

T⁻⁷⁸⁶ С ПОЛІМОРФІЗМ ПРОМОТОРА ГЕНА *eNOS* (ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ NO – СИНТАЗИ) У УКРАЇНСЬКИХ СПОРТСМЕНІВ

С.Б. Дроздовська

Національний університет фізичного виховання і спорту України (Київ)

Вступ

NO (оксиду азоту) – є одним з найбільш важливих біологічних медіаторів, який приймає участь у багатьох фізіологічних та патофізіологічних процесах. Активнація синтезу цього медіатора є одним з перших механізмів адаптації серцево-судинної системи до різних типів гіпоксії, що дозволяє зберегти оптимальне забезпечення організму киснем [1, 2]. Оксид азоту відіграє важливу роль у забезпеченні довгострокової адаптації організму до фізичних навантажень значного обсягу і інтенсивності. У осіб, які систематично виконують м'язову роботу характерний більш високий рівень синтезу оксиду азоту [3].

Його синтез каталізується ферментом ендотеліальною NO-синтазою (eNOS). Ген eNOS розміщений на хромосомі 7q35-36 і складається з 26 екзонів та 25 інтронів. Серед 453 алельних варіантів цього гена (за даними бази NCBI) виділено три поліморфізми, що найчастіше зустрічаються у хворих на серцево-судинні захворювання, і вважаються вагомими факторами-ризиком останніх. Це трансверсія T-786→C у промоторі гена eNOS, трансверсія G894→T в 7-му екзоні, що призводить до заміни глутаміну на аспарагін у 298 положенні білка eNOS та тандемні повтори варіабельної кількості 4-го інтрону (4b/4a). В галузі спортивної генетики вивчалися асоціації поліморфизму 4-го інтрону [4] та Glu298Asp поліморфизму 7 екзону з фізичною працездатністю у спорті [5].

Важливе значення в патогенетичних механізмах серцево-судинних захворювань серед всіх поліморфізмів гена eNOS має алельний поліморфізм промотору цього гену. У експерименті було доведено, що наявність алеля C в положенні (-786) промотору гену eNOS призводить до зниження його активності, а недостатня кількість eNOS, яка при цьому виникає, є причиною зменшення синтезу і вивільнен-

ня оксиду азоту і дисфункції ендотелію. Інтенсивність експресії гену ендотеліальної NO-синтази на 35% менше при C/C генотипі промотора, ніж при T/T варіанті, а активність продукції NO тромбоцитами людей з C/C варіантом промотора в 2,1 рази менша, ніж при T/T генотипі [6]. Встановлено, що T/C поліморфізм може коригувати величину ефекту тренування на ендотеліальну дисфункцію [7]. Проте вплив даного поліморфізму на фізичну працездатність у спорті та відмінності у розподілі генотипів за цим поліморфізмом серед спортсменів різних видів спорту до цього часу не досліджувалися.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконується згідно зведеного плану науково-дослідної роботи у сфері фізичної культури і спорту на 2011 – 2015 рр. та є фрагментом теми «Розробка комплексної системи визначення індивідуальнотипологічних властивостей спортсменів на основі прояву геному» (№ держреєстрації 0111U001729).

Мета роботи – встановити відмінності у розподілі генотипів за T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізмом промотора гена *eNOS* в групах спортсменів, що спеціалізуються у видах спорту з різним характером енергозабезпечення м'язової роботи.

Матеріали та методи дослідження

В ході роботи було досліджено ДНК 516 осіб, з них 195 спортсменів, різних видів спорту та 321 осіб, які не мали стажу регулярних занять спортом. Всі спортсмени були поділені на 3 групи за характером механізмів енергозабезпечення м'язової діяльності під час тренувальних та змагальних навантажень: 1) спортсмени, які спеціалізуються у дисциплінах з переважним проявом витривалості (n=82); 2) спортсмени, які спеціалізуються у дисциплінах з проявом швидкості та сили (n=90); 3) спортсмени, які спеціалізуються у дисциплінах з поєднаними вимогами до прояву витривалості та сили (n=23).

