

Метод SNP генотипирования как перспективное направление развития спортивной генетики

Никитина Е.А., канд. биол. наук,
Зачепило Т.Г., канд. биол. наук

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН
Санкт-Петербург, Россия*

Современный этап развития ДНК-технологий привел к использованию достижений молекулярной генетики во всех областях науки, включая спортивную. После успешной реализации многолетней международной программы «Геном человека» появилась возможность выявлять гены, тесно ассоциированные с формированием, развитием и проявлением физических качеств человека [4]. Генетические факторы наряду с эпигенетическими и средовыми играют важную роль в детерминации индивидуальных различий в проявлении физических качеств и адаптационных возможностях человека [2]. Согласно современным представлениям молекулярной генетики спорта, считается, что индивидуальные различия в степени развития тех или иных физических и психических качеств человека во многом обусловлены ДНК-полиморфизмами. В геноме человека насчитывается более 13 миллионов переменных участков, на долю которых главным образом приходится однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) [5], сегментальные дупликации, инсерции/делеции [6] и инверсии. Однонуклеотидные ДНК-полиморфизмы, SNPs (single nucleotide polymorphisms) - это однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в некоторой популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели), причём редкий аллель встречается с частотой не менее 1%. Большинство SNP являются нейтральными аллельными вариантами, но некоторые из них, несомненно, функциональны и обуславливают существование различных фенотипов.

Генетическая карта физической активности включает около 240 генов, полиморфизмы которых ассоциированы с развитием и проявлением выносливости, быстроты и силы, а также связаны со

структурой скелетных мышц, тренируемостью и ограничением физической деятельности [3].

Исходя из ассоциаций генотипов и гаплотипов с фенотипическими признаками, можно выделить 10 генетических маркеров, ассоциированных со спортивной деятельностью: *ACE I* (I аллель гена ангиотензин-превращающего фермента; преобладает в группе стайеров; является маркером выносливости), *ACE D* (D аллель гена *ACE*; преобладает в группе спринтеров; маркер быстроты и силы), *ACTN3 R* (R аллель гена альфа-актинина-3; преобладает в группе спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами спорта; маркер быстроты и силы), *ACTN3 X* (X аллель гена *ACTN3*; маркер выносливости), *ADRA2A 6.7 kb* (аллель гена альфа-2-адренорецептора; маркер выносливости), *AMPD1 C* (C34 аллель гена АМФ-дезаминазы; маркер выносливости), *PGC1A Gly* (Gly аллель гена 1-альфа-коактиватора гамма-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом; маркер выносливости), *mtDNA H* (гаплогруппа H митохондриальной ДНК; маркер выносливости), *mtDNA K* (гаплогруппа K *mtDNA*; маркер ограничения аэробной работоспособности), *mtDNA J2* (подгаплогруппа J2 *mtDNA*; маркер ограничения аэробной работоспособности) [7].

Фенотипы физической активности являются высоко полигенными [8], поэтому для создания молекулярных диагностических комплексов необходимо увеличивать объем исследований в области функциональной геномики и расширять спектр полиморфных генов, ассоциированных с физической активностью. Результаты последних исследований в области молекулярной генетики спорта значительно расширяют список генов, ассоциированных со спортивной деятельностью. Помимо отдельных аллелей, ассоциированных с предрасположенностью к спорту, необходимо выделить «связки» нескольких аллелей, или гаплогрупп, локализованных в митохондриальной ДНК или Y-хромосоме. Таким образом, к настоящему моменту существует свыше 50 генетических маркеров, сцепленных с различными фенотипами спортсменов.

