

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO I SPORTU
IM. JĘDRZEJA ŚNIADECKIEGO W GDAŃSKU



Piotr Szumilo

***Zastosowanie polimorfizmów I/D genu ACE oraz R577X
genu ACTN3 jako podstawa testów genetycznych na
potrzeby sportu***

/ROZPRAWA DOKTORSKA/

Promotor

dr hab. Agnieszka Maciejewska-Skrendo,
prof. AWFis

Promotor pomocniczy

dr Piotr Żmijewski

Gdańsk 2020

Spis treści

1. Wstęp.....	4
1.1. Dobór, selekcja oraz poszukiwanie talentów	4
1.2. Metody diagnostyczne wykorzystywane w sporcie	7
1.2.1. Pomiary antropometryczne.....	8
1.2.2. Testy sprawności funkcjonalnej	10
1.2.3. Testy fizjologiczne	14
1.2.4. Testy biochemiczne	15
1.2.5. Testy genetyczne w sporcie	18
1.2.5.1. Poszukiwanie talentu sportowego – testy „direct to consumer”	22
1.2.5.2. Badania genomowe	25
1.3. Markery genetyczne wykorzystywane w sporcie	28
1.3.1. Charakterystyka genu <i>ACE</i>	28
1.3.1.1. Budowa i lokalizacja na chromosomie	28
1.3.1.2. Charakterystyka funkcjonalna genu <i>ACE</i>	30
1.3.1.3. Potencjalne znaczenie badań genu <i>ACE</i> w sporcie.....	34
1.3.2. Charakterystyka genu <i>ACTN3</i>	39
1.3.2.1. Budowa i lokalizacja na chromosomie	39
1.3.2.2. Charakterystyka funkcjonalna genu <i>ACTN3</i>	40
1.3.2.3. Potencjalna znaczenie badań wariantów genu <i>ACTN3</i> w sporcie	44
2. Metodologiczne podstawy badań.....	52
2.1. Cele badań, pytania i hipotezy badawcze	52
2.2. Materiał do badań.....	54
2.3. Stosowane techniki badań naukowych.....	56
2.3.1. Molekularne analizy genetyczne	56
2.3.1.1. Izolacja materiału genetycznego.....	56
2.3.1.2. Aplikacja technik molekularnych do detekcji polimorfizmu wybranych genów	60
2.3.1.2.1. Zasada metody reakcji PCR	60
2.3.1.2.2. Zasada metody elektroforezy kwasów nukleinowych	63
2.3.1.2.3. Zasada metody reakcji PCR w czasie rzeczywistym	64
2.3.1.2.4. Wykrywanie polimorfizmu insercyjno-delecyjnego (rs4646994) w genie <i>ACE</i>	65
2.3.1.2.5. Wykrywanie polimorfizmu R577X (rs1815739) w genie <i>ACTN3</i> ..	68

2.3.2. Analiza statystyczna wyników	70
3. Wyniki.....	72
3.1. Wyniki genotypowania polimorfizmu insercyjno-delecyjnego (rs4646994) w genie <i>ACE</i>	72
3.2. Wyniki genotypowania polimorfizmu R577X (rs1815739) w genie <i>ACTN3</i>	75
3.3. Analiza oddziaływań międzygenowych dla kombinacji genotypów I/D <i>ACE</i> oraz R577X <i>ACTN3</i>	79
4. Dyskusja.....	88
4.1. Częstość genotypu <i>ACE</i> II u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym.....	89
4.2. Częstość genotypu <i>ACTN3</i> XX u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym.....	92
4.3. Częstość genotypu <i>ACE</i> DD u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.....	95
4.4. Częstość genotypu <i>ACTN3</i> RR u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.....	98
4.5. Korelacja genotypów <i>ACE</i> I/D oraz <i>ACTN3</i> R577X u zawodników różnych dyscyplin	103
4.6. Wartość testu diagnostycznego skonstruowanego z wykorzystaniem układu dwóch polimorfizmów: I/D genu <i>ACE</i> oraz R577X genu <i>ACTN3</i>	108
Bibliografia	110
Streszczenie	139
Streszczenie w języku angielskim	142
Spis rysunków.....	145
Spis zdjęć	146
Spis tabel.....	146
Spis wykresów	146

1. Wstęp

1.1. Dobór, selekcja oraz poszukiwanie talentów

Jednym z zadań współczesnego systemu szkolenia sportowego jest rozpoznawanie jednostek utalentowanych i kierowanie ich rozwojem. W myśl zasady, iż jedynie jednostki najbardziej predysponowane są w stanie sięgać po najwyższe trofea sportowe, wiele krajów wdrożyło szeroko zakrojone programy poszukiwania sportowych talentów. Tego typu poszukiwania opierają się najczęściej na identyfikacji utalentowanych jednostek na podstawie cech fizycznych, testów motorycznych, jak i psychologicznych. Tego typu działania są prowadzone od kilku lat między innymi w Australii czy Wielkiej Brytanii (Abbott i wsp., 2005).

Zwiększenie konkurencyjności w większości profesjonalnych sportów motywuje zespoły i organizacje do identyfikowania utalentowanych sportowców od najmłodszych lat. Skuteczna identyfikacja talentów nie tylko zwiększa prawdopodobieństwo sukcesu, ale może również generować znaczne przychody finansowe. Jednakże wczesne przewidywanie przyszłych wyników pozostaje dużym wyzwaniem i rodzi ważne pytania natury etycznej. Wszakże rozwój młodego sportowca powinien być jak najbardziej wszechstronny i daleki od zbyt wczesnej specjalizacji (Jayanthi i wsp., 2015).

Jako utalentowaną możemy określić osobę, która posiada wrodzone niezwykle zdolności w pewnej dziedzinie (Pac-Pomaracki, 2008). Nie każda jednostka jest obdarzona szczególnymi uzdolnieniami, a tylko wybitne jednostki mogą zdobywać najwyższe laury. Jak rozpoznawać utalentowane jednostki i jak kwalifikować je do sportu – to częste pytanie stawiane zarówno przez praktyków, jak i teoretyków z zakresu wychowania fizycznego i sportu. Dobór do sportu wg Sozańskiego (1999) oznacza postępowanie mające na celu wyłonienie osobników w odpowiednim wieku, najbardziej utalentowanych oraz rokujących rozwój cech i właściwości niezbędnych do osiągnięcia w przyszłości wysokiego poziomu sportowego. Jest to wielopłaszczyznowe działanie mające na celu między innymi stworzenie atmosfery zainteresowania sportem, popularyzację wiedzy o różnorodnych dyscyplinach sportu, a także propagowanie uczestnictwa w sporcie. Istotne w kontekście doboru jest również określenie wstępnej przydatności do uprawiania sportu danego kandydata oraz pokierowanie go do dyscypliny, do której jest szczególnie predysponowany. Właściwe pokierowanie

jednostką już na samym początku przygody ze sportem przyczynia się do znacznego ograniczania kosztów związanych ze szkoleniem – do danej dyscypliny trafiają osoby najbardziej predysponowane, a w rezultacie może doprowadzić to do wychowania mistrza w danej dyscyplinie. W procesie doboru pod uwagę bierze się optymalny stan zdrowia, odpowiednią budowę ciała, sprawność funkcjonalną oraz inne właściwości decydujące o sukcesie w danej dyscyplinie (Sozański i Zaporozanow, 1993).

Selekcja to proces, który według teorii sportu powinien następować po procesie naboru. Jest to długotrwały proces polegający na poszukiwaniu wybitnie uzdolnionych jednostek oraz na kształtowaniu u nich tych cech i właściwości, które pozwolą im na późniejsze osiągnięcie wysokich wyników w określonej dyscyplinie sportu (Sozański i wsp., 1999). W związku z tym selekcja powinna następować po określonym czasie szkolenia i wnikliwej obserwacji.

W temacie programowania systemu szkolenia sportowego ścierają się dwa poglądy na kwestię selekcji. Część trenerów i teoretyków wychowania fizycznego uważa, iż tzw. selekcja naturalna (dokonywana poprzez spontaniczny udział w sporcie zainteresowanych) to właściwe rozwiązanie. Druga część z kolei uważa, iż kwalifikacja do sportu powinna się odbywać przy wykorzystaniu naukowo opracowanych metod i narzędzi pomiaru – jest to tzw. selekcja kierowana (Haleczko i wsp., 2010). Sozański i wsp. (1999) wymienia dodatkowo selekcję intuicyjną – prowadzoną przez nauczycieli i trenerów na podstawie doświadczeń, wiedzy i praktyki oraz znajomości danej konkurencji. Każda z tych form selekcji posiada wady, jak i zalety.

Selekcja naturalna zakłada przyjmowanie do szkolenia wszystkich zainteresowanych sportem z przywilejem dowolnej rezygnacji z powodu braku wyników czy zmiany zainteresowań. Konieczne są tutaj spore nakłady finansowe oraz zabezpieczenie kadrowe, aby realizować szkolenie w tak dużej grupie zainteresowanych sportem (Sozański i wsp., 1999).

Z kolei selekcja kierowana, zwana również kompleksową, wydaje się znacznie mniej kosztowna. Badaniu i ocenie poddawany jest tutaj stan funkcji organizmu oraz procesów psychologicznych za pomocą najróżniejszych wskaźników. Pełna ufność w wyniki tego typu badań może doprowadzić jednak do przeoczenia jednostki, która swoje predyspozycje uwidoczni znacznie później np. ze względu na późniejsze dojrzewanie. Często zdarza się bowiem, iż młodzież z danego kraju osiąga wysokie

wyniki sportowe, co nie przekłada się na późniejsze osiągnięcia w wieku seniorskim. Odbywa się to często za sprawą szybszej intensyfikacji i specjalizacji treningu czy wcześniejszego rozwoju biologicznego. Niesie to za sobą straty finansowe, ale i osobiste rozczarowania zawodników, którzy do osiągnięcia swojego maksimum potrzebują więcej czasu (Sitkowski i wsp., 2011).

Wadą selekcji intuicyjnej, realizowanej przez trenerów i nauczycieli, jest możliwy brak obiektywizmu prowadzącego – dlatego zaleca się, aby tego typu działania prowadzone były przez grono kilku trenerów czy nauczycieli (Sozański i wsp., 1999).

Szereg autorów, zarówno praktyków, jak i teoretyków wychowania fizycznego i sportu, podkreśla znaczenie cech odziedziczalnych, szczególną rolę przypisując zdolnościom motorycznym. Poziom wytrenowalności poszczególnych zdolności jest kontrolowany przez geny i zapisany w genotypie zawodnika (Haleczko i wsp., 2010). Dlatego też w początkowym procesie selekcji szczególną uwagę zwraca się na cechy silnie uwarunkowane genetycznie, słabo podatne na wpływ czynników zewnętrznych. W związku z powyższym, tematem dyskusji stała się kwestia identyfikacji talentów sportowych za pomocą testów genetycznych. Szybki rozwój genetyki stworzył oczekiwania, że testy genetyczne mogą stać się skutecznym sposobem przewidywania przyszłych wyników. Istnieje mapa markerów genetycznych, branych pod uwagę w kontekście osiągania wysokich wyników sportowych (Ahmetov i Fedotovskaya, 2012; Bray i wsp., 2009). Tego typu rozwiązania budzą jednak spore wątpliwości. Mimo to wiele komercyjnych firm oferuje testy genetyczne wysyłane bezpośrednio do klienta. Wyniki testów mogą dostarczać informacji na temat optymalizacji żywienia, ryzyka kontuzji, zdolności psychologicznych oraz potencjału w dyscyplinach wytrzymałościowych czy szybkościowo-siłowych (Vlahovich i wsp., 2017a; Vlahovich i wsp., 2017b).

Ciekawym kierunkiem badań genetycznych ukierunkowanych na identyfikację talentu sportowego wydaje się być badanie zdolności adaptacyjnych zawodników na aplikowany trening (Pickering i Kiely, 2017a). To, iż dana jednostka osiąga wysokie wyniki sportowe w wieku młodzieńczym nie oznacza, że będzie je osiągała w wieku seniorskim. Wiedza na temat tego jak dany zawodnik reaguje na określony bodziec treningowy z pewnością mogłaby wpływać na określenie jego sportowego potencjału, nazywanego talentem sportowym.

Wiedza oparta na badaniach genetycznych jest z pewnością wysoce pożądana przez sportowców, ich rodziców, trenerów oraz organizacje sportowe, jednakże na razie jej implementowanie powinno odbywać się z ostrożnością. Niniejsza praca jest próbą odpowiedzenia na pytanie, czy test genetyczny oparty na dwóch najczęściej badanych polimorfizmach genetycznych w genach *ACE* oraz *ACTN3*, jest bezpieczny i rzetelny oraz czy taki test może znaleźć zastosowanie w badaniach polskich sportowców.

1.2. Metody diagnostyczne wykorzystywane w sporcie

Istnieje znacząca różnica pomiędzy współcześnie najlepszymi sportowcami a tymi z przeszłości. Chociaż zasady i pryncypia sportu nie zmieniły się znacząco, to droga, którą trzeba pokonać, aby stać się najlepszym, jest już zupełnie inna. Od zarania dziejów sukces ewolucyjny osiągały jednostki najbardziej sprawne, potrafiące szybko zdobyć pokarm oraz nie stać się ofiarą większych drapieżników. Z biegiem czasu, wraz z rozwojem ludzkiej cywilizacji, jednostki najbardziej sprawne kwalifikowały się do rywalizacji sportowej, którą w czasach starożytnych stanowiły Igrzyska Olimpijskie. Nie obowiązywały wówczas złożone kryteria selekcji do sportu. Proces ten odbywał się w sposób naturalny, a mianowicie jednostki, które wyróżniały się, czy to poziomem siły, czy zręczności, kwalifikowane były do rywalizacji, prowadzonej niejednokrotnie na śmierć i życie.

We współczesnej rywalizacji do uprawiania sportu na najwyższym światowym poziomie dochodzą jednostki najbardziej ku temu predysponowane. Ich wyselekcjonowanie z populacji jest możliwe dzięki znacznemu rozwojowi nauki, w szczególności opracowaniu i naukowemu potwierdzeniu wszelkiego rodzaju testów diagnostycznych. Obecnie każdy z rozpoczynających swoją karierę sportowców, oprócz podstawowych badań związanych z budową ciała i najprostszych testów motorycznych, przechodzi dodatkowe testy, dzięki którym osoby odpowiedzialne za dobór i selekcję do sportu mogą jeszcze wnikliwiej określić jego potencjał sportowy.

Testy diagnostyczne, oprócz bezsprzecznej przydatności w doborze i selekcji do sportu, odgrywają również znaczącą rolę w określaniu poziomu wytrenowania sportowca, badaniu poziomu zmęczenia oraz wyznaczaniu odpowiednich parametrów treningowych, takich jak na przykład intensywność treningowa. Znajomość metod diagnostycznych oraz umiejętność ich analizy stały się niezbędnymi kompetencjami trenerów oraz nauczycieli wychowania fizycznego (Saczuk i wsp., 2001).

Według Sozańskiego (1999), do podstawowych kryteriów selekcji zaliczamy:

- stan zdrowia - określany przez lekarza sportowego na podstawie badania ogólnego, badań specjalistycznych oraz prób wysiłkowych,
- skład i budowę ciała - masa i wysokość ciała, proporcje, ruchomość w stawach oraz procent tkanki tłuszczowej,
- uzdolnienia ruchowe - rozumiane jako szybkość i łatwość uczenia się ruchów oraz umiejętność tworzenia własnych kombinacji,
- sprawność fizyczną - czyli stopień wykorzystania potencjału podstawowych zdolności motorycznych,
- dyspozycje psychiczne - ogół cech mających znaczenie w rywalizacji sportowej, takich jak ambicja, odporność psychiczna czy motywacja,
- wiek - zazwyczaj określany jako stosunek wieku kalendarzowego do wieku rozwojowego,
- wynik sportowy - a właściwie tempo przyrostu wyników sportowych.

