

МОССЭ И.Б.✉, КИЛЬЧЕВСКИЙ А.В., МОРОЗИК П.М., ГОНЧАР А.Л., ЖУР К.В.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: I.Mosse@igc.by

✉ I.Mosse@igc.by, (37517) 395-51-80, (37529) 630-00-26

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА – СПОРТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Важнейшими и неотъемлемыми составляющими успешной спортивной деятельности являются физические и психологические способности человека, которые на 75–85 % обусловлены наследственными факторами [1]. Следовательно, вершин мирового спорта могут достичь только те атлеты, которые обладают комплексом как врожденных, так и приобретенных способностей. Поэтому внедрение генетического тестирования в практику подготовки спортсменов следует рассматривать как существенный резерв повышения эффективности учебно-тренировочного процесса, а также мер по охране здоровья и профилактике патологических состояний.

Длительные физические и психологические нагрузки зачастую приводят к травмам, наиболее частыми из которых являются костные переломы, и различным патологическим состояниям, в частности к нарушениям сердечно-сосудистой системы. Для подготовки спортсменов высшей квалификации затрачиваются огромные средства на динамические функциональные обследования, разработку индивидуальных медицинских мероприятий и фармакологического обеспечения. Однако методы спортивной медицины имеют преимущественно корректирующую направленность (медикаментозные и хирургические методы лечения). В то же время выявление генетических маркеров риска развития патологий позволяет проводить профилактические мероприятия для предупреждения опасных последствий физических и эмоциональных стрессов.

В связи с этим актуальным вопросом является определение генетических маркеров предрасположенности к наиболее распространенным среди спортсменов патологическим состояниям с целью их профилактики.

Материалы и методы

Молекулярно-генетический анализ выполнен методом полимеразной цепной реакции

(ПЦР). В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови испытуемых с помощью соответствующего набора реагентов (Синтол, Россия). Для оценки риска тромбогенных заболеваний проведено генетическое тестирование спортсменов по полиморфизмам 20210 G/A гена *F2* и -1691 G/A гена *F5*. Для определения риска костных переломов были отобраны полиморфизмы Cdx2, ApaI, BsmI, TaqI гена *VDR*, Sp1 гена *COL1A1* и A/G гена *COL1A2* [2]. Для выявления наиболее информативных генетических маркеров стрессоустойчивости проведено тестирование сотрудников специальных подразделений по полиморфным вариантам C939T гена *DRD2*, – C521T гена *DRD4*, C833T гена *HTR2A*, 9/10/12 гена *5-HTTVNTR* и L/S гена *5-HTTLPR*. Генотипирование осуществляли с использованием соответствующих наборов праймеров и зондов компании Applied Biosystems в соответствии с инструкцией производителя. Определение психоэмоционального состояния атлетов (определение склонности индивидов к ощущению тревожности и/или депрессивного состояния) проводили с использованием HADS-теста, опросника Маслач и опросника Бойко. Спортсмены, принявшие участие в эксперименте, прошли процедуру информированного согласия. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Microsoft Excel и программы R (<http://www.r-project.org>) для Windows с помощью дополнительных пакетов для анализа генетических данных «SNPassoc» (версия 1.9-2) и «haplo.stats» (версия 1.7.7).

Результаты и обсуждение

Разработана и апробирована молекулярно-генетическая технология выявления генетической предрасположенности спортсменов к тромбогенным заболеваниям, костным переломам и развитию психоэмоциональных стрессов.

Определение генетического риска тромбогенных патологий

Протестированы 413 спортсменов высокой квалификации различных видов спорта на наличие опасных мутаций тромбообразования (мутации 20210 G/A в гене *F2*, кодирующем 2-й фактор свертываемости, и мутации – 1691 G/A в гене *F5*, кодирующем 5-й фактор свертываемости крови). Наличие данных мутаций даже в гетерозиготном состоянии определяет высокий (в 3–8 раз выше нормы) риск инфаркта миокарда, венозных тромбозов, тромбоэмболии, ишемического инсульта и др. Частота протромбиновой мутации у представителей европейской расы составляет 2–3 %, а мутации Лейдена – от 1 до 7 % [3].