Обстеження спортсменів проводили на базі лабораторії теорії методик спортивної підготовки і резервних можливостей спортсменів НДІ НУФВСУ. Молекулярно-генетичний аналіз виконували на базі лабораторії відділу загальної і молекулярної патофізіології інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

ДНК виділяли із букального епітелію за допомогою набору реактивів Diatom™ DNA Prep (Biokom). T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізм промотора гена eNOS визначали ампліфікуючи ділянку промотора гена за допомогою прямого 5'-CAC CTG CAT TCT GGG AAC TGTA-3' та зворотнього - 5'-GCC GCA GTA GCA GAG AGAC-3' праймерів за

Ghilardi G. et al. («Синтол» (Росія)) [8]. Для проведення ПЦР використовували реакційну суміш такого складу: 5 мкл 5×PCR-буфера («АмпліСенс», Росія), 2,5 мкл dNTP, по 25 пмоль/л кожного з праймерів і 0,1 у Tag-полімерази («АмпліСенс», Росія), обсяг доводили до 25 мкл деіонізованою водою. До суміші додавали 50-100 нг ДНК. ПЦР проводили в термоциклері «Applied Biosystems 2700» (США). Ампліфікація фрагменту промотору складалася з 35 циклів: денатурація - 94° (1 хв), гібридизація праймерів - 63° - 74° (1 хв). У подальшому 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37° С протягом 18 годин з 5 ОД рестриктази PdiI («Ферментас», Литва) в буфері Y⁺/Tango наступного складу: 33 мМ трис-ацетату (рН 7.9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0.1 мг/мл альбуміну. За наявності в -786 положенні промотору тимідину рестрикція не відбувається, а при заміні на цитозин PdiI розщеплює ампліфіковану ділянку промотору (розмір 125 пар основ) на два фрагменти - 95 та 30 пар основ.

Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізація ДНК після горизонтального електрофорезу (160 V протягом 40 хв) проводилася за допомогою трансільюмінатору («Біоком», Росія) та відеосистеми ViTran (Росія).

Вірогідність відмінностей у розподілі вибірок визначали за критерієм χ^2 . Значення $P < 0.05$ вважали достовірним.

Отримані результати та їх обговорення

Поширення алельних варіантів T-786→C поліморфізму промотора гена eNOS в різних популяціях представлено у таблиці 1.

Частота генотипів за даним поліморфізмом в українській популяції за нашими даними складає: 43,3% T/T-генотип, 45,8% T/C-генотип, 10,9% C/C генотип. Розподіл алельних варіантів поліморфізму даного гену відповідає рівновазі Харді-Вайнберга ($p_{\chi^2} = 0,9$). Найбільш поширеним є гетерозиготний T/C - генотип. Порівняльний аналіз наших результатів з даними літератури свідчить, що хоча частота гомозиготного C/C генотипу в українській популяції значно нижча ніж в іспанській та англійській популяціях [8, 9], але частота алелі С не відрізняється від аналогічної частоти в інших вибірках.

Загальна вибірка спортсменів вірогідно відрізняється за розподілом від вибірки контрольної групи: частота T/T генотипу на 11,6% вища, а T/C генотипу на 10,4% нижче, ніж в контрольній групі ($p_{\chi^2} = 0,035$). Частота T алелі на 6,4% вища в вибірці спортсменів (табл. 2).

Розподіл алельних варіантів T-786→C поліморфізму промотора гена eNOS у групі спортсменів, які спеціалізуються в дисциплінах з

переважним розвитком витривалості немає вірогідних відмінностей від контрольної групи.

Таблиця 1

Поширеність T-786→C поліморфізму промотора гена eNOS в різних популяціях [6, 8, 9, 10, 11].