1.2.1. Pomiary antropometryczne

Spośród powyżej wymienionych na uwagę zasługują pomiary antropometryczne. Obrazują one związek budowy anatomicznej z fizjologią organizmu. Mogą służyć zarówno do selekcji wstępnej do różnych dyscyplin sportowych, ale także jako narzędzie diagnostyczne pozwalające na bieżącą kontrolę efektów zastosowanego treningu (Zatoń i wsp., 2010). Do pomiarów antropometrycznych wykorzystuje się tzw. „punkty antropometryczne”, czyli określone miejsce na kośćcu lub ciele człowieka. Odległość pomiędzy nimi jest przedmiotem pomiarów i mówi nam między innymi o proporcjach ciała. Dzięki temu możemy scharakteryzować zawodników różnych dyscyplin sportowych oraz oceniać zmiany rozwojowe oraz adaptacje do różnego typu wysiłków (Zatoń i wsp., 2010).

Przydatnym narzędziem do określenia należnej masy ciała jest wskaźnik Queteleta, zwany również wskaźnikiem masy ciała BMI (z ang. *Body Mass Index*). Jest to iloraz masy ciała wyrażonej w kilogramach do wzrostu ciała wyrażonego w metrach.

$$\text{BMI} = \text{masa ciała [kg]} / \text{wysokość ciała [m}^2\text{]}$$

Daje on nam informację o otyłości lub nadwadze, nie daje jednak dokładnych danych o składzie ciała oraz o rozmieszczeniu tkanki tłuszczowej w dolnej i górnej części ciała (Osiński, 2003). Nie ma on także zastosowania w przypadku dzieci, kobiet w ciąży, wysoko kwalifikowanych sportowców i osób starszych.

Innymi metodami pomiaru zawartości tkanki tłuszczowej jest pomiar grubości fałdów skórno-tłuszczowych lub metoda bioelektrycznej impedancji. Pierwsza z wymienionych powyżej metod opiera się na wykorzystaniu fałdomierza. Zakłada się, że tłuszcz podskórny stanowi ok. 50 % globalnej masy tkanki tłuszczowej, stąd grubość fałdów jest istotnie skorelowana z całkowitą masą tłuszczu (Nawarycz i wsp., 1996). Pomiarowi poddane są fałdy skórno-tłuszczowe na klatce piersiowej, ramieniu, łopacie, brzuchu, udzie i łydce.

Druga ze wspomnianych metod pomiaru zawartości tkanki tłuszczowej (metoda bioimpedancji) stosowana jest za pomocą specjalistycznych, ale coraz powszechniej używanych przez trenerów, wag. Badanie wykorzystuje zdolność tkanki mięśniowej do przewodnictwa elektrycznego i polega na testowaniu oporu elektrycznego tkanek organizmu tzw. impedancji. Analiza tego typu pozwala na określenie zawartości tkanki tłuszczowej podskórnej, jak i wisceralnej. Coraz bardziej zaawansowane wagi pozwalają na określenie zawartości wody, masy mięśniowej, gęstości kości oraz tzw. „wieku metabolicznego”.

Określenie proporcji poszczególnych komponentów ludzkiego ciała pozwala na określenie morfologicznej charakterystyki zawodnika. Ponadto, pozwala to na określenie wpływu treningu na organizm, dzięki czemu możliwa jest ocena realizacji zakładanych celów treningowych (Zatoń i wsp., 2010).

Składowe masy ludzkiego ciała to:

- LBM (z ang. *lean body mass*) - beztłuszczowa masa ciała - składa się tkanki mięśniowej, narządów wewnętrznych, innych tkanek miękkich oraz układu kostnego. Zmiany w tym parametrze informują o zmianach masy mięśniowej lub zmianach w układzie kostnym np. podczas okresu rozwojowego lub okresu starzenia

- FBM (z ang. *fat body mass*) - tkanka tłuszczowa - możemy podzielić ją na tkankę tłuszczową podskórną oraz tkankę tłuszczową mięśni i narządów wewnętrznych
- TBW (z ang. *total body water*) - zawartość wody - uzależniona od zawartości tkanki tłuszczowej, płci i wieku. Ilość TBW u kobiet jest do 10% mniejsza niż u mężczyzn w tym samym wieku (Pietrobelli i Heymsfield, 2002).

Kolejnym przydatnym narzędziem w doborze i selekcji do wybranego sportu jest określenie typu budowy ciała (MacDougall i wsp., 1991). Najczęściej stosowaną na świecie jest typologia Sheldona w modyfikacji Heath i Cartera (1967). Opiera się ona na trzech podstawowych czynnikach określających somatotyp budowy, tj.: endomorfia, mezomorfia, ektomorfia, które u każdego człowieka występują w różnych proporcjach.

- Endomorfia charakteryzuje się okrągłymi kształtami ciała i względnie dużym otluszczeniem. Okrągła głowa i cylindryczna szyja oraz słabo wykształcone kończyny i przeważająca wielkością tułów to cechy wyróżniające. Endomorfik cechuje się tendencją do przyrostu tkanki tłuszczowej.
- Mezomorfia charakteryzuje się dominacją układu mięśniowo-szkieletowego. Mezomorfik to osoba o atletycznej budowie ciała z szeroką klatką piersiową i plecami oraz wąskimi biodrami. Umięśnione i masywne kończyny, płaski brzuch oraz minimalne otluszczenie ciała to cechy, które wyróżniają mezomorfików.
- Ektomorfia charakteryzuje się słabym umięśnieniem i niewielkim otluszczeniem ciała. Ponadto typowy ektomorfik posiada szczupłe biodra, spłaszczoną klatkę piersiową oraz wąskie plecy, a także długie kończyny i płaski, niekiedy wklęsły brzuch.

1.2.2. Testy sprawności funkcjonalnej

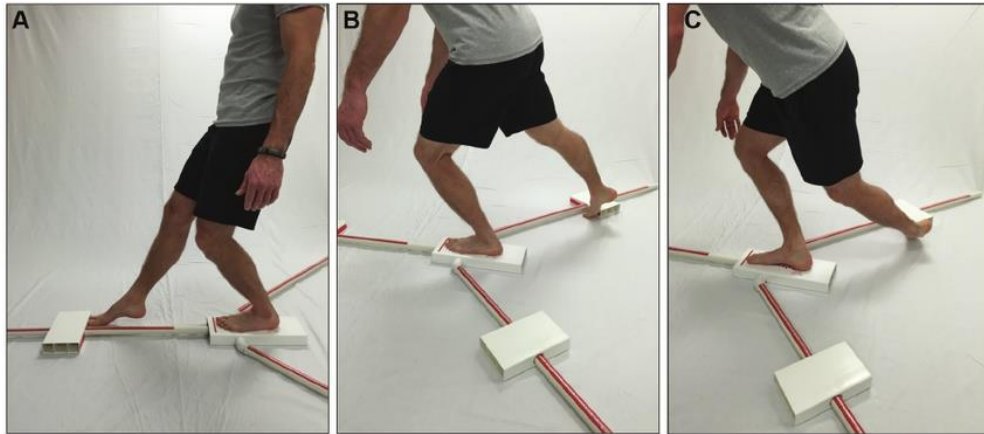
Jak wspomniano już powyżej, we współczesnej diagnostyce sportowej coraz częstsze zastosowanie mają testy sprawności funkcjonalnej. Są one niezbędnym narzędziem do badań przesiewowych, dzięki którym, możliwe jest zaplanowanie długofalowego programu treningowego dla zawodnika oraz doraźne działanie w przypadku stwierdzonych dysfunkcji.

Najpopularniejszym aktualnie stosowanym testem jest FMS (z ang. *Functional Movement Screen*), zaproponowany przez amerykańskiego fizjoterapeutę Graya Cooka (Cook i wsp., 2014). Składa się on z 7 prób (Rysunek 1), które obejmują podstawowe wzorce ruchowe, których wykonanie wymaga połączenia mobilności, stabilności oraz skoordynowanej siły zaangażowanych grup mięśniowych (Zajac i wsp., 2016). Ocena prób odbywa się za pomocą punktacji od 0 do 3. Gdy ćwiczenie jest wykonane bezbłędnie przyznaje się 3 punkty, jeżeli występuje kompensacja prawidłowego wzorca ruchowego przyznawane są 2 punkty. Gdy badany nie jest w stanie wykonać zadanej próby otrzymuje 1 punkt, natomiast, jeśli w jakimkolwiek momencie wystąpił ból nie przyznajemy punktów.



Rysunek 1. Siedem prób testu FMS (źródło: Mayer i wsp., 2015, zmodyfikowano)

Kolejnym narzędziem wykorzystywanym do oceny funkcjonalnej jest test koordynacji nerwowo mięśniowej, tzw. Y-balance test. Prawidłowe jego wykonanie wymaga skoordynowania mobilności i stabilności podczas sięgania w wyznaczonych kierunkach. Test rozpoczyna się od zmierzenia długości kończyny dolnej. Wynik to odległość zasięgu kończyny dolnej w kierunku przednim, tylnobocznym i tylnoprzysiodkowym w odniesieniu do długości kończyny (Zdjęcie 1). Porównanie wyników dla obydwu kończyn przedstawia ryzyko wystąpienia urazu (Zajac i wsp., 2016).



Zdjęcie 1. Test Y-balance (źródło: Mayer i wsp., 2015)

Innym testem, powszechnie wykorzystywanym przez trenerów do badania sportowców jest MCS (z ang. *Movement Compensation Screening*). Jest to prosta, ekonomiczna i łatwa do wprowadzenia metoda identyfikacji problemów kostno-szkieletowych, które mogą prowadzić do kontuzji. Jakość ruchu jest oceniana w tym teście w trzech wzorcach: bilateralnym, unilateralnym oraz w pozycji lądowania po zeskoku. Za każdą kompensację, bez której niemożliwe jest wykonanie danego testu, badany otrzymuje jeden punkt. Im więcej punktów tym większe ryzyko wystąpienia kontuzji. Test składa się z trzech prób, które zostały przedstawione na poniższym zdjęciu (Zdjęcie 2). Są to przysiad z rękami nad głową (z ang. *overhead squat*), przysiad na jednej nodze (z ang. *single leg squat*) oraz ustawienie ciała po zeskoku ze skrzyni.



Zdjęcie 2. Trzy próby testu MCS (źródło: Bibrowicz i wsp., 2015)

Do oceny ogólnej sprawności populacji, jak również do naboru i selekcji w sporcie, mogą służyć nam testy sprawności. Za ich pomocą możemy określić poziom rozwoju motorycznego badanego i ocenić jego „przydatność w sporcie”, a także dobrać indywidualny plan treningowy, który pozwoli na jak najlepsze wykorzystanie potencjału sportowca.

Pierwszym z nich jest Międzynarodowy Test Sprawności Fizycznej, który powstał w wyniku prób ujednolicenia metod oceny sprawności fizycznej. Początki prac nad testem sięgają Igrzysk w Tokio w 1964 roku (Osiński, 2003). Składa się on z ośmiu następujących prób: bieg na 50m - próba szybkości, skok w dal z miejsca - próba mocy, bieg wytrzymałościowy na dystansie 600, 800 lub 1000 m (w zależności od płci i wieku), pomiar dynamometryczny siły dłoni, podciąganie na drążku lub wytrzymanie w zwisie na drążku - próba siły rąk i barków, bieg wahadłowy 4 x10 m z przenoszeniem klocka - próba zwinnościowa, skłony w przód z leżenia tyłem w czasie 30s - próba siły mięśni brzucha, głębokość skłonu tułowia w przód - próba gibkości. Co istotne, nie opracowano międzynarodowych norm punktowych dla tego testu i dlatego też interpretacja uzyskanych wyników opierała się na ich przyrównaniu do norm narodowych i regionalnych (Osiński, 2003).

Kolejnymi bateriami testów, o których warto wspomnieć, są Europejski Test Sprawności Fizycznej (Eurofit) dla osób dorosłych oraz Test Sprawności Fizycznej Dzieci i Młodzieży (YMCA). Pierwszy z nich, tj. Eurofit powstał w 1988 roku i składa się z 10 prób. Oparty jest na nowoczesnej koncepcji sprawności fizycznej, gdzie wyróżnić można nie tylko elementy „powiązane z osiągnięciami”, ale i wprost "powiązane ze zdrowiem". Pierwotnie Eurofit przeznaczony był głównie dla dzieci i młodzieży w wieku szkolnym 6-18 lat (Osiński, 2003), jednak opracowano także jego modyfikacje dla osób dorosłych, która pomimo podobnej do pierwowzoru koncepcji poszczególnych testów składowych, jest lepiej dopasowana do potrzeb badania osób powyżej 20 roku życia.

Z kolei test Sprawności Fizycznej Dzieci i Młodzieży YMCA został stworzony pod koniec lat 80-tych XX wieku przez B. Dona Franksa. Nadrzędnym celem pomiaru w tym przypadku jest szeroko rozumiana promocja zdrowia oraz motywowanie do uczestnictwa w aktywności fizycznej, dążenia do satysfakcjonującego wyglądu oraz dobrego samopoczucia (Osiński, 2003).

1.2.3. Testy fizjologiczne

Wraz z rozwojem nauki z zakresu medycyny i zdrowia coraz powszechniej wykorzystywane w diagnostyce sportowej były testy określające fizjologiczną wydolność organizmu. Zastosowanie ich wiąże się z koniecznością wykorzystania specjalistycznego sprzętu oraz najczęściej pracy w warunkach laboratoryjnych.

Najpowszechniej wykorzystywanym wskaźnikiem wydolności tlenowej organizmu jest maksymalny pobór tlenu (VO_2max). Dotyczy on poboru i wykorzystania tlenu przez tkanki, a także odgrywa znaczącą rolę przy restytucji powysiłkowej (Levine, 2008). Znajomość powyższego wskaźnika pozwala dobrać odpowiednie obciążenia, bazując na reakcji fizjologicznej, a także może być wykorzystywana w szkoleniu sportowym w celu indywidualizowania obciążeń treningowych zgodnie z fizjologicznym poziomem wytrenowania organizmu (Ronikier, 2001). Dowiedziono, iż bodźce treningowe poniżej 50% VO_2max nie wpływają na poprawę stanu wytrenowania i mogą być traktowane jedynie, jako działalność rekreacyjna. W sporcie wyczynowym trening powinien opierać się zatem na wysiłkach, które przekraczają VO_2max danego zawodnika. Dobór i planowanie tych obciążeń powinno być ściśle dobrane do konkretnego zawodnika, co pozwoli na pełne rozwinięcie jego sportowego potencjału (Ronikier, 2001). Oceny VO_2max można dokonać za pomocą metod pośrednich oraz bezpośrednich. Metody pośrednie opierają się na pomiarze częstotliwości skurczów serca podczas wysiłku submaksymalnego (test Åstranda lub YMCA) i obarczone są błędem pomiarowym (około 10%). Metody bezpośrednie bazują na wysiłkach maksymalnych, dlatego też są przeznaczone głównie dla sportowców, którzy potrafią wykonać tak intensywny wysiłek. Test najczęściej odbywa się na bieżni mechanicznej, a badana osoba posiada maskę, która mierzy pochłanianie tlenu. Wysiłek kontynuowany jest do odmowy kontynuowania wysiłku (Ronikier, 2001; Zatoń i wsp., 2010). Do najczęściej wykorzystywanych testów, wykorzystywanych do oznaczenia VO_2max należą: test Åstranda na cykloergometrze, test submaksymalny Foxa, test progresywny Blake'a oraz test Coopera.

Wydolność beztlenowa informuje nas jak sprawne są mechanizmy odnawiania energii bez użycia tlenu. Możemy tu wyróżnić testy wydolności beztlenowej niekwasomlekowej jak i testy wydolności beztlenowej kwasomlekowej. Do tych pierwszych należy test Margarii (Margaria Step test), zwany również testem

schodkowym. Polega on na pokonaniu trzech stopni (schodków) w jednym kroku. Start znajduje się 6 metrów od pierwszego stopnia, a osoba testowana stawia stopę na 3, 6 i 9 stopniu. Mierzony jest czas potrzebny na pokonanie dystansu pomiędzy 3 a 9 schodkiem. Pomiaru dokonują fotokomórki lub specjalne maty mierzące nacisk. Powyższy test może służyć do kontroli efektów tylko jednej osoby, gdyż każda zmiana masy ciała będzie miała wpływ na interpretację wyników (Nedeljkovic i wsp., 2007).

