УДК 575.174.015.3:612.122.1:613.71

О.Н. Федотовская[1], Н.Д. Гольберг[1], С.И. Глушков[1],
С.Н. Жерегеля[1, 2], И.И. Ахметов[1]

Взаимосвязь полиморфизма гена *G6PC2* с изменением уровня глюкозы крови при физической нагрузке

[1]Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физической культуры, Санкт-Петербург
[2]Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. *Известно, что при выполнении физической нагрузки глюкоза используется в качестве энергетического субстрата в процессах анаэробного гликолиза и аэробного окисления. Многочисленными исследованиями показано, что однонуклеотидный полиморфизм гена G6PC2 (G/A, rs560887), кодирующего белок каталитической субъединицы глюкозо-6-фосфатазы 2 типа, определяет индивидуальные различия в концентрации глюкозы крови натощак (в пределах физиологической нормы). Исследована взаимосвязь полиморфного варианта гена G6PC2 (G/A) с изменением уровня глюкозы крови при выполнении физической нагрузки до отказа. В исследовании приняли участие 69 спортсменов, занимающихся лыжными гонками. Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции и последующего рестрикционного анализа. Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом после выполнения ступенчато-повышающейся нагрузки на тредбане. Установлено, что среди обследованных спортсменов G6PC2*A аллель встречается статистически значимо реже, чем у жителей России (18,1 против 25,6%; p=0,05). Показано, что носительство G6PC2*G аллеля ассоциировано с незначительно повышенной концентрацией глюкозы в крови у лыжников-гонщиков, что согласуется с литературными данными, а также с бóльшим приростом значений концентрации глюкозы крови после выполнения ступенчато-повышающейся физической нагрузки до отказа.*

Ключевые слова*: полиморфизм гена, G6PC2, глюкоза, кровь, лыжные гонки, полимеразная цепная реакция, физическая нагрузка, тредбан, энергообеспечение мышечной деятельности.*

Введение. Успешная реализация многолетней международной программы «Геном человека» оказала большое влияние на фундаментальную и прикладную медико-биологическую науку [2]. Результаты многочисленных исследований указывают на важную роль генетических факторов наряду с эпигенетическим воздействием и факторами внешней среды в детерминации индивидуальных различий в развитии и проявлении физических качеств и адаптационных возможностей человека [1, 4].

Глюкоза является основным и наиболее универсальным источником энергии для обеспечения метаболических процессов организма. Степень утилизации глюкозы мышцами зависит от эффективности процессов ее доставки к мышечным клеткам (концентрация глюкозы крови, скорость кровотока), эффективности ее транспорта через мембраны мышечных клеток (плотность и активность транспортеров глюкозы – ГЛЮТ, градиент концентрации глюкозы) и эффективности реакций метаболизма в мышечных клетках (доступность субстратов, гексокиназная реакция) [15]. Определено, что в европейской популяции от 25 до 50% разнообразия в уровне глюкозы крови определяется генетическими особенностями, а также различными эффектами ген-генных и ген-средовых взаимодействий [10].

Для определения молекулярно-генетических основ вариабельности уровня глюкозы в крови была проведена серия полногеномных исследований ассоциаций значений концентрации глюкозы с генетическими вариациями. Выявлен полиморфизм rs560887, наиболее значимо ассоциирующийся с уровнем глюкозы крови ($p=4{,}0\times10^{-7}$) [5]. Взаимосвязи данного полиморфизма с диабетом 2 типа или индексом массы тела обнаружено не было. Результаты мета-анализа подтвердили наличие ассоциации полиморфизма rs560887 с уровнем глюкозы в крови ($p=8{,}7\times10^{-218}$) [8]. При обследовании жителей России также выявлена ассоциация полиморфизма rs560887 с базальным уровнем глюкозы крови [3].

Полиморфизм rs560887 представляет собой замену нуклеотида G на A в третьем интроне гена *G6PC2* (OMIM: *608058). Ген локализован в длинном плече 2 хромосомы (2q24-q31), состоит из 5 экзонов и 4 интронов. Показано, что чем больше G аллелей в генотипе (AG и GG генотипы), тем больше концентрация глюкозы в крови [5, 16]. Мыши, нокаутированные по гену *G6pc2*, по сравнению с дикими сородичами, в возрасте 16 недель имели пониженную (на 13%) концентрацию глюкозы крови [18]. При этом у мышей отсутствовали какие-либо изменения в весе, концентрациях инсулина и глюкагона крови.