Країна	Генотип, %			Частота С алелі	Кількість обстежених	Автор
	T/T	T/C	C/C			
Іспанія	23,6	52,7	23,6	-	110	Cruz-Gonzalez, 2009 [9]
Іспанія	34	45	21	-	100	Ruiz, 2009 [10]
Італія	41	46	13	0,37	133	Ghilardi, 2002 [8]
Великобританія	37,6	47,8	14,5	0,37	3052	Jeerooburkhan, 2001 [11]
Україна	40,5	53,8	5,8	-	104	Досенко, 2006 [6]
Україна	43,3	45,8	10,9	0,34		Наші результати

Розподіл генотипів в групі спортсменів швидкісно-силових видів спорту та видів спорту, що потребують поєднаного розвитку сили та витривалості вірогідно відрізняються від контрольній групі ($p_{\chi^2} = 0,003$ та $p_{\chi^2} = 0,011$ відповідно). В групі спортсменів швидкісно-силових видів спорту частота T-алелі на 12% вища, ніж в контрольній групі і на 10% ($p_{\chi^2} = 0,004$), ніж в групі видів спорту на витривалість. Частота генотипу T/T в групі спортсменів швидкісно-силових видів перевищує на 20%, а в групі спортсменів змішаних видів на 13,2%, тоді як частота C/C генотипу в групі спортсменів швидкісно-силових видів значно менша ніж у контрольній групі, що дозволяє зробити припущення про лімітуючу роль цього генотипу для розвитку високої фізичної працездатності в цих видах спорту.

Основні тенденції впливу T-786→C поліморфізму промотора гена eNOS на спортивну працездатність [12] виражені у статті Gómez-Gallego F, 2009 та співав., де доводиться, що T алель цього поліморфізму кількісно переважає у спортсменів швидкісно-силових видів спорту і асоційована з успішністю у цих видах. Аналіз наших результатів дозволяє підтримувати цю ідею. Крім того, в наших дослідженнях так само, як і у вищезгаданих, немає вірогідної різниці між вибірками спортсменів, які спеціалізуються в видах спорту на витривалість та в

контрольній групі. Тому, результати свідчать, що Т- алель даного гену може вважатися маркером схильності до розвитку швидкості та сили.

Таблиця 2

Частота зустрічі алельних варіантів Т-786→С поліморфізму промотора гена eNOS серед спортсменів різних видів спорту (n=516)

Генотип	Спортсмени, видів спорту на витривалість (n=82)		Спортсмени швидкісно-силових видів спорту (n=90)		Спортсмени, які спеціалізуються в видах спорту, що вимагають поєднання витривалості та сили (n=23)		Всі спортсмени (n=195)		Контрольна група (n=321)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
T/T	37	45,1	57	63,3	13	56,5	107	54,9	139	43,3
T/C	38	46,3	27	30,0	4	17,4	69	35,4	147	45,8
C/C	7	8,5	6	6,7	6	26,1	19	9,7	35	10,9
Частота Т алелі	0,68		0,78		0,65		0,73		0,66	
Частота С алелі	0,32		0,22		0,35		0,27		0,34	
P ₁	0,82		0,003*		0,011*		0,035*		1	
P ₂	0,61		0,002*		0,89		0,03*		-	
P ₃	0,05		-		-		-		-	

Примітки: P₁ – статистична вірогідність у розподілі генотипів у порівнянні з контрольною групою, p<0,05; P₂ – статистична вірогідність у розподілі алелей у порівнянні з контрольною групою, p<0,05; P₃ – статистична вірогідність у розподілі генотипів у порівнянні з видами спорту на витривалість, p<0,05; * – вірогідні відмінності у за χ^2 критерієм, при p<0,05.