Często używanym testem do oceny wydolności beztlenowej kwasomlekowej jest test Wingate. Bazuje on na pracy z maksymalną częstością obrotów na cykloergometrze. Indywidualnie dobrane obciążenie wynosi 7,5% masy ciała badanego. Test jest poprzedzony rozgrzewką, która polega na pracy na cykloergometrze przez pięć minut z obciążeniem 50W. Po rozgrzewce następuje przerwa od 3 do 5 minut (Inbar i wsp., 2015). Test polega na pracy od początku z jak największą ilością obrotów przez 30s. Badany powinien utrzymać najwyższe tempo pracy tak długo jak to możliwe. Test pozwala na ocenę zdolności fosfagenowych (moc i pojemność) oraz mocy i pojemności glikolitycznej na podstawie oceny stężenia kwasu mlekowego (Minahan i wsp., 2007).

Innym, bardziej specyficznym dla przedstawicieli gier zespołowych jest test RAST (z ang. *Running-based Anaerobic Sprint Test*). Zawodnik po zważeniu wykonuje 10 minutową rozgrzewkę, po której następuje 5 minut przerwy. Test polega na przebiegnięciu sześciu 35 metrowych odcinków przedzielonych 10 sekundową przerwą. Za pomocą fotokomórek mierzony jest czas pokonania każdego z odcinków. Na podstawie otrzymanych wartości należy wyznaczyć: największą, najmniejszą oraz średnią wartość mocy osiągniętą w teście oraz tak zwany indeks zmęczenia. Otrzymane wyniki są wskazówką dla trenera do planowania treningu dla konkretnego zawodnika (Andrade i wsp., 2015).

1.2.4. Testy biochemiczne

Poziom adaptacji organizmu na poziomie komórkowym, ale również tkankowym i narządowym, określa się za pomocą wskaźników biochemicznych. Badanie krwi pozwala określić ewentualne zaburzenia homeostazy zachodzące pod wpływem wysiłku fizycznego, jak również wielkość wykonanej pracy. Testy tego typu są powszechne już od dawna w sporcie zawodowym, będąc wykorzystywane standardowo do określenia stanu zdrowia sportowca oraz określenia stanu zmęczenia

czy gotowości do udziału w kolejnej sesji treningowej lub meczu. W zależności od badanych parametrów, do analiz możemy użyć krwi obwodowej, krwi włosniczkowej, osocza lub surowicy. Do oceny wpływu wysiłku fizycznego na organizm wykorzystuje się szereg parametrów, takich jak: kwas mlekowy, amoniak, mocznik, kwas moczowy czy kreatynina lub enzymy: kinaza kreatynowa i dehydrogenaza mleczanowa (Zatoń i wsp., 2010).

Kwas mlekowy (z ang. *lactate acide*, LA) jest jednym z podstawowych i najtrafniejszych wskaźników oceny wytrenowania organizmu. Związek pomiędzy jego produkcją a wysiłkiem fizycznym znany jest już od lat. Stężenie kwasu mlekowego w organizmie zawodnika tuż po wysiłku informuje o intensywności przemian beztlenowych, ale także o zmianie równowagi kwasowo-zasadowej wewnątrz ustroju, prowadzącej przy mocnej pracy do powstania kwasicy metabolicznej ograniczającej wydolność organizmu. Korelacja stanu zakwaszenia z funkcjami układów krążeniowego i oddechowego wykorzystana została do wyznaczania tzw. progu mleczanowego. Moment przekroczenia poziomu mleczanu powyżej 4 mmol/l we krwi Wasserman określił progiem mleczanowym. Na podstawie tego wskaźnika możemy określić poziom pracy zarówno o charakterze beztlenowym jak i wytrzymałościowym (Zatoń i wsp., 2010). Testy pozwalające określić zdolność do pracy beztlenowej to m.in. Wingate oraz RAST.

Amoniak jest związkiem toksycznym powstającym w wielu tkankach organizmu, głównie w procesach deaminacji, czyli rozkładu aminokwasów. Jak udowodniono (Nybo i wsp., 2005), powstawanie amoniaku wpływa na zjawisko lokalnego zmęczenia mięśni i zmęczenia ośrodkowego przez jego negatywne oddziaływanie na ośrodkowy układ nerwowy. Amoniak z krwi usuwany jest w wątrobie w procesie detoksykacji.

Mocznik to kolejny z metabolitów, którego monitoring jest przydatny w praktyce sportowej. Jego fizjologiczne stężenie w organizmie wynosi od 1,7 do 8,3 mol/l. Podwyższony poziom może być spowodowany wysiłkami fizycznymi, podczas których zachodzi przyspieszona degradacja aminokwasów. Badany bezpośrednio po wysiłku, może również świadczyć o zmniejszeniu przepływu krwi przez nerki i o ograniczonej filtracji kłębuszkowej. Pomiar mocznika nazajutrz po intensywnym

wysiłku dostarczają nam wiedzy na temat procesu restytucji (Hübner-Woźniak i Lutosławska, 2000).

Kwas moczowy powstaje w wyniku degradacji nukleotydów purynowych m.in. ATP. U osób trenujących obserwuje się większe stężenie kwasu moczowego we krwi niż u osób nietrenujących. 70% wydalone jest przez nerki natomiast pozostałe 30% przez przewód pokarmowy (Zatoń i wsp., 2010).

Z kolei kreatynina to bezwodnik kreatyny, występujący we krwi i moczu. Około 1-2% kreatyny jest degradowane do kreatyniny podczas jednego dnia. Wysilek fizyczny, powoduje chwilowe zwiększenie kreatyniny w surowicy w wyniku intensywnego metabolizmu kreatyny, która wykorzystywana jest do celów energetycznych. Kreatynina jest jednym z markerów pracy nerek. Wzrost jej poziomu może świadczyć o upośledzonej filtracji kłębuszkowej (Zatoń i wsp., 2010).

Kinaza kreatynowa (z ang. *creatine kinase*, CK) jest jednym z markerów uszkodzenia mięśni. Jest to enzym, który katalizuje przeniesienie wysokoenergetycznego fosforu z fosfokreatyny na ADP, w ten sposób biorąc udział w resyntezie ATP. CK znajduje się głównie w cytoplazmie mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego i mózgu. Zwiększone ilości kinazy kreatynowej we krwi pojawiają się na skutek wysiłku fizycznego. Wzrost jej poziomu odnotowywany jest do paru godzin po treningu. Spoczynkowy poziom CK u osób zdrowych wynosi <900 U/l. Aby określić rzeczywisty obraz zmian powysiłkowych CK u danego zawodnika konieczny jest regularny monitoring. Poziom spoczynkowy CK jest różny u różnych jednostek. Możemy wyróżnić zawodników o wysokich oraz niskich poziomach kinazy. Każdy z powyższych typów ma różny zakres tolerancji CK, dlatego zakresy w dwóch przypadkach będą się różnić (Hübner-Woźniak i Lutosławska, 2000). Oprócz zmienności osobniczej podczas analizy wyników należy wziąć pod uwagę wysiłki, którym zawodnicy byli poddawani podczas treningu. Jak do tej pory oznaczenie CK jest jednym z najtańszych i najpopularniejszych sposobów monitoringu zmęczenia u sportowców (Zatoń i wsp., 2010).

Dehydrogenaza mleczanowa (z ang. *lactate dehydrogenase*, LDH) to enzym, który katalizuje przekształcanie pirogronianu w kwas mlekowy w warunkach beztlenowych. Jest to enzym zbudowany z czterech podjednostek, które są dwójakiego rodzaju: M i H. Występuje w pięciu izoformach: LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5.

Stężenie dehydrogenazy mleczanowej wzrasta w wyniku uszkodzenia narządów lub tkanek. Proporcja izoenzymów jest charakterystyczna dla różnych tkanek i narządów (na przykład w mięśniu sercowym przeważa izoenzym LDH1, a w mięśniach szkieletowych LDH5), dzięki czemu, wykonując test na aktywność danych izoform we krwi, możemy określić, który z narządów uległ uszkodzeniu (Hübner-Woźniak i Lutosławska, 2000). LDH jest również markerem zawału mięśnia sercowego, chociaż współczesne badania donoszą o bardziej specyficznych wskaźnikach (Bodor, 2016).

Podsumowując, należy stwierdzić, iż diagnostyka sportowa to bardzo rozległa i wciąż rozwijająca się dziedzina wiedzy bazująca na takich naukach jak fizjologia, biochemia, fizjoterapia czy antropologia. W dzisiejszych czasach, w sporcie zawodowym na sukces zawodnika pracuje cały sztab ludzi - od trenera poprzez specjalistów od przygotowania motorycznego, fizjoterapeutów, fizjologów, biochemików, na psychologa i trenerze mentalnym kończąc. Ponadto szybko rozwijające się kolejne dziedziny wiedzy stwarzają realne możliwości wykorzystania ich potencjału w diagnostyce sportowej. Jedną z nich jest genetyka, której praktyczne wykorzystywanie staje się coraz powszechniejsze.

1.2.5. Testy genetyczne w sporcie

Dążenie do osiągnięcia coraz lepszych wyników w sporcie sprawiło, że coraz powszechniej stosowane są różnego rodzaju testy, w tym także testy genetyczne. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest między innymi bardzo dynamiczny rozwój biologii molekularnej, a co za tym idzie coraz większa dostępność testów opartych na zasobach tej nauki. Pojawienie się tego typu metod diagnostycznych niesie jednak za sobą szereg pytań i wątpliwości. Próbą rozwiązania przynajmniej części z nich jest niniejsza praca.

Genetyka jest nauką o dziedziczności. Może nam ona dostarczać informacji na poziomie fenotypu np. czy dana cecha występuje w rodzinie lub na poziomie molekularnym, poprzez identyfikację różnic w DNA odpowiedzialnych za występowanie danego fenotypu. Coraz szersze zastosowanie genetyki w zagadnieniach związanych ze sportem i aktywnością fizyczną stało się przyczyną powstania kinezygenomiki. Ten nowy termin wprowadzony w Stanach Zjednoczonych łączy w sobie kinezylogię, a więc naukę o ruchu człowieka, z genomiką, czyli nauką o genomie (Wackerhage i wsp., 2009).

Prekursorami badań w zakresie genetyki sportu i aktywności fizycznej byli Vassilis Klissouras i Paavo Komi, którzy rozpoczynali swoją pracę na początku lat siedemdziesiątych XX wieku (Komi i wsp., 1973), a także Claude Bouchard – wiodący badacz, który zaczął badania na przełomie lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych (Bouchard, 1983). Pierwszy podręcznik pt. „*Genetics of Fitness and Physical Performance*” dotyczący powyższego zagadnienia został opublikowany przez Bouchard’a i współautorów w 1997 roku (Bouchard i wsp., 1997), natomiast wiodący podręcznik w tej tematyce zatytułowany *Genetics Primer for Exercise Science and Health* został opublikowany przez Stephen’a Roth’a dopiero w 2007 roku (Roth, 2007).

Należy zdać sobie jednak sprawę, iż oprócz tego, że ta nowa metodologia molekularna niesie za sobą szereg potencjalnych możliwości, wiąże się też z wieloma zagrożeniami. Największe potencjalnie szanse związane są z bardzo wczesną możliwością diagnozy poszczególnych czynników, kluczowych ze sportowego punktu widzenia. Wiedza tego typu, oparta na rzetelnych i powtarzalnych badaniach może stanowić istotny czynnik w procesie doboru do sportu, jak i w projektowaniu samego procesu treningowego.

Badania genetyczne są wykorzystywane do analizy czynników wpływających na szeroko rozumianą sprawność ludzkiego organizmu (z ang. *performance*). Prowadzone na rodzicach i bliźniakach już kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt lat temu, tzw. testy bez rozeznania genomu wykazały, że różnice w wielu cechach związanych z aktywnością fizyczną są częściowo dziedziczne (Bouchard i wsp., 1986). Do cech takich należą między innymi: maksymalne pochłanianie tlenu, wydolność beztlenowa, maksymalna szybkość biegu, dystrybucja włókien mięśniowych, koncentracja enzymów mięśniowych, a także możliwość kształtowania niektórych z tych cech poprzez trening (Spurway i Wackerhage, 2006).

Współcześnie testy genetyczne znajdują zastosowanie w sporcie w kilku obszarach. Jednym z najczęstszych kierunków badań jest poszukiwanie talentów sportowych. Testy dostarczające informacji na temat predyspozycji sportowych mogą być stosowane przez sportowców w celu doprecyzowania ich przyszłości sportowej, a także przez rodziców, aby określić genetyczne predyspozycje ich dzieci. Kolejnym obszarem, w którym testy genetyczne mogą mieć ogromne zastosowanie jest dalsza

selekcja do sportu oraz indywidualizacja szkolenia czy diety. Zastosowanie testów genetycznych w rozwiązywaniu takich problemów na pewno ułatwiłoby pracę trenerom. Trzecim polem, na którym zastosowanie genetyki może przynieść niesamowite rezultaty, jest możliwość określenia podatności na kontuzje oraz doboru odpowiednich środków zapobiegawczych, zmniejszających prawdopodobieństwo ich pojawienia się u danego zawodnika obciążonego ryzykiem ich wystąpienia.

Oczywistym jest, że wprowadzenie tak nowoczesnego i dokładnego narzędzia diagnostycznego jak testy genetyczne niesie za sobą bardzo dużo potencjalnych korzyści. Z drugiej jednak strony, stosowanie testów genetycznych związane jest też z szeregiem zagrożeń. Wynikają one między innymi z tego, iż do tej pory kwestia takowych badań w większości krajów nie jest prawnie usankcjonowana. Czym w takim razie testy genetyczne różnią się od powszechnie stosowanych przez lata testów motorycznych i fizjologicznych? Na czym polega ich przewaga - o ile takowa istnieje?

Odnosząc się do opinii The British Association of Sport and Exercise Sciences (w skrócie BASES) (Wackerhage i wsp., 2009) oraz publikacji Wang'a (Wang i wsp., 2016) można wymienić trzy podstawowe różnice pomiędzy testami genetycznymi a tradycyjnymi.

Po pierwsze, w przeciwieństwie do testów motorycznych testy genetyczne dostarczają informacji, które nie zmieniają się z wiekiem. Genom danej osoby jest odrębny i oryginalny oraz pozostaje taki przez całe życie (istnieją wyjątki, które są tutaj nieistotne). Dzięki temu testy genetyczne można przeprowadzić tak szybko, jak tylko pojawi się DNA – nawet przed narodzinami. Jest to zasadnicza różnica w stosunku do innych testów, np. testu badającego poziom zakwaszenia, który będzie informował m.in. o zdolnościach do biegania w maratonach, a jego wynik jest zależny od wieku badanego, w którym zostanie przeprowadzony. Różnica ta jest ważna, gdyż otwiera możliwość niewłaściwego stosowania testów na płodach lub osobach niepełnoletnich. Jednym ze scenariuszy może okazać się wybieranie embrionów pod względem predyspozycji sportowych, intelektualnych czy innych. Wyniki mogłyby być również używane, aby decydować czy małe dziecko powinno rozpocząć karierę w sporcie czy jednak nie.