Поиск полиморфных генов-кандидатов и их использование в изучении генетической предрасположенности к выполнению

различных физических нагрузок основан на знании молекулярных механизмов мышечной деятельности и предположении, что полиморфизм данного гена может повлиять на уровень метаболических процессов в организме. Значимые полиморфизмы в любых генах, вовлеченных в процессы адаптации организма к физическим нагрузкам, безусловно, могут повлиять на генетический потенциал индивида. Можно предположить, что чем больше сигнальных путей вовлечено в определенную мышечную деятельность или некоторый признак, который является важным для спорта, тем больше полиморфизмов генов определяют индивидуальные различия в степени развития фенотипа [1].

В этой связи внедрение новейших ДНК-технологий в практику спортивной науки является крайне актуальным. Основные методы SNP генотипирования представлены ниже.

1. ПДРФ (RFLP, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов). Исторически один из самых первых методов генотипирования. Суть заключается в подборе рестриктазы (фермент, расщепляющий ДНК вблизи строго характерной для него последовательности нуклеотидов), которая узнавала бы последовательность с одним аллелем и не узнавала бы с другим. В результате после амплификации, рестрикции и электрофореза на геле наблюдаются полосы разных длин, комбинации которых соответствуют различным генотипам.

2. ПДАФ (AFLP, полиморфизм длины амплификационных фрагментов). Аналогичен RFLP, но применяется для повторов и полиморфизмов типа инсерция/делеция.

3. Аллель-специфичная амплификация с детекцией результатов электрофорезом (allele-specific PCR). Объединяет в себе множество подходов, но основная идея всех методов основана на том, что полимеразы с разной эффективностью обрабатывает полностью спаренный и неспаренный нуклеотид на 3'-конце праймера. Современная аллель-специфичная ПЦР целиком базируется на Штоффель-фрагменте Taq-полимеразы (Stoffel fragment, укороченный вариант Taq-полимеразы с отсутствующей 5'->3' экзонуклеазной активностью или аналоги), который крайне чувствителен к неспаренным нуклеотидам и достаточно избирательно амплифицирует только с полностью комплементарных праймеров.

4. Аллель-специфичная амплификация с детекцией результатов амплификатором в реальном времени (allele-specific real-time PCR, K1 ARMS PCR). Преимуществом использования амплификатора в реальном времени является отсутствие этапа электрофореза и снижение вероятности контаминации, а также уменьшение времени анализа. В отличие от FLASH-детекции данный метод не ограничен наличием в составе программного обеспечения амплификаторов модулей для детекции по конечной точке (Allelic Discrimination) и подходит практически для всех моделей амплификаторов в реальном времени.

5. Аллель-специфичные зонды (allele-specific hybridization), наборы ABI TaqMan, наборы с FLASH-детекцией. Основаны на способности полимеразы разрушать встречающиеся комплементарные олигонуклеотидные зонды (5'→3' экзонуклеазная активность). Зонд содержит флуоресцентный краситель на 5'-конце и тушитель флуоресценции на 3'-конце. Полностью комплементарный зонд (один аллель) расщепляется полимеразой, краситель высвобождается и сигнал флуоресценции, соответствующий этому аллелю, растет. Дуплекс с зондом с одним неспаренным нуклеотидом (второй аллель) имеет меньшую температуру плавления и не разрушается, а отщепляется полимеразой целиком. По отношению уровней флуоресценции от обоих зондов судят о наличии в пробе одного или другого аллеля.

6. Элонгация праймера (single-base primer extension, SBE), наборы ABI SNaPShot, MassARRAY iPLEX, минисеквенирование на биочипах, Luminex 100, Perkin-Elmer FP-TDI и др. Основан на присоединении дидезоксинуклеотида, комплементарного позиции SNP, к 3'-концу праймера и последующей детекции продукта присоединения различными методами – капиллярным электрофорезом (SNaPShot), масс-спектрометрией (MassARRAY), ДНК-микрочипами и т.д.