Важно отметить, что генетическая предрасположенность к вышеперечисленным заболеваниям реализуется только при наличии дополнительных факторов риска. В профессиональном спорте к таким факторам можно отнести интенсивные физические нагрузки, прием гормональных препаратов, бинтование (например, в тяжелой атлетике), сгонку веса, использование фармакологических стимуляторов, длительные перелеты и др. [4]. Таким образом, с целью предупреждения сердечно-сосудистой патологии целесообразно проводить скрининг спортсменов на носительство данных мутаций.

В результате тестирования нами была выявлена протромбиновая мутация (в гене *F2*) у 9-ти атлетов и Лейденская мутация (в гене *F5*) – у 18-ти спортсменов. Полученные сведения были переданы врачам команд для дополнительного медицинского обследования и назначения специальных препаратов (антиагрегантов) носителям данных мутаций, что позволит предотвратить опасные последствия интенсивных физических нагрузок для жизни и здоровья спортсменов.

Оценка генетической предрасположенности к костным переломам

Для определения генетического риска костных переломов исследованы частоты полиморфных вариантов генов *VDR*, *COL1A1* и *COL1A2* в двух группах спортсменов: группа № 1 с наличием костных переломов в анамнезе (29 человек) и группа № 2 без переломов (70 человек) (табл.).

Выявлены статистически значимые различия между группами в распределении аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *VDR*. Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что встречаемость аллеля *C* и генотипа *C/C* полиморфизма *ApaI*, а также аллеля *G* и генотипа *G/G* полиморфизма *BsmI* существенно выше в группе спортсменов с переломами в анамнезе, чем в группе без переломов.

Таблица. Распределение генотипов и аллелей полиморфизмов *ApaI*, *BsmI*, *TaqI* гена *VDR* в группах спортсменов с костными переломами (группа 1) и без переломов (группа 2)

SNP	Генотипы, аллели	Частота, %		χ^2	P	OR (95 % CI)
		группа 1 n=29	группа 2, n=70			
<i>VDR ApaI</i>	<i>A/A</i>	13,8	41,4	8,73	0,01	0,23 (0,07 – 0,72)
	<i>A/C</i>	48,3	41,4			1,32 (0,55 – 3,15)
	<i>C/C</i>	37,9	17,2			2,95 (1,12 – 7,82)
	<i>A</i>	37,9	62,1	9,72	0,002	0,37 (0,20 – 0,70)
	<i>C</i>	62,1	37,9			2,69 (1,43 – 5,05)
<i>VDR BsmI</i>	<i>A/A</i>	20,7	41,4	5,9	0,05	0,37 (0,13 – 1,02)
	<i>A/G</i>	51,7	47,1			1,20 (0,51 – 2,86)
	<i>G/G</i>	27,6	11,4			2,95 (0,98 – 8,85)
	<i>A</i>	46,6	65,0	5,8	0,02	0,47 (0,25 – 0,87)
	<i>G</i>	53,4	35,0			2,13 (1,14 – 3,97)
<i>VDR TaqI</i>	<i>C/C</i>	27,6	41,4	4,09	0,13	0,54 (0,21 – 1,38)
	<i>C/T</i>	41,4	44,3			0,89 (0,37 – 2,13)
	<i>T/T</i>	31,0	14,3			2,70 (0,96 – 7,59)
	<i>C</i>	48,3	63,6	3,97	0,05	0,53 (0,29 – 0,99)
	<i>T</i>	51,7	36,4			1,87 (1,01 – 3,47)

Изучение частот генотипов по полиморфизму TaqI гена *VDR* в исследуемых группах спортсменов не выявило статистически достоверных различий между группами, в то же время при сравнении частот аллелей исследуемого полиморфизма выявлена более высокая частота встречаемости варианта T в группе № 1.

При анализе распределения частот аллелей и генотипов по полиморфизмам Cdx2 гена *VDR*, Sp1 *COL1A1* и A/G гена *COL1A2* в исследуемых группах статистически значимых различий выявлено не было.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что наиболее информативными для определения риска нарушений костного метаболизма являются полиморфизмы ApaI и BsmI гена *VDR*. Выявление высокого риска костных переломов позволяет проводить профилактические мероприятия для предотвращения данной патологии.