Pod drugie, zarówno testy genetyczne, jak i tradycyjne, mogą w późniejszym czasie wskazywać na ryzyko choroby. Skuteczność testów genetycznych w tym temacie

wyduje się być większa, choć testy motoryczne również mogą ujawnić ryzyko wystąpienia choroby lub ujawniać ryzyko szybszej śmierci. Przykładowo, siła mięśniowa jest ujemnie powiązana ze śmiertelnością (Ruiz i wsp., 2008), a niski poziom wydolności fizycznej powiązany jest z większą śmiertelnością (Blair, 1989). Najistotniejsze jest w tym przypadku jednak to, że testy genetyczne mogą czasem być źródłem informacji o danych jednostkach chorobowych zupełnie przypadkowo. Przykładem może być polimorfizm genetyczny występujący w genie *APOE*, który koduje białko istotne dla transportu lipidów. Na podstawie 2 loci można wyróżnić trzy formy polimorficzne tego genu: *APO E2*, *E3* i *E4*. Wariant *APO E4* wiąże się z ograniczonymi różnicami w profilu lipidowym, ale okazało się, że również z późno zapoczątkowaną rodzinną chorobą Alzheimera (Corder i wsp., 1993). W związku z tym osoby, które zostały poddane temu testowi, aby zbadać wariant genetyczny związany z profilem lipidowym otrzymują informację o prawdopodobieństwie zachorowania na chorobę Alzheimera. Aby poradzić sobie z ryzykiem nieoczekiwanych powiązań wyników badań genetycznych z ciężką chorobą, należałoby zadbać o obowiązkowe doradztwo genetyczne. Dzięki temu badana osoba mogłaby podjąć świadomą decyzję o kontynuowaniu lub zaniechaniu dalszych badań i ewentualnym leczeniu.

Po trzecie, testy genetyczne mają znacznie większy wpływ na życie krewnych niż inne testy. Tak jak test na obecność HIV może mieć konsekwencje w życiu rodziny, jak i partnerów seksualnych zakażonej osoby, tak testy genetyczne nigdy nie zostają bez wpływu na najbliższych. Dlatego ponownie przywołane poradnictwo jest konieczne, aby badany zrozumiał wnioski płynące z testu i ich wpływ na rodzinę.

Należy jednak uświadomić sobie fakt, że bez względu na potencjalne czy nawet realne ryzyko z tym związane, testy genetyczne są już obecne na rynku od co najmniej kilkunastu lat. Podwalinami pod tego typu metod diagnostycznych były badania prowadzone od początku lat dziewięćdziesiątych (Claude Bouchard, 1992; Claude Bouchard i Pérusse, 1992). Wtedy to właśnie rozpoczęto badania tzw. genów kandydujących, mogących mieć potencjalnie wpływ na szeroko rozumiane predyspozycje sportowe. Do chwili obecnej opisano ponad 200 tzw. genów kandydujących (Bray i wsp., 2009).

Według Ciężczyka i współautorów (2008) geny te można podzielić na cztery heterogeniczne grupy:

1. Geny kodujące białka odpowiedzialne za regulację ciśnienia krwi, czyli np. białka układu kalikerinowo-kininowego (np. *ACE*, *BDKRB2*, *NOS3*) oraz białka receptorów adrenergicznych (np. *ADRA2A*, *ADRB1*, *ADRB2* i *ADRB3*)
2. Geny kodujące czynniki związane ze strukturą włókien mięśniowych oraz regulujące rozwój i powstawanie mięśni (np. *ACTN3*, *MSTN*)
3. Geny kodujące czynniki transkrypcyjne, kontrolujące ekspresję genów dla białek enzymatycznych zaangażowanych w metabolizm energetyczny komórek (np. *PPARA*, *PPARGC1A*)
4. Geny kodujące enzymy uczestniczące w ważnych szlakach metabolicznych komórek mięśniowych związanych z uwalnianiem energii niezbędnej dla wykonywania pracy mięśniowej (np. *AMPD1*, *CK*).

1.2.5.1. Poszukiwanie talentu sportowego – testy „direct to consumer”

Wiedza dotycząca tzw. genów kandydujących dynamicznie się rozwija. W związku z tym jest też ona coraz bardziej dostępna dla sportowców, trenerów czy rodziców. Do tej pory powstało na rynku bardzo wiele firm, które oferują komercyjne badania genetyczne. Za pośrednictwem formularza on-line lub drogą e-mailową możliwe jest zamówienie zestawu, który zostanie dostarczony pocztą bezpośrednio do miejsca zamieszkania tzw. *direct to customer*. Williams i współautorzy (2016) donoszą, iż pierwsza tego typu firma pojawiła się w 2004 roku w Australii pod nazwą Genetic Technologies, oferując *ACTN3 Sports Performance TestTM*. Niedawne doniesienia (Webborn i wsp., 2015) pokazują, iż obecnie na rynku istnieje co najmniej kilkadziesiąt firm oferujących badania polimorfizmów związanych z aktywnością fizyczną lub podatnością na kontuzje. Najczęściej testowanym okazał się wariant R577X w genie *ACTN3* - badany przez 89% firm, które przedstawiły informację na temat swoich testów genetycznych na stronach internetowych (Williams i wsp., 2016). Jest to jeden z najlepiej przebadanych polimorfizmów, którego związek z wynikami sportowymi został wielokrotnie udowodniony (Clarkson i wsp., 2005a; Druzhevskaya i wsp., 2008; Eynon, Duarte, i wsp., 2009; Yang i wsp., 2003). Jednakże informacje uzyskane z analizy pojedynczego polimorfizmu typu SNP (z ang. *single nucleotide polymorphism*) są ograniczone. Dlatego też w oparciu o taką analizę nie powinny być wyciągane daleko idące wnioski odnośnie przyszłości sportowej danej osoby, a wyniki mogą być

traktowane jedynie jako ciekawostka. W związku z tym istnieje realne zagrożenie związane z nadinterpretacją tego typu wyników.

Niektóre firmy traktują dane genetyczne ostrożnie i nie rozszerzają wniosków poza opublikowane dowody naukowe. Jednak to wyważone podejście nie jest powszechnie przyjęte. Niektóre firmy nie bazując na wystarczająco mocnych dowodach naukowych wykraczają ze stwierdzeniami na temat pojedynczych markerów poza akceptowalne granice. Większość badaczy zajmujących się genetyką sportu uważa bowiem, iż spośród wielu różnych dobrze przebadanych wariantów genetycznych wskazanie jednego, najbardziej znaczącego jest niemożliwe z uwagi na niewystarczające jak do tej pory dowody naukowe (Wackerhage i wsp., 2009). Aby uzyskać wiarygodne wyniki konieczne jest zbadanie kilkunastu polimorfizmów w celu stworzenia wielowymiarowego, pełnego profilu genetycznego, dedykowanego zbadaniu określonych właściwości organizmu. Podczas gdy pokusa komercjalizacji testów niezaprzeczalnie istnieje, rozsądne i odpowiedzialne byłoby poczekać na naukowy konsensus przed wprowadzeniem testów, które mają obecnie małą skuteczność w sporcie. Poradnictwo genetyczne, dzięki któremu wnioski z testów mogłyby zostać przekazane w sposób obiektywny, wraz z ukazaniem ograniczeń w zastosowaniu testów genetycznych, należy zatem uznać za niezbędne minimum.

Niestety, wyniki przesyłane klientom bardzo rzadko są właściwie interpretowane. Co więcej, szczególnie rozczarowujące jest to, iż ponad połowa firm (54%) proponujących testy genetyczne związane ze sportem nie publikowała informacji na temat tego, jakie warianty genów analizowała (Alun G. Williams i wsp., 2016). W wyniku tego nie jest możliwa ocena przez świadomego konsumenta, bądź też przez środowisko naukowe czy przedstawiony wynik ma użyteczne zastosowanie. Jest to o tyle ważne, iż istnieją dosłownie miliony wariantów możliwych do zbadania, z których analiza każdego z osobna dostarczy nam innych wniosków. Z drugiej strony, postępowanie tego typu jest uzasadnione z komercyjnego punktu widzenia. Upublicznienie badanych przez firmy polimorfizmów mogłoby być podstawą do skopiowania badanego profilu przez firmy komercyjne, ale również mogłoby prowadzić do krytyki związanej z tym, iż naukowe dowody na temat istotnego znaczenia danego wariantu są słabe. Ponadto dynamiczny rozwój genetyki mógłby doprowadzić do tego, iż stan wiedzy na temat jakiegoś konkretnego genu jest nieaktualny, co spowodowałoby zakwestionowanie wiarygodności danego testu.

Testy genetyczne mogą być interesujące dla wielu osób. Dzięki nim sportowcy czy trenerzy mogliby lepiej poznać i zrozumieć fizyczne ograniczenia lub adaptacje treningowe. Obecnie trwają starania o to, aby uzyskane informacje można było odnieść do określonej dyscypliny, czy konkretnego planu treningowego, aby wiedzę pozyskaną w laboratorium można było zastosować w praktyce (Pickering i Kiely, 2017b). Należy zatem upatrywać możliwego zagrożenia wynikającego z komercyjnego zastosowania takich testów, których przeprowadzenie za odpowiednią opłatą jest możliwe również w Polsce.

Ostatnie lata to dążenie do nadania nowej jakości badaniom genetycznym w sporcie. Dotychczasowe analizy dotyczyły relatywnie niewielkiej liczby wariantów genetycznych i prowadzone były na małych i często heterogenicznych grupach. Wybór genu ograniczony był do grupy „genów kandydujących”, często według preferencji autora, opierającego się na małych, nieistotnych statystycznie badaniach. Jak się okazuje - to zbyt mało, by móc w tym przypadku mówić o sprawdzonych procedurach diagnostycznych. Według wielu autorów, aby przenieść badania genetyczne na wyższy poziom istnieje potrzeba obszernych badań genomu, które wykorzystywałyby wszystkie dostępne narzędzia, takich dziedzin jak genomika, epigenomika, transkryptomika. Właśnie do realizacji takich celów zostało powołane w maju 2015 roku The Athlome Project Consortium (Pitsiladis i wsp., 2016). Jest to unikalne przedsięwzięcie mające na celu połączenie sił wielu naukowców oraz ośrodków badawczych na całym świecie w celu dostarczania rzetelnych badań dotyczących szeroko rozumianej genetyki sportu. Naukowcy, w zależności od zakresu badań przynależą do grup tematycznych, m.in. Eastern Europe Population Studies, ELITE Study, GAMES Study, GENATHLETE Study, GENESIS Study, Gene SMART Study, GOINg Study, J-HAP Study, NTR Study, POWERGENE Study. Priorytetowe zadania The Athlome Project to przede wszystkim wymiana doświadczeń pomiędzy ośrodkami badawczymi, określanie nowych kierunków badań, pozyskiwanie środków na realizację wspólnych prac naukowych oraz sankcjonowanie etycznych i prawnych form wykorzystania badań genetycznych w sporcie.

1.2.5.2. Badania genomowe

MicroRNA

Chociaż badania dotyczące tzw. genów kandydujących osiągnęły największą popularność w kontekście poszukiwania talentu sportowego – nie jest to jedyna ścieżka, którą podążają naukowcy. Bardzo ciekawym zagadnieniem, uznawanym za bardzo obiecujące w kontekście badania adaptacji treningowych, jest regulacja ekspresji genów za pomocą microRNA. MicroRNA (miRNA) to krótkie, jednoniciowe cząsteczki RNA (o długości od 21 do 23 nukleotydów) odpowiedzialne za tzw. potrankrypcyjne wyciszanie genów. Łączą się one z mRNA na zasadzie komplementarności uniemożliwiając translację i powstawanie białka (Ambros, 2004). Geny kodujące microRNA, podobnie jak geny kodujące białka, podlegają epigenetycznym modyfikacjom.

W miRNA upatruje się bardzo skutecznego biomarkera, który mógłby informować o fizjologicznych adaptacjach treningowych. Wiele badań dowiodło znaczącej roli jaką odgrywa miRNA w regulacji hipertrofii tkanki mięśniowej (Hitachi i Tsuchida, 2014) oraz kardiomiocytów, mitochondrialnej biogenezie (Denham i wsp., 2014), angiogenezie układu naczyniowego (S. Wang i wsp., 2008), czy procesach metabolicznych (Poy i wsp., 2007). Bodziec treningowy wywołuje aktywację komórkową prowadzącą do stresu fizjologicznego i uszkodzenia tkanek, po których następuje naprawa i regeneracja. Badania pokazują, że liczne, specyficzne tkankowo miRNA są uwalniane do krążenia w trakcie i po wysiłku oraz odzwierciedlają ostrą odpowiedź na bodziec fizjologiczny i w związku z tym nazywane są z ang. *circulating miRNA*, czyli w skrócie c-miRNA. Co ciekawe, wzór ekspresji c-miRNA wydaje się być wrażliwy i specyficzny dla rodzaju i intensywności ćwiczeń (Margolis i wsp., 2017; Ramos i wsp., 2018). Konwencjonalne markery biochemiczne dostarczają informacji na temat stresu tkankowego czy urazu, ale dostarczają jedynie ograniczonych informacji na temat mechanizmu adaptacji na poziomie komórkowym. C-miRNA spełniają większość wymagań dotyczących dobrych biomarkerów – próbki są pobierane małoinwazyjnie i są łatwo dostępne oraz niezwykle stabilne w płynach ustrojowych.

Studia asocjacyjne całego genomu

Na początku XXI wieku pojawiły się możliwości analizy całego genomu przy użyciu mikromacierzy, których zastosowanie umożliwiło równoczesne oznaczanie dużej liczby polimorfizmów pojedynczych nukleotydów. Zainicjowało to nowe spojrzenie na badania dotyczące całego genomu (z ang. *genome-wide association studies*, GWAS). Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS) stopniowo wypierają analizę bliźniaków oraz badania genów kandydujących (z ang. *candidate gene association studies*, CGAS) (Pitsiladis i wsp., 2016).

Badania GWAS są prowadzone na bardzo dużej populacji. Pozwalają na przebadanie tysięcy SNP (z ang. *single nucleotide polymorphism*), podczas jednego eksperymentu. Jako że bardzo rzadko zdarza się, iż pojedynczy polimorfizm wpływa na daną cechę jeden do jednego, badania GWAS zazwyczaj prowadzone bez hipotez apriori, dostarczają jedynie listę podejrzanych SNP, które mogą wpływać na zaburzony fenotyp. Następnie, wybrane z nich są sprawdzane w badaniach funkcjonalnych na modelach komórkowych lub zwierzętach, aby udowodnić związek przyczynowo-skutkowy. Do tej pory jednym z najpopularniejszych kierunków wykorzystania badań GWAS jest szukanie związku danych SNP z chorobami serca, cukrzycą, chorobami autoimmunologicznymi czy zaburzeniami psychicznymi. Badanie dotyczące wariantów genetycznych wpływających na ciśnienie krwi oraz choroby układu krążenia opublikowane w „Nature” w 2011 roku obejmowało 200 000 badanych i dało świeże spojrzenie na nowe ścieżki terapeutyczne zapobiegające powyższym chorobom (Ehret i wsp., 2011). Ponadto badania z użyciem GWAS szukają genetycznego podłoża chorób autoimmunologicznych, cukrzycy czy chorób psychicznych (Tang i wsp., 2014).

Problemem przy tego typu badaniach są koszty związane z koniecznością pozyskania dużej liczby badanych osób – aby polimorfizmy wykazywały statystycznie istotną zależność należy ich szukać w populacji liczącej co najmniej kilka tysięcy. Jedną z dróg na obejście tego problemu są eksperymenty prowadzone na populacjach psich, które wykazują dużą homogeniczność. Mogą one służyć jako model dla późniejszych badań prowadzonych na gatunku ludzkim (Karlsson i wsp., 2013).

Badania epigenetyczne

Najświeższą, bardzo dynamicznie rozwijającą się dziedziną wiedzy stała się epigenetyka. Przedrostek „epi” oznacza „poza czymś, w dodatku” – oznacza to, iż ta

dziedzina wiedzy zajmuje się dziedziczeniem niezwiązanym bezpośrednio z nukleotydową sekwencją DNA. Polem zainteresowania jest tutaj ekspresja genów regulowana przez czynniki zewnętrzne, której mechanizmy mogą być dziedziczone. Pomimo, że organizm wielokomórkowy składa się z komórek o praktycznie identycznym kodzie genetycznym, to fenotypowo są one różne. Za ekspresję różnych genów w różnych komórkach odpowiadają właśnie mechanizmy epigenetyczne. Dokładniej chodzi tu o oddziaływanie na DNA i białka histonowe, których to modyfikacja chemiczna wpływa na ograniczenie lub wzmożenie ekspresji genów. Do najczęściej spotykanych mechanizmów epigenetycznych należy acetylacja, metylacja, fosforylacja czy ubikwitynacja histonów. Innym mechanizmem jest również metylacja nici DNA, która występuje u bakterii, roślin, zwierząt, w tym ssaków, a u drożdży, nicieni czy *Drosophilla melanogaster* występuje rzadko lub w ogóle (Korochkin, 2006).