Известно, что ген *G6PC2* кодирует белок каталитической субъединицы глюкозо-6-фосфатазы 2 типа (Г6ФК2), КФ 3.1.3.93, экспрессирующийся тканеспецефично в β-клетках островков Лангерганса

поджелудочной железы [12]. Белок является частью мультикомпонентного комплекса белков в мембране, играющих важную роль в контроле метаболизма глюкозы [13]. Поступая из кровотока в β-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы посредством переносчика ГЛЮТ 2, глюкоза фосфорилируется глюкокиназой с образованием глюкозо-6-фосфата, от количества которого в β-клетках зависит интенсивность процессов синтеза и секреции инсулина [11].

$$\text{глюкоза} + \text{АТФ} \underset{\text{глюкозо-6-фосфатаза}}{\overset{\text{глюкокиназа}}{\longleftrightarrow}} \text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}.$$

Считается, что глюкокиназа в β-клетках выполняет роль сенсора к глюкозе, контролируя скорость входа глюкозы в гликолитический механизм и инициируемую глюкозо-6-фосфатом активацию секреции инсулина в кровоток. Г6ФК2 катализирует обратную реакцию гидролиза глюкозо-6-фосфата с образованием глюкозы и неорганического фосфата и также является компонентом этого сенсора. Фермент существует в виде сложного функционального комплекса с транспортерами глюкозо-6-фосфата [9], неорганического фосфата и глюкозы, которые доставляют образованный в цитозоле глюкозо-6-фосфат в просвет эндоплазматического ретикулума и возвращают продукты реакции обратно в цитозоль [14].

Гидролазная активность Г6ФК2 является антагонистом глюкокиназы и, следовательно, влияет на весь сигнальный каскад, который влечет за собой секрецию инсулина. Вызванные Г6ФК2 изменения метаболизма глюкозы в β-клетках также влияют на активность PI3-киназы, которая регулирует панкреодуоденальный гомеобокс-1 (PDX1) связываясь с геном инсулина, что влечет за собой усиление транскрипции гена инсулина [17].

Ранее нами [3] было показано, что среди квалифицированных спортсменов чаще встречаются носители *G6PC2**GG генотипа, чем в группе лиц без стажа регулярных занятий какими-либо видами спорта. Учитывая роль G/A полиморфизма гена *G6PC2* в регуляции уровня глюкозы в крови, можно предположить, что носительство определенного аллеля гена *G6PC2* может влиять на эффективность выполнения физических нагрузок.

Цель исследования. Выявить взаимосвязь полиморфизма гена *G6PC2* (G/A) с изменением уровня глюкозы крови при выполнении физической нагрузки до отказа квалифицированными лыжниками-гонщиками.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 69 спортсменов, занимающихся лыжными гонками (женщины 17,8±3,5 лет, n=23; мужчины 19,2±2,7 лет, n=46). На момент исследования 16 спортсменов являлись мастерами спорта, 33 – кандидатами в мастера спорта и 20 спортсменов имели 1 взрослый разряд.

Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты проводили из клеток буккального эпителия сорбентным методом в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению к комплекту «ДНК-сорб-А» (Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ). Анализ полиморфизма гена проводили методом полимеразной цепной реакции. Ампликоны обрабатывались эндонуклеазой рестрикции Bst4C I («СибЭнзим», Россия). Анализ длин рестрикционных фрагментов продуктов проводили путем электрофоретического разделения в 12% полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора.

Определение концентрации глюкозы проводили в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом с использованием наборов реагентов фирмы «Ольвекс-Диагностикум» (Россия). Измерения проводили натощак до и после выполнения ступенчатоповышающейся нагрузки на тредбане «Saturn» (h/p/Cosmos, Германия). Начальная нагрузка для мужчин – 6 км/ч, для женщин – 5 км/ч, длительность ступени 3 мин, шаг – увеличение угла наклона на 2,5% и скорости (мужчины – 6 км/ч, 9 км/ч, 12 км/ч; женщины – 5 км/ч, 8 км/ч, 10 км/ч). Работа выполнялась до отказа.

Статистическая обработка данных выполнена с применением компьютерной программы «GraphPad InStat». Определяли: средние значения (M), стандартную ошибку (±SEM). Значимость различий в частоте аллелей между сравниваемыми выборками определяли с использованием критерия хи-квадрат или точного теста Фишера. Сравнение групп по количественному признаку (концентрация глюкозы) проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Выявлено, что распределение частот генотипов гена *G6PC2* у лыжников-гонщиков значимо не отличаются от популяционных данных (табл.). Частота редкого *G6PC2**A аллеля составила 18,1% и не отличалась в группах женщин и мужчин (19,6 против 17,4%, p=0,88) и была значимо ниже, чем в популяции жителей России (18,1 против 25,6%, p=0,05). Полученные результаты согласуются с данными о преобладании среди спортсменов – носителей *G6PC2**GG генотипа [3].

