генів, α - рецептор, що активує проліферацію пероксисом, спорт, спортивний добір, молекулярно-генетичні маркери.

Резюме

Дроздовская С.Б. Ассоциация G/C полиморфизма 7-го интрона гена α - рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом (PPARA) с физической деятельностью в спорте.

Проведен анализ литературных источников с целью определения прогностического значения этого маркера для различных видов спорта. В работе установлена частота встречи G/C полиморфизма 7-го интрона гена PPARA среди украинского населения и спортсменов различных видов спорта. В обследовании приняли участие 287 человек, из них 202 квалифицированных спортсменов (80 спортсменов, специализирующихся в дисциплинах спорта, требующих проявления выносливости; 71 спортсмен, специализирующийся в дисциплинах, требующих проявления силы и скорости; 51 спортсмен, который специализируется в дисциплинах, требующих проявления выносливости и силы) и 85 человек, не имеющих регулярного стажа занятий спортом, составившие контрольную группу. Установлено, что частота встречи генотипа G/G и аллеля G за G/C полиморфизма 7-го интрона гена PPARA у спортсменов выше, чем в контрольной группе, что позволяет использовать данный полиморфизм в качестве маркера предрасположенности к высокой физической работоспособности в спорте.

Ключевые слова: полиморфизм генов, α - рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом, спорт, спортивный отбор, молекулярно-генетические маркеры.

Summary

Drozdovska S.B. Association of G/C gene polymorphism of the 7th intron of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA) with physical activity in sport.

The analysis of the literature to identify the prognostic value of this marker for athletes of different sports was conducted. In this paper, the frequency of G/C polymorphism of the 7th intron of the gene PPARA among the Ukrainian people and athletes of different sports were established. 287 people, including 202 qualified athletes (80 endurance athletes; 71 power athletes; 51 athletes engaged in disciplines that requiring display of endurance and strength) and 85 people who didn't have experience of regular sports were participated in the survey. It was found that the frequency of the genotype G/G and G allele at G/C polymorphism of the 7th intron of the gene PPARA higher in athletes than in the control group. That fact allows the using of this polymorphism as a marker of predisposition to the high physical performance in sports.

Key words: gene polymorphism, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, sport, sports selection, molecular genetic markers.

Рецензент: д.мед.н., доц. В.А. Пастухова