Za jeden z czynników epigenetycznych wpływających na ekspresję genów uznaje się szeroko rozumiany styl życia. Współczesne badania epigenetyczne dotyczą między innymi aktywności fizycznej i jej wpływu na zapobieganie niektórym nowotworom oraz na pojawianie się chorób związanych ze starzeniem się (Rezapour i wsp., 2018; Spólnicka i wsp., 2018). Badania na szczurach dowiodły, że dzienna dawka ćwiczeń jest kluczowym czynnikiem w rozwoju zmian epigenetycznych w mięśniach szkieletowych, zapobiegającym zanikowi mięśni w późniejszym życiu (Ohsawa i wsp., 2018). W kręgu zainteresowań naukowców jest także wpływ suplementacji (Hunter i wsp., 2019) czy sposobu żywienia na poziom metylacji DNA (Sharples i wsp., 2016).

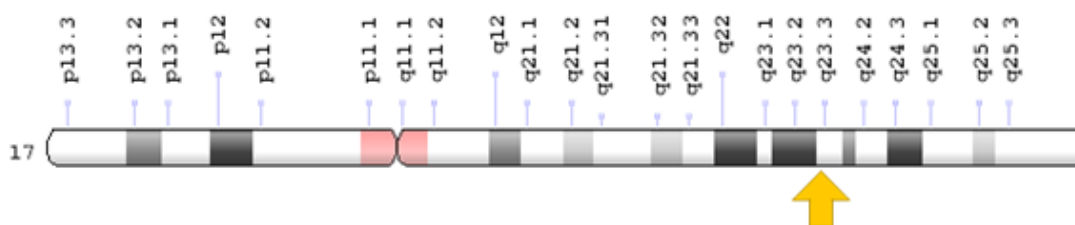
Podsumowując, należy stwierdzić, że w kontekście wykorzystania diagnostyki molekularnej wciąż wydajemy się być na początku drogi. Badania dotyczące genetycznych uwarunkowań do uprawiania sportu wydają się być szczególnie istotne w przypadku sportowców z Polski, szczególnie biorąc pod uwagę fakt coraz większej dostępności testów komercyjnych. Firm oferujących takie badania w Polsce jest już kilkadziesiąt. Jednakże nikt nie sprawdził oferowanych przez nie testów w sposób rzetelny i wyczerpujący jeśli chodzi o ich skuteczność w badaniach populacji polskiej.

1.3. Markery genetyczne wykorzystywane w sporcie

1.3.1. Charakterystyka genu *ACE*

1.3.1.1. Budowa i lokalizacja na chromosomie

Gen *ACE* ma swój locus w chromosomie 17, w pozycji 17q23.2 (Rysunek 2) (Mattei M.G., Hubert C., 1989; Rigat i wsp., 1990). Jego długość w przybliżeniu wynosi 20500 par zasad. W skład genu *ACE* wchodzi 26 egzonów i 25 intronów. Pozbawiony niekodujących intronów transkrypt mRNA genu *ACE* składa się z 4195 nukleotydów.



Rysunek 2. Lokalizacja genu *ACE* na chromosomie 17 (locus w pozycji 17q23.2) (źródło: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ACE#location>)

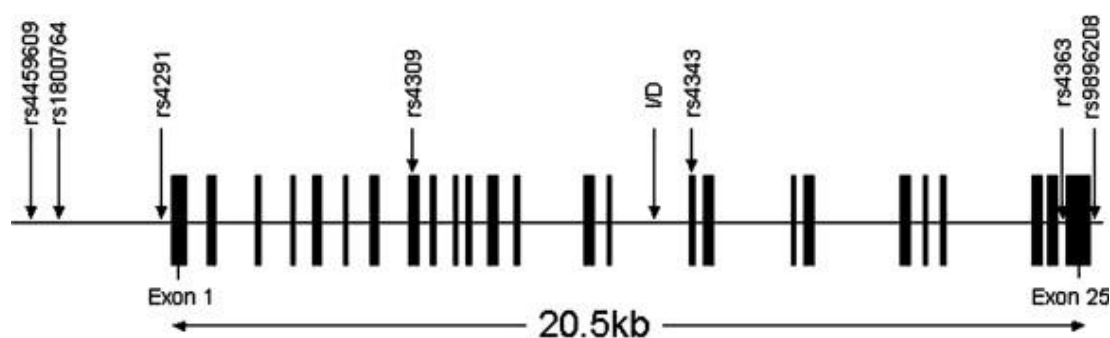
Według bazy NCBI w genie *ACE* wskazano na obecność 160 miejsc polimorficznych, w zdecydowanej większości mutacji punktowych (tzw. mutacji typu SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*), polegających na zmianie pojedynczych nukleotydów (np. G2350A, C4656T). Tylko 34 spośród wspomnianych powyżej 160 miejsc polimorficznych jest zlokalizowanych w egzonach tego genu, a 18 z nich to tzw. mutacje nonsensowne (Sayed-Tabatabaei i wsp., 2006). W przypadku ludzi odkryto dwa homologi genu *ACE*, tj. *ACE2* (Tipnis i wsp., 2000) i *ACE3* (Rella i wsp., 2007).

Gen *ACE* powstał najprawdopodobniej na bazie duplikacji (Coates i wsp., 2000). Za teorią powstania *ACE* na bazie duplikacji świadczyć może też fakt, że egzony od 4 do 11 i egzony od 17 do 24 kodują dwie homologiczne domeny molekuł *ACE*, które są bardzo podobne pod względem wielkości i struktury (Hubert i wsp., 1991).

Produkt ekspresji dla tego genu może pojawiać się w dwóch izoformach, ze względu na różny sposób odczytu genu w różnych tkankach. Pierwsza z wersji genu,

nazywana somatyczną lub śródbłonkową (tzw. *sACE*), koduje dłuższy łańcuch polipeptydowy (1306 aminokwasów). Transkrypcja *sACE* mRNA inicjowana przez promotor zlokalizowany na 5' końcu pierwszego egzonu i odbywa się poprzez transkrypcję wszystkich 26 egzonów. W dojrzałym *sACE* mRNA dochodzi do transkrypcji egzonów od 1 do 26, z wyjątkiem egzonu 13, który jest wycinany (Sayed-Tabatabaei i wsp., 2006). Druga izoforma *ACE*, nazwana jądrową lub zarodkową (tzw. *tACE* lub *gACE*), koduje produkt o krótszym łańcuchu polipeptydowym (701 aminokwasów), który jest charakterystyczny dla jąder i zarodków. Transkrypcja *tACE* mRNA inicjowana jest przez promotor złożony z 91 par zasad, który zlokalizowany jest wewnątrz genu, a dokładnie w intronie 12 (Hubert i wsp., 1991). W dojrzałym *tACE* mRNA dochodzi do transkrypcji egzonów od 13 do 23 (Howard i wsp., 1993). Dokładna rola *tACE* jest wciąż nie do końca rozpoznana. Przypuszcza się, że jej rola związana jest z reprodukcją płci męskiej (Krege i wsp., 1995).

W kontekście predyspozycji sportowych najczęściej wskazywany jest polimorfizm insercyjno-delecyjny (ID), który polega na insercji - I (obecności) lub delecji - D (braku) 287 par zasad repetytywnej sekwencji Alu w intronie 16 (Mattei i wsp., 1989; Rigat i wsp., 1990), co jest podstawą do odróżnienia allelu I oraz D (Rysunek 3).



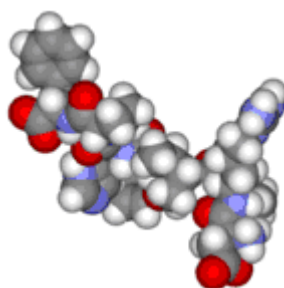
Rysunek 3. Gen *ACE*. Polimorfizm insercyjno-delecyjny (I/D) w intronie 16 (źródło: Bell i wsp., 2007)

Możliwe są zatem trzy genotypy: II, ID i DD. Osoczowa aktywność ACE jest o 60% wyższa u homozygot DD niż u homozygot II, dla heterozygot przyjmuje wartości pośrednie (Malik i wsp., 1997; Navis i wsp., 1999).

1.3.1.2. Charakterystyka funkcjonalna genu ACE

Produkt genu *ACE*, czyli enzym konwertujący nieaktywną angiotensynę I w fizjologicznie aktywną angiotensynę II (tzw. kininaza II lub konwertaza angiotensyny), jest kluczowym elementem układu renina-angiotensyna (RAS, z ang. *renin-angiotensin system*), odgrywającego istotną rolę w regulacji objętości krwi, ciśnienia tętniczego oraz funkcji sercowo-naczyniowych (Rigat i wsp., 1990; Tanriverdi i wsp., 2005). Regulacja wymienionych powyżej parametrów i funkcji za pośrednictwem enzymu ACE jest wielokierunkowa i dla przykładu, w przypadku ciśnienia krwi obejmuje ona zarówno wpływ angiotensyny II, która wywołuje silny skurcz mięśniówki drobnych naczyń krwionośnych i znacząco podnosi ciśnienie tętnicze krwi, jak również udział ACE jako kininazy II układu kalikreinowo-kininowego (KKS, z ang. *kallikrein-kinin system*), katalizującego inaktywację bradykininy – czynnika obniżającego ciśnienie krwi (Kem i Brown, 1990).

Prowadzone do tej pory badania pozwoliły na wyróżnienie dwóch rodzajów układu RAS, tzw. systemowego, zależnego głównie od aktywności nerkowego aparatu przykłębuszkowego, oraz tkankowego, który obecny jest w ośrodkowym układzie nerwowym, nerkach, sercu, śródbłonku naczyniowym i wielu innych narządach (Kremer i Weisshaar, 2016). Aktywność systemowego układu renina-angiotensyna zależna jest od wolemii i ciśnienia perfuzyjnego nerek (Rysunek 5). Zmniejszony przepływ krwi przez nerki (np. na skutek spadku ciśnienia tętniczego czy zubożenia ustroju w sód) lub aktywacja układu sympatycznego powodują pobudzenie aparatu przykłębuszkowego (Kem i Brown, 1990). Uwalniana przez ziarniste komórki ściany tętniczki doprowadzającej krew do kłębuszka nerkowego renina (zwana angiotensynazą), katalizuje zachodzącą w wątrobie przemianę białkowego angiotensynogenu (inaczej α 2-globuliny) do decapeptydu - angiotensyny I (ang-1-10). Mająca miejsce w płucach i katalizowana przez konwertazę angiotensyny (ACE) reakcja rozpadu nieaktywnej fizjologicznie angiotensyny I prowadzi z kolei do powstania angiotensyny II (ang-1-8) (Sonna i wsp., 2001, Rysunek 4). Konwertaza angiotensyny katalizuje również rozkład innych biologicznych aktywnych polipeptydów, odpowiedzialnych za rozszerzenie naczyń krwionośnych, np. bradykininy (Kem i Brown, 1990).



Rysunek 4. Model molekularny angiotensyny II (źródło: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ed/Angiotensins_I_and_II_comparison.png, zmodyfikowano)

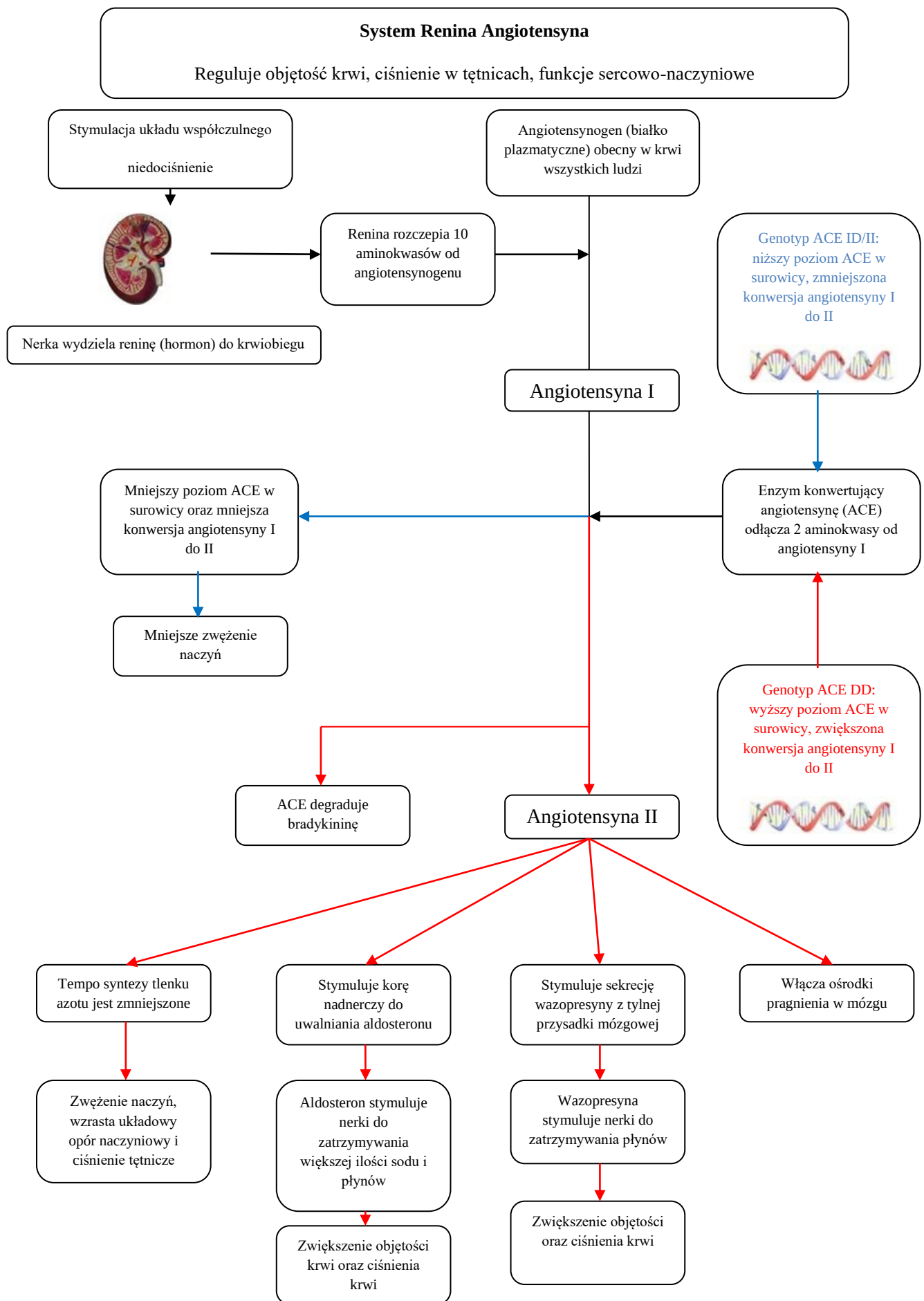
Angiotensyna II jest oktapeptydem o wielokierunkowym działaniu, powodującym między innymi silny skurcz mięśniówki drobnych naczyń krwionośnych i zwiększenie oporu naczyniowego, co w konsekwencji powoduje podniesienie ciśnienia krwi. Dzieje się to przede wszystkim za sprawą dwóch mechanizmów: stymulacji przez angiotensynę II kory nadnerczy do uwalniania aldosteronu, który jest z kolei sygnałem zwrotnym dla nerek do zwiększenia retencji sodu i płynów, a także stymulacji podwzgórza do zwiększonego uwalniania wazopresyny, mającej wpływ na rozmiary zwrotnego wchłaniania płynów z przesączu kłębkowego (moczu pierwotnego) w cewkach nerkowych (Dzau i Gibbons, 1988; Klahr i Morrissey, 2000; Schnermann i Briggs, 1999). Dodatkowo angiotensyna II powoduje zwiększenie siły skurczu i skrócenie czasu trwania skurczu mięśnia sercowego, zmniejszenie wydzielania tlenu azotu (jednego z czynników powodujących rozkurcz naczyń krwionośnych) oraz stymulację układu sympatycznego (Kem i Brown, 1990), odpowiedzialnego między innymi za zwiększone dostawy glukozy do mięśni i mózgu przez rozkład glikogenu w wątrobie, reakcję „walcz albo uciekaj”, zwiększenie skurczu mięśni gładkich, rozkurcz mięśnia „wypychacza” moczu i jednoczesny skurcz mięśnia zwieracza cewki, rozszerzenie mięśni oskrzeli w płucach (Sokołowska-Pituchowa i wsp., 2008). Warto w tym miejscu wspomnieć także o roli systemowego układu RAS, jako istotnego mechanizmu czuwającego nad homeostazą wodno-elektrolitową (ściśle związaną z regulacją ciśnienia tętniczego) i kwasowo-zasadową organizmu (Audoly i wsp., 2000; Cervenka i wsp., 1999).