Оценка психоэмоциональной устойчивости

Проведено генетическое тестирование 74 человек по полиморфным вариантам генов, ассоциированных с психоэмоциональной устойчивостью: генов дофаминэргической системы (*DRD2*, *DRD4*) и серотонинэргической системы (*HTR2A*, *5-HTTVNTR* и *5-HTTLPR*) [5–8]. Полученные результаты генотипирования были сопоставлены с данными психологических тестов – HADS-теста, опросника Маслач и опросника Бойко. По результатам этих тестов испытуемые были разделены на две группы: высоко стрессоустойчивые (группа 1) и менее стрессоустойчивые (группа 2). Степень устойчивости оценивали в баллах.

Анализ результатов генотипирования позволил выявить в группе № 2 по сравнению с группой № 1 статистически достоверное увеличение частот гомозиготного генотипа T/T гена *HTR2A* (OR=8,3, 95 % CI 1,2-56,7, P=0,02), а также аллеля 10 гена *5-HTTVNTR* (OR=2,8, 95 % ДИ 1,2-6,4; P=0,01).

С помощью метода логистической регрессии определили ассоциацию результатов генетического тестирования с психологическими тестами. Статистически значимая ассоциация была выявлена между результатами теста по опроснику Маслач и вариантами гена *5-HTTVNTR*. Показано, что носители гомозиготного генотипа 10/10 менее стрессоустойчивы (15,9±1,8 баллов) по сравнению с носителями

генотипов 12/12 (11,6±1,2 баллов) и 10/12 (11,0±1,3 баллов), (P=0,047).

В результате анализа ассоциации комплекса аллелей генов серотонинэргической системы *5-HTTVNTR* (аллели 9, 10, 12), *HTR2A* (аллели C и T) и *5-HTTLPR* (аллели L и S) с результатами психологических тестов установлено, что носители комбинации аллелей 10-T-S исследованных генов характеризуются более высокой склонностью к депрессии (P=0,006) по результатам HADS-теста по сравнению с носителями наиболее распространенной (референсной) комбинации 12-C-L. (рис.).

При этом стоит отметить, что для носителей аллельных комбинаций 10-C-S и 12-C-S количество набранных баллов по тесту HADS «Депрессия» статистически значимо ниже (рис.) по сравнению с референсной комбинацией (P=0,038 и P=0,03 соответственно).

Анализ ассоциации аллельных комбинаций полиморфизмов генов дофаминэргической системы (C>T гена *DRD2* и T>C гена *DRD4*) с результатами психологических тестов выявил статистически значимую более высокую предрасположенность к развитию симптомов «Неудовлетворенность собой», «Деперсонализация» и «Психосоматика» по опроснику Бойко у носителей аллеля T гена *DRD2* в комбинации с аллелем C гена *DRD4*.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что маркерами более низкой стрессоустойчивости являются: аллель T гена *HTR2A*, аллель 10 гена *5-HTTVNTR*, аллель T гена *DRD2* и аллель C гена *DRD4*. Выявление носительства неблагоприятных вариантов исследуемых генов, а также их комбинаций позволяет учитывать индивидуальные психоэмоциональные особенности при отборе начинающих спортсменов, а также для коррекции медико-биологического обеспечения элитных атлетов.

Выводы

Разработана и апробирована молекулярно-генетическая технология выявления генетической предрасположенности спортсменов к тромбогенным заболеваниям, костным переломам и психоэмоциональным стрессам. Показано, что для определения риска костных переломов наиболее информативными являются полиморфизмы ApaI и BsmI гена *VDR*, для определения стрессоустойчивости человека – полимор-

физмы C939T гена *DRD2*, C521T гена *DRD4*, C833T гена *HTR2A* и 9/10/12 гена *5-HTTVNTR*. Кроме того, были определены комбинации аллелей генов, ассоциированных с более выраженной предрасположенностью к психоэмоциональным стрессам.

С помощью разработанной технологии выявлено, что из 413 протестированных спортсменов 4,3 % являются носителями мутации Лейдена и 2,2 % – мутации гена протромбина. Полученные данные переданы врачам команд для дополнительного медицинского обследования и назначения специальных препаратов (антиагрегантов) носителям данных мутаций, что позволит предотвратить опасные последствия интенсивных физических и эмоциональных нагрузок для жизни и здоровья спортсменов.