Аналіз розподілу частоти генотипів та алелей за 7 обраними видами спорту (легкоатлетичний спринт, легкоатлетичні стрибки, легкоатлетичні метання, академічне веслування, лижні гонки, підводне плавання, спортивні єдиноборства) дозволяє стверджувати, що вірогідно відрізняються від контрольної групи за розподілом генотипів спортсмени, які займаються плаванням (p=0,002) та спортсмени, які спеціалізуються у єдиноборствах (p=0,01). Якщо в контрольній групі кількісно переважають особи з генотипом Т/С, то у вищезгаданих групах переважають спортсмени з генотипом Т/Т (74,2% в плаванні та 56,5% в єдиноборствах проти 43,3% в контрольній групі). Частота

Т-алеля вірогідно вища в групі спортсменів, які займаються легкоатлетичними стрибками (p=0,04) та плаванням (p=0,009). Ці обидва види спорту належать до швидкісно-силових, таким чином, дані розподілу генотипів по видах спорту не суперечать раніше отриманим результатам, що Т алель сприяє фізичній працездатності в тих видах спорту, де робота виконується з максимальною потужністю короткий проміжок часу і енергозабезпечення здійснюється переважно за рахунок анаеробних механізмів ресинтезу АТФ.

Висновки

1. Розподіл генотипів за Т-786→С поліморфізмом промотора гена eNOS у українського населення становить: 43,3% Т/Т-генотип, 45,8% Т/С-генотип, 10,9% С/С генотип.

2. Частота генотипу Т/Т та частота Т алелю Т-786→С поліморфізму промотора гена eNOS у спортсменів швидкісно-силових видів спорту (p_{χ²}=0,003) та спортсменів, які потребують поєданого розвитку сили та витривалості (p_{χ²}=0,011) вірогідно переважають частоти в контрольній групі. Т алель Т-786→С поліморфізму промотора гена eNOS асоційована зі схильністю до занять швидкісно-силовими видами спорту та видів спорту, що потребують поєданого розвитку сили та витривалості.

3. Використання вивченого поліморфізму в якості молекулярно-генетичного маркера в процесі підготовки спортсменів на етапах первинного та попереднього добору дозволить оптимально вибрати вид спорту, дисципліну, що відповідають індивідуальним фізіологічним особливостям, дозволять запобігти розвитку патологічних та передпатологічних станів серцево-судинної системи в процесі занять спортом.

Література

1. Мойбенко А.А. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, А.М. Пархоменко. – Київ : Наукова думка, 2008. – 520 с.
2. Кургалюк Н.М. Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии / Н.М. Кургалюк // Успехи физиол. наук. - 2002. - Т. 33, № 4. - С. 65-79.
3. Синтез оксиду азоту у період довгострокової адаптації до інтенсивної м'язової роботи у спортсменок / Н.В. Богдановська, Г.М. Свядух, А.В. Коцюрuba [и др.] // Фізіологічний журнал. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 94-99.
4. Использование молекулярно-генетических методов для прогноза аэробных и анаэробных возможностей у спортсменов / И.И. Ахметов, Д.В.

Попов, И.В. Астратенкова, А.И. Дружевская // Физиология человека. – 2008. – Т.34, № 3. – С. 86-91.

5. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and elite endurance athlete status: the Genathlete study* / B. Wolfarth, T. Rankinen, S. Mühlbauer [e.a.] // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 2008. – Vol. 18. – P. 485-490.

6. Досенко В.Є. Роль алельного поліморфізму генів ендотеліальної нитричної синтази та протеасоми в патогенезі серцево-судинних захворювань: молекулярно-генетичні аспекти: автореф. дис. на здоб.наук.ст. доктора мед.наук / В.Є. Досенко. - Київ, 2006. - 32 с.

7. *Promoter but not exon polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction* / S. Erbs, Y. Baither, A. Linke [e.a.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2003. - Vol. 23. - P.1814-1819.

8. *Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene* / G. Ghilardi, M.L. Biondi, M. DeMonti [e.a.] // *Clin. Chem.* - 2002. - Vol. 48, № 7. - P. 989-993.

9. *Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study* / I. Cruz-González, E. Corral, M. Sánchez-Ledesma [e.a.] // *BMC Cardiovascular Disorders.* - 2009. - P. 9-35.