W odróżnieniu od systemowego układu RAS, znacznie mniej poznana jest funkcja i regulacja tzw. tkankowych układów RAS (Dragovic i wsp., 1996). Występowanie poszczególnych ogniw układu renina-angiotensyna w nerkach, sercu, naczyniach krwionośnych czy mózgu nie budzi już żadnych wątpliwości. W oparciu

o wyniki wielu badań przyjmuje się, że działanie lokalnych (tkankowych) układów RAS ograniczone jest do komórek wytwarzających poszczególne ogniwa tego układu (tj. reniny, angiotensyny, konwertazy) lub komórek sąsiadujących (Ficek i wsp., 2002).

Poziom plazmatycznego ACE u poszczególnych osobników jest relatywnie stały, co potwierdzają pomiary dokonywane kilkakrotnie u tych samych osobników (Alhenc-Gelas i wsp., 1991). Z drugiej jednak strony pomiary poziomu plazmatycznego ACE przeprowadzone pomiędzy poszczególnymi osobnikami jednoznacznie wskazują na znaczące różnice międzyosobnicze. Powyższy fakt wskazuje na silną długoterminową kontrolę poziomu plazmatycznego ACE, mającą prawdopodobnie podłoże genetyczne. Przypuszczenia te potwierdziły badania oparte na obserwacjach poziomu ACE rodziców i ich potomstwa (Cambien i wsp., 1988). Dwa lata później Rigat i współautorzy (1990) opublikowali pracę poświęconą genetycznym uwarunkowaniom poziomu plazmatycznego ACE, w której jednoznacznie wskazali na silną współzależność pomiędzy stężeniem enzymu ACE, a polimorfizmem ID występującego w genie *ACE*.

Będący najczęstszym przedmiotem badań dotyczących predyspozycji sportowych polimorfizm insercyjno-delecyjny (ID) w genie *ACE* polega na insercji lub delecji 287 par zasad repetytywnej sekwencji Alu w intronie 16 (Rigat i wsp. 1990). Badania prowadzone przez wiele ośrodków naukowych (Malik i wsp., 1997; Navis i wsp., 1999; Rigat i wsp., 1990) potwierdzają, że obecność genotypu DD warunkuje wyższą osoczną aktywność enzymu ACE, co kojarzone jest z kolei z wysokimi wartościami ciśnienia tętniczego krwi (Rysunek 5). Wyższą aktywność osoczną ACE u homozygot DD potwierdziły także badania innych autorów (Ferrario, 1998; Ha i wsp., 2000; Sonna i wsp., 2001). W porównaniu do genotypu II genotyp DD charakteryzuje się zwiększoną o blisko 60% aktywnością enzymu ACE, zaś genotyp ID pośrednim poziomem ACE (Malik i wsp., 1997; Navis i wsp., 1999).



Rysunek 5. Rola enzymu ACE w układzie Renina-Angiotensyna (źródło: Mayne, 2006, zmodyfikowano)

1.3.1.3. Potencjalne znaczenie badań genu *ACE* w sporcie

Polimorfizm insercyjno-delecyjny genu *ACE* od początku jego odkrycia był przedmiotem wielu badań z zakresu medycyny, dotyczących między innymi jego związku z cukrzycą (Azar i wsp., 2001; Taniwaki i wsp., 2001), chorobą Alzheimera (Narain i wsp., 2000; Sleegers i wsp., 2005) i wieloma chorobami układu krążenia (Arca i wsp., 1998; Cambien, 1994; Hosoi i wsp., 1996; Raynolds i Perryman, 1995).

Potwierdzona kluczowa rola genu *ACE* dla ogólnego funkcjonowania organizmu ludzkiego skłoniła naukowców do rozpoczęcia prac mających na celu ustalenie jego potencjalnego wpływu na osiągnięcia sportowe. Warto wspomnieć, że *ACE* jest pierwszym genem badanym w kontekście predyspozycji sportowych (Myerson i wsp., 1999, Gayagay i wsp., 1998). Chociaż od pierwszych prac poświęconych związkowi genu *ACE* z predyspozycjami sportowymi minęły już ponad dwie dekady, gen ten wciąż wzbudza spore zainteresowanie badaczy.

Jak już wspomniano wcześniej, w kontekście predyspozycji sportowych najczęściej badany jest polimorfizm insercyjno-delecyjny (stąd allele I oraz D), w związku z którym wyróżnić można trzy genotypy: II, ID i DD. Prowadzone do tej pory badania potwierdziły, że obecność genotypu DD genu *ACE* warunkuje wyższą osoczną aktywność enzymu *ACE*, co jest z kolei kojarzone z wysokimi wartościami ciśnienia tętniczego krwi (Malik i wsp., 1997; Navis i wsp., 1999; Sonna i wsp., 2001). Wskazano także na silny związek genotypu DD z innymi istotnymi ze sportowego punktu widzenia cechami, np. predyspozycją do hipertrofii lewej komory serca (Iwai i wsp., 1994; Maitikuerban i wsp., 2019), hipertrofią tkanki mięśniowej (Rieder i wsp., 1999) i związanym z tym zwiększeniem siły i szybkości skurczu mięśniowego (Folland i wsp., 2000). Wnioski te potwierdzają badania z wykorzystaniem biopsji mięśniowej, wskazujące na silną korelację wysokiej proporcji włókien szybko kurczliwych typu II i IIb z genotypem DD (B. Zhang i wsp., 2003). Mając na uwadze, że u czołowych zawodników reprezentujących dyscypliny szybkościowo-siłowe odsetek włókien szybko kurczliwych II i IIb wynosi około 80%, w stosunku do 20% wykazanych u sportowców z dyscyplin wytrzymałościowych (Rattigan i wsp., 1996), przypuszczać można, że to właśnie genotyp DD w największym stopniu predysponuje do wykonywania krótkotrwałych wysiłków o wysokiej intensywności.

Dalszych bardzo cennych informacji dotyczących potencjalnego przełożenia genotypu DD na osiągnięcia sportowe w tzw. sportach szybkościowo-siłowych dostarczają także inne badania. Jednym z parametrów kojarzonych z predyspozycjami do wysiłków beztlenowych jest grubość ściany lewej komory serca. W przeprowadzonym przez Montgomery'ego i wsp. (1997) eksperymencie, polegającym na realizacji wśród wojskowych 10-tygodniowego treningu wykazano, że osoby z genotypem DD i ID uzyskiwały większy przyrost masy lewej komory serca niż osoby z genotypem II.

Folland i współautorzy (2000) przeprowadzili eksperyment polegający na realizacji 9-tygodniowego treningu siłowego mięśnia czworogłowego wśród 33 mężczyzn. We wnioskach końcowych wskazano na istotną statystycznie korelację pomiędzy allelem D a zwiększonymi przyrostami siły w odpowiedzi na prowadzony trening izometryczny. Z kolei (Giaccaglia i wsp., 2008) po realizacji 18-miesięcznego treningu kulturystycznego wśród starszych kobiet i mężczyzn stwierdzili, że objęte badaniem osoby z genotypem DD osiągały wyższe przyrosty siły mięśni prostowników kolana w porównaniu z osobami z genotypem II.

Wyższe przyrosty siły mięśniowej osób posiadających genotyp DD pod wpływem 6-tygodniowego treningu siłowego wykazał także Colakoglu i współautorzy (2005). Z kolei w przypadku badań dotyczących genotypu DD w kontekście szybkości, warto wspomnieć o pracy Cam i współautorów (2007). Realizowany przez niego eksperyment objął 55 tureckich lekkoatletek, z którymi, w okresie 6 tygodni (z częstotliwością 3 razy w tygodniu po 30 minut), realizowano trening biegowy w zakresie 70-90% HR_{max} . Uzyskane w toku tych badań rezultaty jednoznacznie wskazały na większe predyspozycje do wykonywania krótkotrwałych wysiłków o dużej intensywności u kobiet posiadających genotyp DD, w porównaniu z lekkoatletkami posiadającymi genotyp II. Z kolei zwiększone przyrosty siły dynamicznej kończyny górnej u osób z allelem D w odpowiedzi na 12-tygodniowy trening wykazał w swojej pracy Pescatello i współautorzy (2006).

Potwierdzeniem słuszności hipotezy dotyczącej związku genotypu DD z predyspozycjami do wykonywania krótkotrwałych wysiłków beztlenowych może być także szereg prac, w których przedstawiono wyniki badań światowej klasy przedstawicieli sportów szybkościowo-siłowych. Wystarczy chociażby wspomnieć

prace poświęcone pływakom (Costa i wsp., 2009a; Nazarov i wsp., 2001; Woods i wsp., 2001) oraz lekkoatletom (Myerson i wsp., 1999). W powyższych publikacjach dowiedziono, iż allel D występuje częściej w grupie sportowców rywalizujących na dystansach sprinterskich, a z kolei w grupie średniodystansowców zaznacza się przewaga allelu I.

Z drugiej strony istnieją liczne doniesienia potwierdzające związki allelu I i genotypu II z predyspozycjami do uprawiania sportów wytrzymałościowych. Potwierdzono bowiem szereg dodatnich korelacji pomiędzy genotypem II a wieloma istotnymi ze sportowego punktu widzenia cechami, chociażby takimi jak zwiększona wytrzymałość mięśniowa i efektywność kurczenia się mięśni (Williams i wsp., 2000). Doniesienia te wydają się być pośrednio potwierdzane przez wskazany w pracy Zhang'a i współautorów (2003) związek pomiędzy genotypem II a zwiększoną proporcją wolnokurczliwych włókien mięśniowych typu I. Dalszych dowodów na zwiększoną efektywność pracy mięśni szkieletowych w czasie wysiłków tlenowych u osób z allelem I dostarcza praca Zhan'a i współautorów z 2008 roku. W teście przeprowadzonym na cykloergometrze rowerowym wykazano korelację pomiędzy dłuższym czasem trwania i zwiększoną efektywnością pracy mięśni w warunkach tlenowych.

Wskaźnik $VO_2\text{max}$ obrazuje najwyższy poziom zużycia tlenu podczas maksymalnie intensywnego wysiłku. Odzwierciedla on sprawność danej osoby w kontekście wydolności tlenowej i jest uznawany za międzynarodowy standard wydolności fizycznej (Ranković i wsp., 2010). Podejrzewać można, iż jest on powiązany z genotypem *ACE*. W badaniach genomowych nie udało się jednak znaleźć powiązania pomiędzy regionem na chromosomie, w którym znajduje się gen *ACE* z $VO_2\text{max}$ (Maier-Lenz i wsp., 2000). Strategię z wykorzystaniem genów kandydujących wykorzystali inni badacze. Sonna i współautorzy (2001) oraz Jones i współautorzy (2002) wskazują na brak powiązania pomiędzy genotypem *ACE* a wskaźnikiem $VO_2\text{max}$.

Z kolei Hagberg i współautorzy (1998), wykazali związek allelu I genu *ACE* z poziomem maksymalnego pochłaniania tlenu ($VO_2\text{max}$) w grupie kobiet po menopauzie. Spośród objętych badaniami wyższy poziom $VO_2\text{max}$, ale także i lepszy rezultat w teście biegowym na 5 i 10 km, uzyskiwały kobiety z genotypem II,

kolejno przed kobietami z genotypem ID i DD. Wyniki pokazują jak płeć i wiek korelują z wpływem genów na genotyp.

Warto w tym miejscu wspomnieć także o pozostałych badaniach potwierdzających związek genotypu II genu *ACE* z innymi, istotnymi ze sportowego punktu widzenia, cechami funkcjonalnymi organizmu. Defoor i współautorzy (2006) wykazali większą poprawę wydolności tlenowej w odpowiedzi na trening pacjentów z chorobą wieńcową i genotypem II, w porównaniu do pacjentów z genotypem ID i DD. Analogiczne badania eksperymentalne ujawniły także współzależność genotypu II genu *ACE* ze zwiększoną, w odniesieniu do osób z genotypem ID i DD, potreningową poprawą parametrów pracy układu oddechowego i serca (Hagberg i wsp., 1998; Patel i wsp., 2003).

W literaturze przedmiotu natknąć można się także na prace wielu autorów świadczące o istotnej roli i znaczeniu genotypu II w sporcie, które oparte są na badaniach przeprowadzonych wśród czołowych przedstawicieli sportów wytrzymałościowych, m.in.: Gayagay i współautorzy (1998), Myerson i współautorzy (1999), Alvarez i współautorzy (2000) oraz Jones i współautorzy (2002).

Jak zatem ma się genotyp II do osiągania wysokich wyników sportowych? Już Montgomery i współautorzy (1998) pod koniec ubiegłego wieku wykazał zwiększoną zdolność do wykonywania długotrwałych wysiłków wśród rekrutów brytyjskiej armii posiadających genotyp II.

Zależność pomiędzy wynikiem sportowym a genotypem najłatwiej odnaleźć w dyscyplinach o pracy cyklicznej, gdzie nie występuje bezpośredni kontakt z przeciwnikiem i nie wpływa on na wynik rywalizacji. Taką dyscypliną jest bieganie. Wykazano istotny wzrost częstotliwości występowania allelu I w genotypie danego zawodnika wraz z rosnącym dystansem, na którym rywalizowali zawodnicy (Myerson i wsp., 1999). Do podobnych wniosków doszedł Min i współautorzy (2009) wykazując podobną zależność, ale tylko u zawodników płci męskiej. Wpływ genotypu *ACE* I/D na wynik sportowy został również opisany wśród maratończyków. Zaobserwowano większą częstotliwość występowania allelu I wśród biegaczy plasujących się na miejscach od 1 do 150 (Hruskovicova i wsp., 2006). Co ciekawe i dosyć kontrowersyjne, w populacji Kenijczyków, uznawanych za czołowych biegaczy

na średnich i długich dystansach, zależność pomiędzy genotypem *ACE ID* a statusem elitarnego biegacza nie została wykazana (Scott i wsp., 2005).

Jednym ze sportów wytrzymałościowych, znajdujących się w programie igrzysk olimpijskich jest wioślarstwo. W badaniach przeprowadzonych na grupie wybitnych wioślarzy z populacji polskiej dowiedziono związek pomiędzy obecnością allelu *I* w genotypie zawodnika a osiąganymi wynikami (Ciężczyk i wsp., 2009). Podobne wnioski uzyskano badając australijskich wioślarzy długodystansowych. Dowiedziono częstsze występowanie allelu *I* oraz genotypu *II*, który to predysponuje do bardziej ekonomicznej pracy serca (Gayagay i wsp., 1998). W opozycji stoją dane uzyskane przez Muniesa i współautorów (2010), który to wskazuje na mniejszą częstotliwość występowania genotypu *II*, na korzyść genotypu *DD* wśród przedstawicieli wioślarstwa. Jednocześnie zwracając uwagę na charakterystykę wioślarstwa, w którym siła odgrywa również znaczącą rolę, uniemożliwiając klasyfikację tego sportu jako czysto wytrzymałościowego.