Показано, что для определения риска ко-

стных переломов наиболее информативными являются полиморфизмы *ApaI* и *BsmI* гена *VDR*, для определения стрессоустойчивости человека – полиморфизмы C939T гена *DRD2*, C521T гена *DRD4*, C833T гена *HTR2A* и 9/10/12 гена *5-HTTVNTR*. Кроме того, установлены комбинации генов, ассоциированные с высокой предрасположенностью к психоэмоциональным стрессам.

Проведение генетического тестирования позволяет выявлять высокий риск развития различных патологий и открывает реальные возможности применения дифференцированного подхода к проведению отбора начинающих спортсменов, а также для коррекции тренировочного процесса и медико-биологического обеспечения.

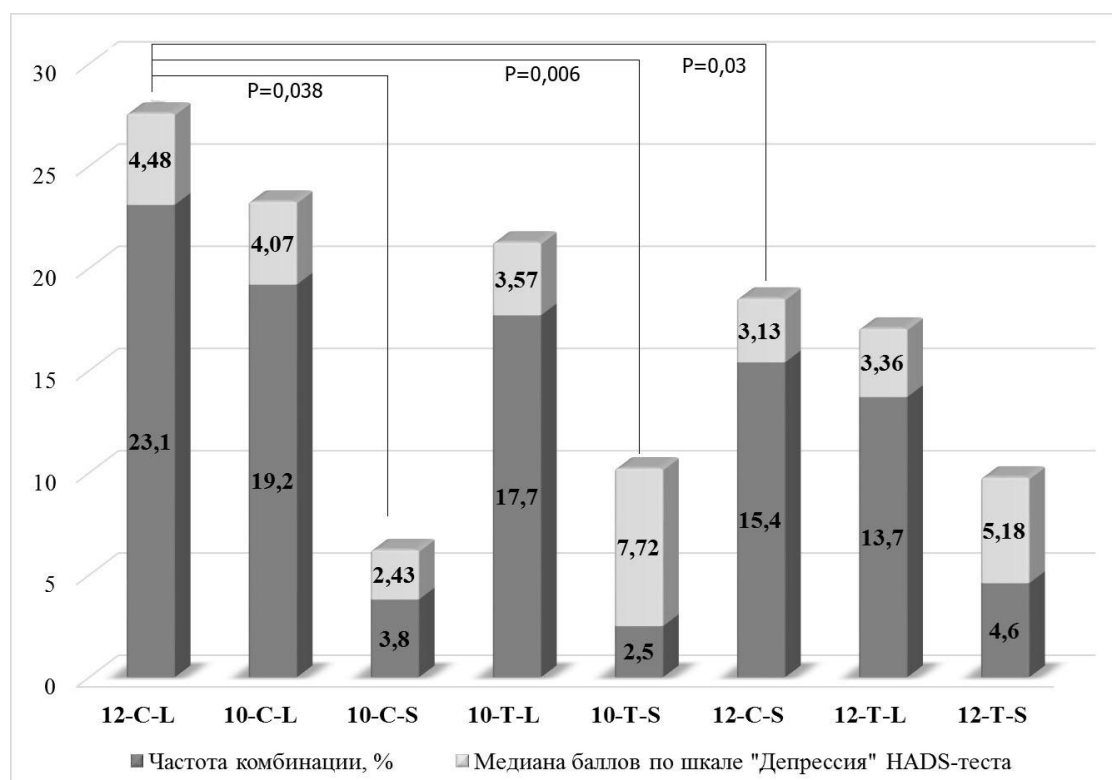


Рис. Ассоциация аллельных комбинаций полиморфных вариантов генов *5-HTTVNTR*, *HTR2A* и *5-HTTLPR* со склонностью к депрессивным состояниям, определяемым по HADS-тесту.