7. Лигирование олигонуклеотидных зондов (oligonucleotide ligation assay), наборы ABI SNPlex. При проведении этих реакций специфические ДНК- или РНК- последовательности исследуют путем использования их в качестве матрицы для ковалентного связывания двух пар олигонуклеотидных зондов. ДНК-зонды для лигирования подбирают таким образом, чтобы они были полностью

комплементарны нормальному фрагменту ДНК в области локализации мутации, причем сама нуклеотидная замена должна находиться на стыке двух праймеров. Обычно в один из зондов вводят флуоресцентную метку, а другой метят биотином. После гибридизации при строго стандартных условиях синтезированные олигонуклеотидные последовательности сшивают ДНК-лигазами из термофильных микроорганизмов. Такие ферменты работают при высоких температурах и сохраняют свою активность в условиях, необходимых для проведения денатурации молекул ДНК. При наличии мутации в тестируемой молекуле ДНК на конце одного из зондов образуется сайт некомплементарного спаривания, непосредственно примыкающий к месту лигирования. Наличие терминального неспаренного основания в смежно расположенных последовательностях ДНК-зондов резко снижает скорость лигирования, и при определенных условиях проведения реакции сшивки между зондами в этом случае не происходит. Метод включает несколько последовательных циклов гибридизации, лигирования и денатурации. Начиная со второго цикла, матричной ДНК для гибридизации зондов наряду с тестируемой пробой служат также дотированные последовательности. В дальнейшем проводят электрофоретический/капиллярный анализ меченых одонитевых фрагментов ДНК.

8. Гибридизация олигонуклеотидных зондов (Hyb Probes). Основан на тримолекулярном взаимодействии ДНК и двух зондов в области нуклеотидной замены и различий в кривых плавления.

Проведение таких генетических тестов для спортсменов и лиц, занимающихся фитнесом, позволит индивидуализировать тренировочный процесс для оптимального развития двигательных качеств и повышения мышечной массы, а также поможет сохранить здоровье на протяжении спортивной карьеры.

1. Ахметов, И.И. Анализ комбинаций генетических маркеров мышечной деятельности / И.И. Ахметов [и др.] // Генетические, психофизические и педагогические технологии подготовки спортсменов : сб. науч. тр. – СПб. – 2006. – С. 95-102.

2. Ahmetov, I.I. Genes, athlete status and training. An Overview / I.I. Ahmetov, V.A. Rogozkin // Med. Sport Sci. - 2009. - V. 54. - P. 43-71.

3. Bray, M.S. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update / M.S. Bray [etc.] // *Med. Sci. Sports Exerc.* - 2009. - V. 41 (1). - P. 35-73.

4. Druzhevskaya, A.M. Application of genetic markers for prognosis of physical performance of athletes / A.M. Druzhevskaya [etc.] // *Eur. J. Hum. Genet. Suppl.1.* - 2007. - V. 15. - P. 270.

5. IHMP. International Hap Map Consortium. A haplotype map of the human genome // *Nature.* - 2005. - V. 437. - P. 1299-1320.

6. McCarroll, S.A. Common deletion polymorphisms in the human genome / S.A. McCarroll [etc.] // *Nature Genetics.* - 2006. - V. 38. - P. 86-92.

7. Rankinen, T. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update / T. Rankinen [etc.] // *Med. Sci. Sports Exerc.* - 2006. - V. 38 (11). - P. 1863-1888.

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

УДК 612.014.421

Новые технологические возможности изучения variability ритма сердца и ЭКГ в покое и при физических нагрузках

Ярмолинский В.И. канд. техн. наук, доцент
Белорусский государственный университет
Минск, Беларусь

Актуальность исследования показателей variability ритма сердца и срочной ЭКГ-диагностики подтверждается все новыми научными исследованиями, проводимыми в клинике и спортивной сфере [2-4, 8-9]. Изучение механизмов адаптации человека к сложным условиям обитания и жизнедеятельности (гипоксия, гравитационные перегрузки, невесомость, температурные перепады, глубоководные погружения, высокий радиационный фон, длительное голодание, социальная изоляция и др.), болезням, физическим нагрузкам, стрессам эмоционального происхождения, фармакологическим и информационным пробам привело к