Значения концентрации глюкозы у всех обследованных лыжников-гонщиков были в пределах физиологической нормы. Показано, что носительство *G6PC2**A аллеля ассоциируется с незначительно более низкой концентрацией глюкозы в крови натощак (GG – 4,15± 0,14 мМ, GA – 4,10±0,15 мМ, AA – 4,01±0,34 мМ; p=0,7).

Выявлена взаимосвязь генотипов G6PC2 с изменением уровня глюкозы крови в результате выполнения квалифицированными лыжниками-гонщиками физической нагрузки до отказа. Среди обследованных спортсменов – носителей генотипа *G6PC2**AA наблюдался бóльший прирост значений концентрации

Таблица

Относительное распределение генотипов и аллелей гена *G6PC2* в группе квалифицированных лыжников-гонщиков и у жителей России

Обследуемый контингент	*n*	Генотипы *G6PC2*, %				Аллель, %	
		GG	GA	AA	p_1	A	p_2
Лыжники-гонщики	69	66,7	30,4	2,9	0,14	18,1	0,05*
Жители России [3]	837	55,3	38,1	6,6	1	25,6	1

Примечание: * – различия между лыжниками-гонщиками и жителями России ($p \leq 0,05$); p_1 – при сравнении генотипов; p_2 – значение p при сравнении аллелей.

глюкозы крови (GG – 2,97±0,22 мМ, GA – 2,35±0,31 мМ, AA – 1,72±0,73 мМ; p=0,09), рисунок.

Эффективность потребления глюкозы мышцами зависит от концентрации глюкозы крови. Следствием повышения уровня глюкозы крови во время упражнений является пропорциональное увеличение потребления глюкозы мышцами [7]. При обследовании физически активных людей было выявлено значимое увеличение концентрации глюкозы крови натощак после аэробных тренировок по сравнению с уровнем до тренировок [6].

Заключение. Концентрация глюкозы крови, определяемая, в том числе, генетическими вариациями, влияет на эффективность энергообеспечения мышечной деятельности. Это подтверждается обнаруженным фактом преобладания среди обследованных лыжников-гонщиков – носителей *G6PC2**G аллеля. На основании выявленной тенденции к увеличению прироста уровня глюкозы крови после физической нагрузки с увеличением количества G аллелей в генотипе можно предположить, что носительство *G6PC2**G аллеля повышает эффективность энергообеспечения мышечной деятельности. Вместе с тем полученные результаты необходимо рассматривать как предварительные ввиду небольшой выборки обследованных спортсменов. Однако они вносят определенный вклад в разработку комплекса по оценке наследственно-обусловленных особенностей обмена веществ и генетического потенциала организма спортсмена.

Литература

1. Баранов, В.С. Экогенетика, предиктивная медицина и генетический паспорт / В.С. Баранов // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. – 2008. – № 3 (23). – С. 15.
2. Рогозкин, В.А. Гены-маркеры предрасположенности к скоростно-силовым видам спота / В.А. Рогозкин [и др.] // Теор. и практ. физ. культ. – 2005. – № 1. – С. 2–4.
3. Федотовская, О.Н. Полиморфизм гена G6PC2 у спортсменов / О.Н. Федотовская, А.В. Борисова, И.И. Ахметов // Физкульт. в профил., леч. и реабил. – 2011. – № 1–2 (36–37). – С. 5–9.
4. Ahmetov, I.I. Genes, athlete status and training – An overview / I.I. Ahmetov, V.A. Rogozkin // In: Genetics and sports, ed.: Collins M. – Med. sport sci. Basel, Karger, 2009. – Vol. 54. – P. 43–71.
5. Bouatia-Naji, N. A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels / N. Bouatia-Naji [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 320 (5879). – P. 1085–1088.
6. Boule, N.G. Effects of exercise training on glucose homeostasis: the HERITAGE Family Study / N.G. Boule [et al.] // Diabetes care. – 2005. – Vol. 28. – P. 108–114.
7. DeFronzo, R.A. Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake / R.A. DeFronzo [et al.] // J. clin. invest. – 1981. – Vol. 68. – P. 1468–1474.
8. Dupuis, J. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk / J. Dupuis [et al.] // Nat. genet. – 2010. – Vol. 42 (2). – P. 105–116.