Bazując na dostępnej literaturze, podobne podejście należałoby zastosować do kolarstwa. Jakby się mogło wydawać, jest ono typowym sportem wytrzymałościowym, jednakże profesjonalne kolarstwo w ostatnich latach przekształciło się w sport zorientowany na moc, przynajmniej w zakresie najbardziej determinujących faz zawodów, takich jak wspinaczki górskie i próby czasowe. Stąd też częstsze występowanie genotypu *DD* w grupie elitarnych kolarzy może mieć swoje uzasadnienie (Lucía i wsp., 2005).

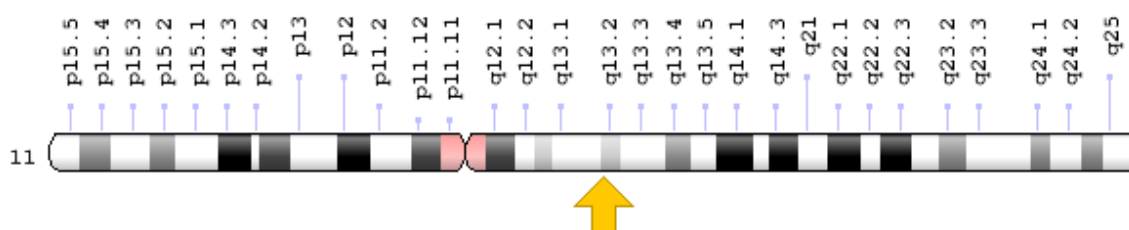
Pływanie jest sportem, w którym rywalizacja odbywa się na różnych dystansach. Możemy wyróżnić wyścigi sprinterskie, jak i typowo wytrzymałościowe. Czas wykonywanego wysiłku będzie miał wpływ na procesy bioenergetyczne zachodzące w organizmie – procesy anaerobowe lub aerobowe. Wśród badaczy nie ma jednak jednogłosego stanowiska odnośnie podziału i przyporządkowania konkurencji. Niektórzy definiują typ wysiłku na podstawie jego czasu trwania (Nazarov i wsp., 2001), inni na podstawie pokonywanego dystansu (Costa i wsp., 2009a; Tsianos i wsp., 2004; Woods i wsp., 2001). Dowiedziono zwiększoną częstotliwość występowania allelu *D* wśród pływaków na krótkich dystansach (Costa i wsp., 2009a; Woods i wsp., 2001). Niektórzy autorzy wskazują z kolei na istotne znaczenie allelu *I* w wyścigach na średnich i długich dystansach (Grenda i wsp., 2014; Tsianos i wsp., 2004; G. Wang i wsp., 2013). Jednakże tutaj badania dostarczają przeciwnych informacji. Wang

i współautorzy (2013) wskazali na związek zarówno allelu I, jak i D z wyścigami sprinterskimi, w zależności od badanej populacji.

1.3.2. Charakterystyka genu *ACTN3*

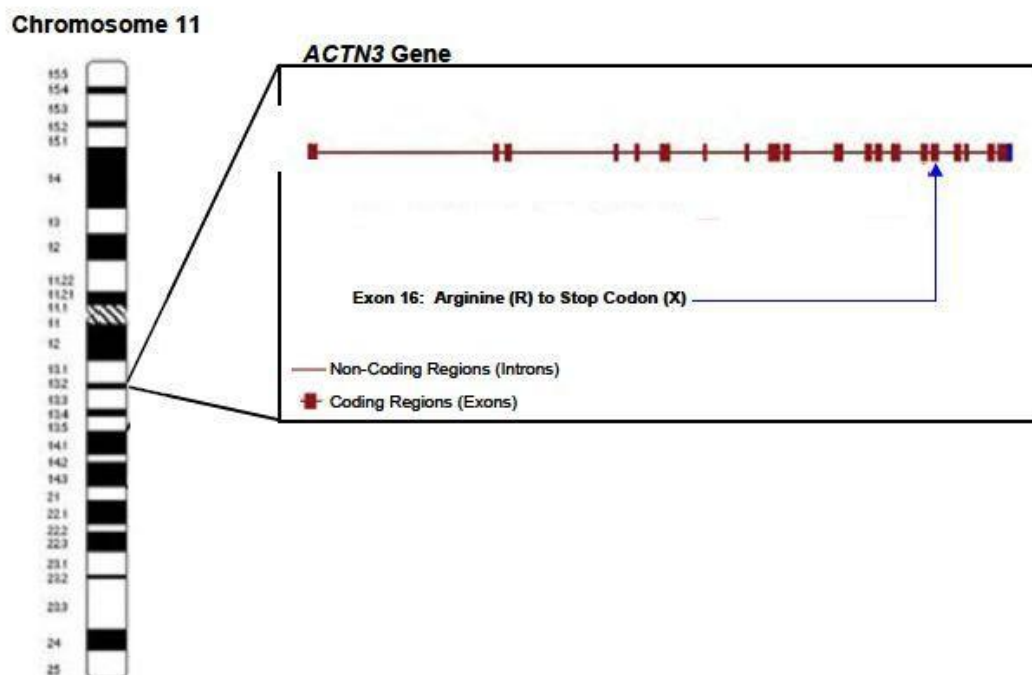
1.3.2.1. Budowa i lokalizacja na chromosomie

Gen α -aktyniny 3 (*ACTN3*) powstał na bazie duplikacji z genu wyjściowego (tzw. z ang. *ancestral sarcomeric actinin*) około 300 milionów lat temu (Lek i wsp., 2010; Yang i wsp., 2003). *ACTN3* ma swój locus na chromosomie 11, w pozycji 11q13.2 (Rysunek 6). Składa się z około 16407 par zasad i złożony jest z 21 egzonów i 16 intronów. W przypadku ludzi homologiem genu *ACTN3* jest gen *ACTN2* (Lek i wsp., 2010; Mills, 2001). Pozbawiony niekodujących intronów transkrypt mRNA genu *ACTN3* składa się z 2858 nukleotydów, kodujących białko α -aktyninę-3, złożone z 901 aminokwasów.



Rysunek 6. Lokalizacja genu *ACTN3* na chromosomie 11 (locus w pozycji 11q13.2) (źródło: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ACTN3>)

Według bazy NCBI w genie *ACTN3* wskazano na obecność 181 miejsc polimorficznych, w tym przypadku wyłącznie mutacji punktowych (typu SNP), polegających na zmianie pojedynczych nukleotydów (np. G2350A, C4656T). W kontekście predyspozycji sportowych najczęściej wskazywany jest polimorfizm R577X (Arg577Stop), który polega na transwersji 1747C>T w obrębie egzonu 16. W wyniku tej mutacji, zamiast kodonu dla argininy (allel R) pojawia się kodon stop (allel X), co powoduje powstanie krótszego białka (North, 2008, Rysunek 7).



Rysunek 7. Chromosom 11 oraz polimorfizm genu *ACTN3* typu SNP R577X w egzonie 16 (źródło: Mayne, 2006)

Możliwe są zatem trzy genotypy: RR, RX i XX. W porównaniu do genotypów RR i RX, osoby posiadające genotyp XX nie są zdolne do prawidłowej produkcji białka α -aktyniny 3. Szacuje się, że mutacja R577X genu α -aktyniny 3 u ludzi po raz pierwszy wystąpiła około 40-60 tysięcy lat temu. Obecnie jest ona szeroko rozpowszechniona i występuje u ponad miliarda ludzi, przy czym rozkład częstości genotypów XX genu *ACTN3* różni się w zależności od rasy ludzkiej, od 25% u rasy żółtej, przez około 18% u rasy białej, do około 1% u niektórych plemion rasy czarnej (Lek i wsp., 2010; Mills, 2001; Yang i wsp., 2003).

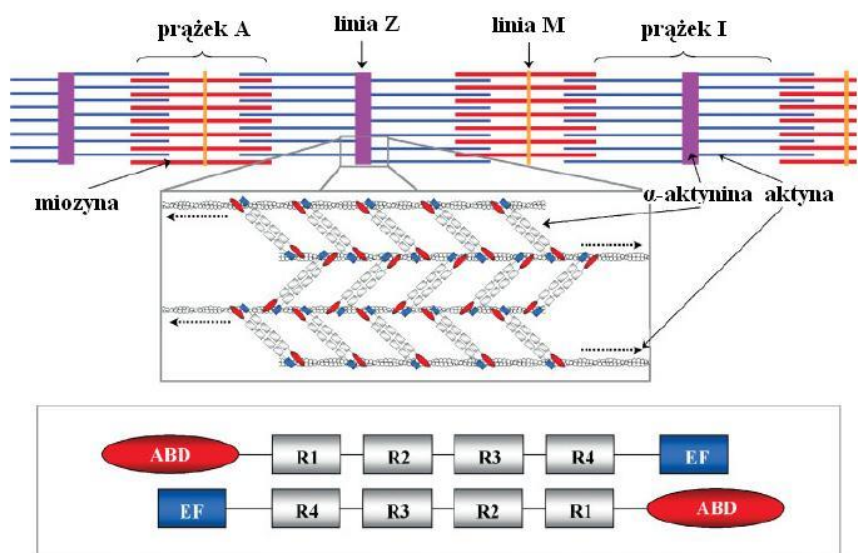
1.3.2.2. Charakterystyka funkcjonalna genu *ACTN3*

Alfa-aktyniny należą do rodziny białek wiążących filamenty aktynowe i są jednymi z podstawowych składników budujących cytoszkielet komórkowy (Blanchard i wsp., 1989). U ludzi występują cztery rodzaje α -aktynin, a mianowicie α -aktynina 1, α -aktynina 2, α -aktynina 3 i α -aktynina 4. W wyniku ewolucji, genetycznej duplikacji i alternatywnego „splicingu” doszło do znacznych różnic funkcjonalnych w tej rodzinie białek. Różnice te są najbardziej widoczne u ssaków, u których produktem ekspresji

czterech genów kodujących α -aktyniny jest co najmniej 6 różnych białek, odmiennych zarówno pod względem ekspresji w poszczególnych tkankach, jak i pełnionych w nich funkcjach (Beggs i wsp., 1992; Honda i wsp., 1998; Mills, 2001). Na podstawie właściwości biochemicznych, wzorców ekspresji i miejsca występowania, wszystkie α -aktyniny podzielić można na dwie podgrupy: izoformy cytoszkieletu niemięśniowego (α -aktynina 1 i α -aktynina 4) oraz izoformy sarkomeru mięśniowego (kodowana przez gen *ACTN2* białko α -aktynina 2 i kodowana przez gen *ACTN3* białko α -aktynina 3) (MacArthur i North, 2004).

Występujące w mięśniach białko α -aktynina 2 jest powszechnym komponentem cytoszkieletu komórkowego, występującym we wszystkich rodzajach włókien mięśniowych, mięśniu sercowym, a nawet mózgu (Lek i wsp., 2010). Z kolei gen *ACTN3* ulega ekspresji wyłącznie w szybkokurczliwych glikolitycznych włóknach typu II (Clarkson i wsp., 2005a), w szczególności w włóknach typu IIb (Vincent i wsp., 2007).

Alfa-aktynina 3 jest białkiem silnie konserwatywnym ewolucyjnie i wchodzi w skład błonek Z ograniczających jedne sarkomery od drugich (Rysunek 8). W samych sarkomerach mięśniowych można wyszczególnić dwie główne funkcje spełniane przez α -aktyninę 3. Przede wszystkim, w połączeniu z filamentami aktynowymi α -aktynina 3 utrzymuje strukturę wewnętrzną miofibryli oraz uczestniczy w koordynacji ich skurczu (Yang i wsp., 2003). Uważa się także, że α -aktynina 3 pełni funkcję polegającą na minimalizacji uszkodzeń sarkomeru, mogących powstać na skutek ekscentrycznych skurczów mięśni, poprzez absorpcję lub przenoszenie siły na prążki Z w czasie skurczu (MacArthur i North, 2004).



Rysunek 8. Lokalizacja i struktura sarkomerowej α -aktyniny (źródło: MacArthur i North, 2004, zmodyfikowano)

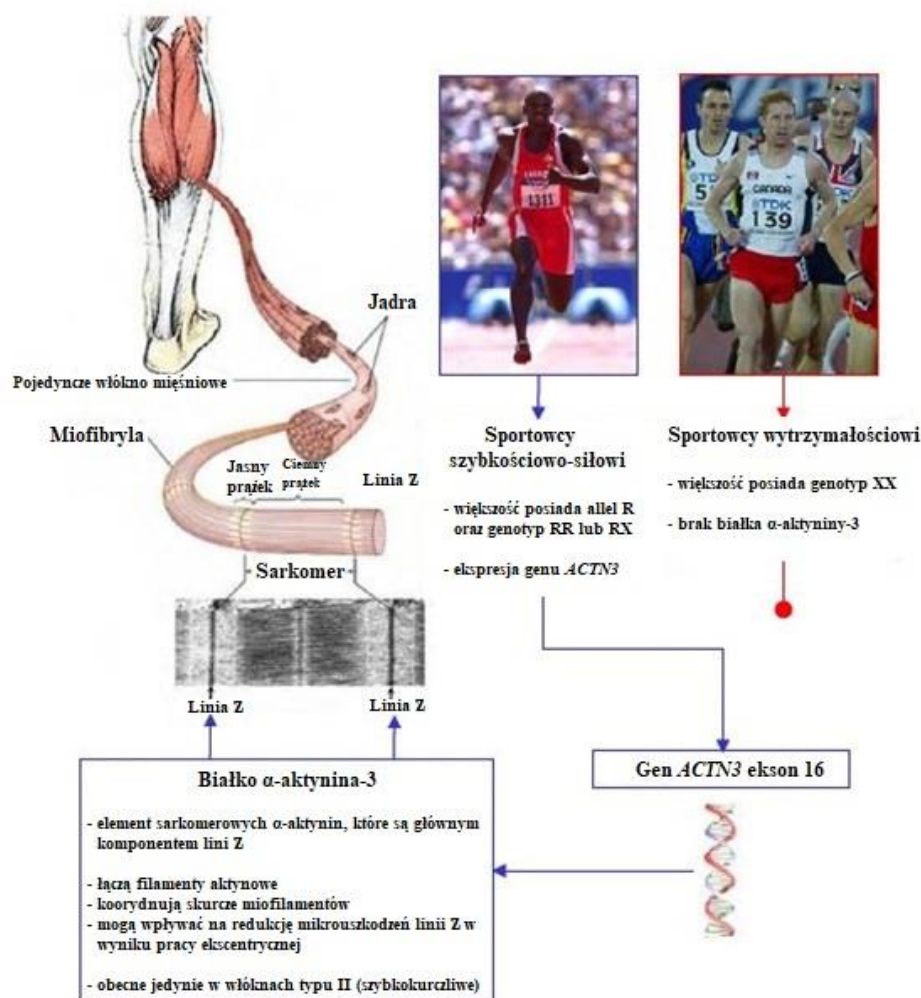
Niezależnie od strukturalnej i mechanicznej roli pełnionej przez α -aktyniny w sarkomerach, przypuszcza się także, że białka te poprzez interakcje z innymi rodzajami białek pełnią istotną rolę regulacyjną i koordynacyjną skurczu mięśniowego. Odbywa się to m.in. przez oddziaływanie α -aktyniny z licznymi białkami sygnałowymi, receptorami membranowymi i kanalikami jonowymi (np. receptor adenozyiny A_{2A} , receptor glutaminianu NMDA, kanaliki wapniowe typu L czy kanaliki potasowe Kv1.4 i Kv1.5) (Burgueño i wsp., 2003; Cukovic i wsp., 2001; Dunah i wsp., 2000; Sadeghi i wsp., 2002).

Sugeruje się także, że α -aktyniny odgrywają istotną rolę w różnicowaniu typów włókien mięśniowych i hipertrofii mięśniowej poprzez interakcje z jonami Ca^{2+} i kalcineuryną (MacArthur i North, 2004; Vincent i wsp., 2007).