Литература

1. Ahmetov I.I., Williams A.G., Popov D.V., Lyubaeva E.V., Hakimullina A.M., Fedotovskaya O.N. The combined impact of metabolic gene polymorphisms on elite endurance athlete status and related phenotypes // *Hum. Genet.* – 2009. – V. 6. – P. 751–761. doi: 10.1007/s00439-009-0728-4
2. Морозик П.М., Амелянович М.Д., Жур К.В., Нестеренко Е.В., Евлев П.В., Моссэ И.Б. Анализ генетической предрасположенности к костным переломам у спортсменов // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2016. – Т. 21. – С. 81–88.

3. Калашникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Коваленко Т.Ф., Сироткина О.В., Шейдина А.М., Рилва И.В., Иллариошкин С.Н., Патрушев Л.И. Частоты мутаций в генах фактора V (FV Leiden), протромбина (G20210A) и 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (C677T) у русских // Журнал «Медицинская генетика». – 2006. – № 7. – С. 27–29.
4. Womack C.J., Nagelkirk P.R., Coughlin A.M. Exercise-induced changes in coagulation and fibrinolysis in healthy populations and patients with cardiovascular disease // *Sports Med.* – 2003. – V. 33, № 11. – P. 795–807.
5. Aluja A., Garcia L.F., Blanch A., De Lorenzo D., Fibla J. Impulsive-disinhibited personality and serotonin transporter gene polymorphisms: association study in an inmate's sample // *J Psychiatr Res.* – 2009. – V. 43, № 10. – P. 906–914. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.11.008.
6. Unschuld P.G., Ising M., Erhardt A., Lucae S., Kloiber S., Kohli M., Salyakina D., Welt T., Kern N., Lieb R., Uhr M., Binder E.B., Müller-Myhsok B., Holsboer F., Keck M.E. Polymorphisms in the serotonin receptor gene HTR2A are associated with quantitative traits in panic disorder // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* – 2007. – V. 5, № 4. – P. 424–429.
7. Lawford B.R., Young R., Noble E.P., Kann B., Ritchie T. The D2 dopamine receptor (DRD2) gene is associated with comorbid depression, anxiety and social dysfunction in untreated veterans with post-traumatic stress disorder // *Eur Psychiatry.* – 2006. – V. 21, № 3. – P. 180–185.
8. Camara E., Krämer U.M., Cunillera T., Marco-Pallarés J., Cucurell D., Nager W., Mestres-Missé A., Bauer P., Schüle R., Schöls L., Tempelmann C., Rodriguez-Fornells A., Münte T.F. The effects of COMT (Val108/158Met) and DRD4 (SNP-521) dopamine genotypes on brain activations related to valence and magnitude of rewards // *Cereb Cortex.* – 2010. – V. 20, № 8. – P. 1985–1996. doi: 10.1093/cercor/bhp263.

MOSSE I.B., KILCHEVSKY A.V., MAROZIK P.M., GONCHAR A.L., ZHUR K.V.

Institute of Genetics and Cytology at NAS of Belarus,

Belarus, 220084, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: I.Mosse@igc.by

MOLECULAR GENETICS FOR SPORTS MEDICINE

Aim. To develop and test a molecular-genetic technology for evaluation of a genetic predisposition to thrombogenic diseases, bone fractures and emotional disruptions resulting from physical and emotional loads. **Methods.** Molecular genetic analysis was carried out by PCR. Polymorphisms of *F2* and *F5* genes were analyzed to assess the risk of thrombus formation. Polymorphisms of *VDR*, *COL1A1* and *COL1A2* genes were analyzed to determine a bone fracture risk. Genetic stress resistance was identified by genes of dopaminergic system (*DRD2*, *DRD4*) and serotonergic system (*HTR2A*, *5-HTTVNTR* and *5-HTTLPR*). The HADS, Maslach and Boyko psychological tests were used. **Results.** It was revealed that 4.3 % of the tested athletes are carriers of Leiden mutation and 2.2 % – of prothrombin gene mutation. It was shown that polymorphisms ApaI and BsmI of *VDR* gene are the most informative for bone fracture risk detection. Some variants and combinations of genes were shown to be the most informative for a stress-resistance identification. **Conclusions.** The technology for risk evaluation of different pathologies resulting from physical and emotional loads has been developed and tested.

Keywords: sport, stress-resistance, bone fractures, gene polymorphisms, PCR analysis.