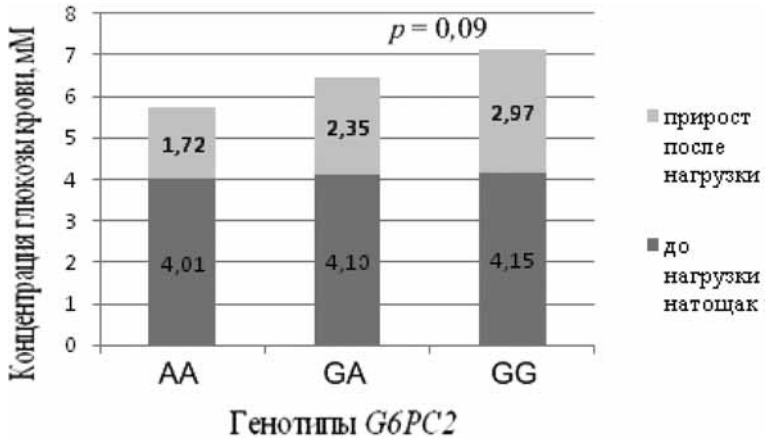

Рис. Зависимость концентрации глюкозы крови и прироста уровня глюкозы крови после выполнения физической нагрузки до отказа от генотипов *G6PC2*

9. Gerin, I. Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib / I. Gerin [et al.] // FEBS lett. – 1997. – Vol. 419. – P. 235–238.
10. Henkin, L. Genetic epidemiology of insulin resistance and visceral adiposity. The IRAS family study design and methods / L. Henkin [et al.] // Ann. epidemiol. – 2003. – Vol. 13 (4). – P. 211–217.
11. Leahy, J.L. Beta-cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia: current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion / J.L. Leahy, S. Bonner-Weir, G.C. Weir // Diabetes care. – 1992. – Vol. 15. – P. 442–455.
12. Martin, C.C. Cloning and characterization of the human and rat islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) genes / C.C. Martin [et al.] // J. biol. chem. – 2001. – Vol. 276 (27). – P. 25197–25207.
13. Matschinsky, F.M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm / F.M. Matschinsky // Diabetes. – 1996. – Vol. 45. – P. 2223–2241.
14. Mithieux, A. Novel Role for Glucose 6-Phosphatase in the Small Intestine in the Control of Glucose Homeostasis / G. Mithieux, F. Rajas, A. Gautier-Stein // J. boil. chem. – 2004. – Vol. 279 (43). – P. 44231–44234.
15. Rose, A.J. Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: How is it Regulated? / A.J. Rose, E.A. Richter // Physiology. – 2005. – Vol. 20. – P. 260–270.
16. Rose, C.S. A variant in the G6PC2/ABCB11 locus is associated with increased fasting plasma glucose, increased basal hepatic glucose production and increased insulin release after oral and intravenous glucose loads / C.S. Rose [et al.] // Diabetologia. – 2009. – Vol. 52. – P. 2122–2129.
17. Vaulont, S. Glucose regulation of gene transcription / S. Vaulont, M. Vasseur-Cognet, A. Kahn // J. biol. chem. – 2000. – Vol. 275 (41). – P. 31555–31558.
18. Wang, Y. Deletion of the gene encoding the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein autoantigen results in a mild metabolic phenotype // Y. Wang [et al.] // Diabetologia. – 2007. – Vol. 50 (4). – P. 774–778.

O.N. Fedotovskaya, N.D. Golberg, S.I. Glushkov, S.N. Jeregelya, I.I. Ahmetov

Association of *G6PC2* gene polymorphism with blood glucose level during exercise

Abstract. *It is known, that in the processes of anaerobic glycolysis and aerobic oxidation glucose is used as an energy fuel. Numerous studies have shown that G6PC2 gene polymorphism (G/A, rs560887), which encodes catalytic subunit of glucose-6-phosphatase type 2 protein, determines individual differences in the concentrations of fasting plasma glucose (within physiological limits). The purpose of this study was to identify the relationship of G/A G6PC2 gene polymorphism with changes in fasting plasma glucose levels when performing physical exercise to failure. The study involved 69 athletes (cross-country skiing). Genotyping was performed by polymerase chain reaction and subsequent restriction analysis. The concentration of glucose in blood serum were determined by enzymatic colorimetric method after step-increase load on a treadmill. The frequency of G6PC2*A allele was lower in a group of cross-country skiers comparing with Russian population (18,1 vs. 25,6%; p=0,05). It is shown that carriage of G6PC2*G allele is associated with significantly higher concentration of blood glucose of cross-country skiers, which is consistent with published data, as well as with greater increase of blood glucose concentration after a step-increase load to failure.*

Key words*: gene polymorphism, G6PC2, glucose, blood, cross-country skiing, polymerase chain reaction, physical activity, tredban, energy supply of muscular activity.*

Контактный телефон: +7 921 426-99-27; e-mail: o.fedotovska@mail.ru