10. *Can we identify a power-oriented polygenic profile?* / J. R. Ruiz, D. Arteta, A. Buxens [e.a.] [Електронний ресурс] // *J. Appl. Physiol.* - 2009. –Режим доступу: <http://doi:10.1152/jappphysiol.01242.2009>.

11. *Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease* / N. Jeerooburkhan, L.C. Jones, S. Bujac [e.a.] // *Hypertension.* - 2001. - Vol. 38. - P.1054-1061.

12. *The -786 T/C polymorphism of the NOS3 gene is associated with elite performance in power sports* / F. Gómez-Gallego, J.R. Ruiz, A. Buxens [e.a.] // *Eur. J. Appl. Physiol.* - 2009. – Vol. 107, № 5. – P. 565-569.

Резюме

Дроздовська С.Б. T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізм промотора гена eNOS (ендотеліальної NO – синтази) у українських спортсменів.

З метою пошуку молекулярно-генетичних маркерів спадкової схильності до занять різними видами спорту вивчався розподіл алельних варіантів T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізму промотора гена eNOS. З використанням методу полімеразної ланцюгової реакції досліджено ДНК 516 осіб, з них 195 спортсменів, різних видів спорту та 321 осіб, які не мали стажу регулярних занять спортом. Вивчені відмінності у розподілі генотипів та алелей за T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізмом промотора гена eNOS в групах спортсменів, що спеціалізуються у видах спорту з різним характером енергозабезпечення м'язової роботи та у осіб, які не мають регулярного стажу занять спортом. Встановлено, що T алель T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізму промотора гена eNOS асоційована зі схильністю до занять швидко-силовими видами спорту та видів спорту, що потребують поєднаного розвитку сили та

витривалості.

Ключові слова. поліморфізм генів, ендотеліальна NO-синтаза, спорт, спортивний добір, молекулярно-генетичні маркери

Резюме

Дроздовська С.Б. T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізм промотора гена eNOS (ендотеліальної NO – синтази) в українських спортсменів.

С целью поиска молекулярно-генетических маркеров наследственной предрасположенности к занятиям различными видами спорта изучалось распределение алельных вариантов T⁻⁷⁸⁶→C полиморфизма промотора гена eNOS. С использованием метода полимеразной цепной реакции исследовано ДНК 516 человек, из них 195 спортсменов, разных видов спорта и 321 лицо, не имевшее стажа регулярных занятий спортом. Изучены различия в распределении генотипов и аллелей по T⁻⁷⁸⁶→C полиморфизму промотора гена eNOS в группах спортсменов, специализирующихся в видах спорта с разным характером энергообеспечения мышечной работы и у лиц, не имеющих регулярно стажа занятий спортом. Установлено, что T алель T⁻⁷⁸⁶→C полиморфизма промотора гена eNOS ассоциирована с предрасположенностью к занятиям скоростно-силовыми видами спорта и видами спорта, требующих сочетанного развития силы и выносливости.

Ключевые слова: полиморфизм генов, эндотелиальная NO-синтаза, спорт, спортивный отбор, молекулярно-генетические маркеры.

Summary

Drozдовska S.B. T-786 → C promoter gene polymorphism of eNOS (endothelial NO - synthase) in Ukrainian athletes.

In order to find molecular genetic markers of hereditary predisposition to various sports the distribution of allelic variants of the T⁻⁷⁸⁶→C gene polymorphism of the eNOS was studied. Using the method of polymerase chain reaction DNA of 516 people, including 195 athletes of different sports and 321 individuals who had no experience of regular exercise was investigated. Distributions differences in the of genotypes and alleles of T⁻⁷⁸⁶→C gene polymorphism of the eNOS in athletes groups, specializing in sports with different energy supplying mechanisms of physical exercise in individuals who do not have regular experience of sports were researched. It was found that the T allele of T⁻⁷⁸⁶→C gene polymorphism of the eNOS promoter is associated with a predisposition to speed and power sports and sports that require the development of a combined power and endurance.

Key words: gene polymorphism, endothelial NO-synthase, sport, sports selection, molecular genetic markers.

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