Wskazywano także na interakcje zachodzące pomiędzy α -aktyninami a szeregiem enzymów metabolicznych (fosforylaza glikogenową, fruktozo-1,6-difosforanem czy enzymami z grypy aldolaz) (Chowrashi i wsp., 2002; Rakus i wsp., 2003). Chociaż rola i znaczenie tego typu połączeń dla metabolizmu komórkowego jest wciąż niepotwierdzona (MacArthur i North, 2004), znane są mechanizmy regulacji enzymatycznej wynikające z wiązania enzymów metabolicznych z białkami cytoszkieletu (Masters, 1984), co może pośrednio wskazywać na istotną rolę połączeń α -aktynin i enzymów metabolicznych dla metabolizmu.

Podsumowując, białkowy produkt ekspresji genu *ACTN3* jest istotny dla prawidłowej struktury i funkcji mięśnia (Rysunek 9). Potwierdzono także istotny wpływ α -aktyniny 3 na parametry pracy mięśniowej (w szczególności zwiększoną siłę i szybkość kurczenia się włókien mięśniowych podczas wykonywania wysiłków beztlenowych) (Yang i wsp., 2003). Jak wspomniano już wcześniej, powszechnie występująca w populacji ludzkiej mutacja R577X (Arg577Stop) powoduje powstanie krótszego białka, ponieważ na skutek transwersji C w T zamiast kodonu dla argininy (allel prawidłowy określa się jako R) pojawia się kodon stop (allel zmutowany X). Szacuje się, że genotyp XX genu *ACTN3* występuje u ponad miliarda osób na całym świecie (Yang i wsp., 2009). Homozygoty posiadające dwie uszkodzone kopie genu (XX) nie są zdolne do produkcji prawidłowego białka α -aktyniny 3, co potencjalnie może upośledzać funkcje włókien szybko kurczliwych, aczkolwiek jak dotąd u osób XX nie stwierdzono dostrzegalnych zaburzeń fenotypowych w budowie mięśni (MacArthur i North, 2004). Tłumaczy się to możliwością kompensacji straty funkcji białka *ACTN3* przez aktywnie działające białko *ACTN2* (Mills, 2001). Przypuszczenia te potwierdzają pośrednio podobieństwa pomiędzy genami *ACTN2* i *ACTN3* (są one identyczne w 80% i podobne w 90%) (Mills, 2001). Także białko kodowane przez te oba geny składa się z heterodimerów, co może sugerować podobieństwa strukturalne i brak istotnych różnic funkcjonalnych pomiędzy tymi dwoma izoformami mięśniowych α -aktynin (Chan i wsp., 1998). Co więcej, ekspresja genu *ACTN2* w ludzkich mięśniach w dużej części „nadpisuje” produkty genu *ACTN3* (Beggs i wsp., 1992).

Jak już wskazano powyżej, brak pełnej formy białka kodowanego przez *ACTN3* nie powoduje widocznych fenotypowych zaburzeń pracy mięśnia. Wręcz przeciwnie, prawdopodobną „korzyścią” wynikającą z utraty α -aktyniny 3 może być efektywniejszy metabolizm tlenowy w mięśniach, kosztem utraty części siły (przeprogramowanie metabolizmu mięśniowego w kierunku bardziej efektywnych ścieżek metabolizmu tlenowego) (MacArthur i North, 2004).



Rysunek 9. Rola genu *ACTN3* w mięśniach szkieletowych (źródło: Mayne, 2006, zmodyfikowano)

1.3.2.3. Potencjalna znaczenie badań wariantów genu *ACTN3* w sporcie

Gen *ACTN3* budzi duże nadzieje w kontekście wykorzystania analiz z jego udziałem do poszukiwania talentów sportowych – został on okrzyknięty przez naukowców „genem szybkości” (Berman i North, 2010; Chan i wsp., 2008; MacArthur i North, 2004). Dowiedziono jego związku z osiągnięciami szybkościowymi (Yang i wsp., 2003), jak i siłowymi (Clarkson i wsp., 2005a).

Większość analiz dotyczących polimorfizmu *ACTN3* R577X w sporcie skupia się na badaniu sportowców prezentujących dyscypliny szybkościowo-siłowe (z ang. *power-oriented sports*) lub wytrzymałościowe (z ang. *endurance sports*). Dyscypliny szybkościowo-siłowe charakteryzują się wykonywaniem maksymalnych wysiłków w jak najkrótszym czasie. Energia podczas takich wysiłków pochodzi głównie z ATP,

fosfokreatyny, ale również z reakcji miokinazowej i glikolizy beztlenowej (Górski, 2011). Dyscypliny wytrzymałościowe to takie, w których odbywa się długotrwała praca o umiarkowanej lub wysokiej intensywności. Największe znaczenie przy zaopatrywaniu mięśni w energię mają w tym przypadku procesy utleniania.

Wiele badań wskazuje, iż częstość występowania genotypu XX oraz allelu X (którego obecność skutkuje nie powstawaniem funkcjonalnego białka α -aktyniny 3) jest znacznie mniejsza w grupie sportowców reprezentujących dyscypliny szybkościowo-siłowe w porównaniu do sportowców dyscyplin wytrzymałościowych czy grupy kontrolnej (H. Kim i wsp., 2014; Yang i wsp., 2003). Należy dodać, że efekt wzmacniający genu *ACTN3* odznacza się głównie u zawodników prezentujących najwyższy poziom sportowy (z ang. *elite*), tzn. medalistów olimpijskich, medalistów mistrzostw świata czy mistrzostw kontynentalnych (Druzhevskaya i wsp., 2008).

Po raz pierwszy dowodów na to, że polimorfizm *ACTN3* R577X, a dokładnie obecność allelu R wpływa na wyniki w sprincie dostarczył Yang i współautorzy w 2003 roku. Badania oparł na grupie liczącej 107 sportowców dyscyplin szybkościowo-siłowych, w skład której wchodził sportowcy różnych dyscyplin sportowych, takich jak biegi, pływanie, judo, kolarstwo torowe oraz łyżwiarstwo. Wyniki badań wykazały zwiększoną częstotliwość występowania genotypu RR u najwyższej klasy sprinterów - zarówno kobiet, jak i mężczyzn. Zasugerowano, że taki genotyp ma korzystny wpływ na parametry pracy mięśni szkieletowych w czasie wysiłków wymagających generowania maksymalnych skurczów z dużą częstotliwością, przez co zapewnia „przewagę ewolucyjną” w tego rodzaju wysiłkach. Dostrzeżono również istotnie większą częstotliwość występowania allelu X wśród przedstawicieli sportów wytrzymałościowych. Pomimo, że testowana grupa była heterogeniczna pod względem dyscyplin sportowych i niezbyt liczna, to wyniki tej pracy dały podwaliny do dalszych badań innych ośrodków badawczych.

Hipoteza wskazująca na to, iż polimorfizm genu *ACTN3* R577X wpływa na wynik sportowy została dotychczas sprawdzona na zawodnikach reprezentujących najróżniejsze dyscypliny sportowe. Liczba testowanych populacji ciągle rośnie.

Wpływ polimorfizmu R577X *ACTN3* na eksplozywne wysiłki został potwierdzony w populacji rosyjskich sportowców różnych dyscyplin sportowych, zarówno indywidualnych jak i drużynowych (Druzhevskaya i wsp., 2008). Wpływu

polimorfizmu R577X *ACTN3* na wyniki sportowe dowiedziono w populacji amerykańskich zawodników sportów siłowych (Roth i wsp., 2008a), czy też w populacji izraelskich lekkoatletów (Eynon i wsp., 2009), a także w populacji rosyjskich łyżwiarzy szybkich (Ahmetov i wsp., 2011). Podobnych wniosków dostarczają badania przeprowadzone na koreańskich sportowcach dyscyplin szybkościowo-siłowych (Kim i wsp., 2014), czy japońskich zapaśnikach (Kikuchi i wsp., 2013).

Podczas gdy związek polimorfizmu R577X *ACTN3* z wynikami w dyscyplinach szybkościowo-siłowych wydaje się, z uwagi na obszerną literaturę, bardzo prawdopodobny - tak hipoteza o rzekomym związku allelu X z osiągnięciami o charakterze wytrzymałościowym nie ma tak jednoznacznego potwierdzenia.

Pierwszą pracą, która wskazywała na taką zależność, była wcześniej wspomniana publikacja Yanga i współautorów (2003), gdzie odnotowano częstsze występowanie allelu X w grupie sportowców wytrzymałościowych. Takiego związku doszukiwało się później wiele zespołów badawczych, wyciągając przy tym różne, czasami odmienne wnioski.

Jak zatem można odnieść obecny stan badań dotyczący polimorfizmu R577X *ACTN3* do licznych sukcesów afrykańskich biegaczy, którzy to dominują w biegach średnio- i długodystansowych, a także przełajowych i ulicznych? Na przestrzeni ostatnich lat procentowy udział afrykańskich zawodników wśród najlepszych biegaczy znacznie się zmienił. Według danych, tylko 11% stanowią Europejczycy, biegacze pochodzący z Afryki to aż 85%, z czego 55% stanowią Kenijczycy (Larsen, 2003; Wilber i Pitsiladis, 2012). Ponadto Etiopczycy oraz Kenijczycy, jako biegacze na średnich i długich dystansach, dzierżą ponad 90% rekordów oraz zajmują czołowe miejsca w rankingach (Wilber i Pitsiladis, 2012). Dotychczasowe studia dotyczące mitochondrialnego DNA oraz chromosomu Y i ich wpływu na osiągnięcia w biegach długodystansowych afrykańskich biegaczy nie wspierają hipotezy jakoby genetyka była podłożem różnic (de Lira i wsp., 2014). Podobnie prezentują się dane dotyczące polimorfizmu R577X *ACTN3*. Okazuje się, iż obecność allelu X u Nigeryjczyków i Kenijczyków jest ekstremalnie mała. U Nigeryjczyków homozygoty XX nie występują, u Kenijczyków stanowią ok. 1%, a u Etiopczyków 11% populacji (Yang

i wsp., 2007). Bardzo niska obecność allelu X wskazuje na to, iż brak α -aktyniny 3 nie jest czynnikiem decydującym o sukcesie sportowym afrykańskich biegaczy.

Niemalże identycznych informacji dostarczają nam studia dotyczące innej dyscypliny wytrzymałościowej – triathlonu. Dowiedziono braku korelacji pomiędzy wariantami R577X *ACTN3* a wynikami w triathlonie typu Ironman (Saunders i wsp., 2007). Dodatkowo Lucia i współautorzy (2006) wskazuje na brak związku polimorfizmu R577X *ACTN3* z wynikami w kolarstwie.

Jak się okazuje, wpływ polimorfizmu R577X *ACTN3* nie musi dotyczyć bezpośrednio wyniku sportowego. W grupie rekreacyjnych maratończyków nie dowiedziono jego wpływu na wynik sportowy, ale odnaleziono związek z innymi parametrami (Coso i wsp., 2019). Okazało się, iż nosiciele genotypu XX cechowali się większym procentowym udziałem tkanki tłuszczowej, lepszą elastycznością oraz większym grzbietowym zgięciem stopy. Zauważono również, że biegacze XX charakteryzowali się mniejszą zdolnością do produkcji siły oraz mniejszą beztłuszczową masą uda.

Ciekawym obszarem badań genetycznych, z uwagi na swoją nieprzewidywalność oraz mieszaną bioenergetykę, wydają się być sporty drużynowe. Tutaj wynik jest uzależniony od przeciwnika, a tempo gry jest zmienne. Przykładowo piłka nożna wymaga intensywnych wysiłków o przerywanym charakterze. Przeciętny, profesjonalny piłkarz pokonuje od 8 000 do 12 000 m podczas meczu. Duża część tego dystansu pokonywana jest marszem lub spokojnym biegiem, ale aż do 20% przebytego dystansu to sprint lub bieg na wysokiej intensywności – szczególnie w decydujących momentach meczu (Bangsbo i wsp., 1991). Część autorów (Pimenta i wsp., 2012; Santiago i wsp., 2008), wskazuje na genotyp RR jako przynoszący korzyść w piłce nożnej. Nosiciele genotypu RR mają przewagę w sprincie na krótkim dystansie oraz w teście wyskoku (Pimenta i wsp., 2012). Jednakże liczne prace negują taką zależność, co wskazuje na potrzebę dalszych badań (Domańska-Senderowska i wsp., 2019; Massidda i wsp., 2015).

Jak do tej pory powstało kilka prac bazujących na populacji polskiej. Dotyczą one zarówno dyscyplin szybkościowo-siłowych, jak i wytrzymałościowych. Badania oparte na licznej grupie polskich sportowców prezentujących dyscypliny szybkościowo-siłowe, prowadzone przez Ciężczyka i współautorów (2011), wskazują na wpływ

polimorfizmu R577X *ACTN3* na wynik sportowy. W grupie sprinterów stwierdzono mniejszą częstotliwość występowania allelu X w stosunku do grupy kontrolnej. Zespół Ciężczyka i współautorów (2012) wykazał również związek polimorfizmu R577X *ACTN3* ze statusem elitarnego wioślarza, wskazując na allel R jako faworyzujący do osiągnięcia sukcesów w tej dyscyplinie. Nie odnaleziono jednak związku polimorfizmu R577X *ACTN3* ze statusem elitarnego pływaka w populacji polskiej (Grenda i wsp., 2014).

Maksymalny pobór tlenu VO_{2max} to wskaźnik niezwykle istotny w dyscyplinach wytrzymałościowych. Związek VO_{2max} z polimorfizmem R577X *ACTN3* badał zespół Holdys i współautorów (2011). Nie dowiedziono statystycznie istotnego związku, jednakże zaobserwowano trend wskazujący na wyższe wartości VO_{2max} u nosicieli genotypów RR oraz RX.

Badania przeprowadzone na grupie 22 polskich piłkarzy wskazują również na to, iż poziom ekspresji genu *ACTN3* nie wpływa na siłę eksplozywną piłkarzy. Dwa testy skoczności: CMJ (z ang. *countermovement jump*) oraz SJ (z ang. *squat jump*) nie wykazały związku z ekspresją genu *ACTN3* w grupie piłkarzy (Domańska-Senderowska i wsp., 2019). Z kolei inne źródło (Orysiak i wsp., 2014) wskazuje na różnicę w CMJ pomiędzy genotypami RR oraz XX, na korzyść posiadaczy pierwszego wariantu, a także wyraźny wpływ polimorfizmu na moc mięśniową i wyskok u nosicieli genotypu RR. Niejednoznaczne wyniki osiągnięte w powyższych badaniach wskazują na potrzebę dalszych analiz.

Niedawne doniesienia mówią jednak, iż spektrum działania polimorfizmu R577X genu *ACTN3* na funkcje mięśni jest dużo szersze niż mogło się wcześniej wydawać. Jak dowodzą liczne źródła, allel R może wpływać na adaptację wywołaną treningiem, może chronić przed uszkodzeniami mięśni spowodowanymi pracą ekscentryczną oraz wpływać pozytywnie na ograniczenie kontuzji (Kim i wsp., 2014; Pimenta i wsp., 2012; Silva i wsp., 2015).

Przez ostatnie paręnaście lat wpływ komponentów genetycznych na procesy adaptacji został dosyć dobrze poznany i opisany (Bouchard, 2012; Bouchard i wsp., 2011). Nie ulega wątpliwości, iż zarówno osiągnięcia sportowe (Guth i Roth, 2013), jak i procesy adaptacyjne (Mann i wsp., 2014) są uwarunkowane genetycznie.

Do tej pory kilka prac wykazało związek polimorfizmu R577X *ACTN3* z adaptacją w treningu siłowym (Kikuchi i wsp., 2018; Roth i wsp., 2008b). Jednakże wyniki we wszystkich badaniach nie są zbieżne. Część badań wskazuje na związek genotypu RR ze znacznym wzrostem siły lub mocy po wcześniej zaaplikowanym treningu siłowym (Delmonico i wsp., 2007; Pereira i wsp., 2013b). Jedna praca wskazuje na brak wpływu polimorfizmu R577X *ACTN3* na adaptacje treningowe w treningu siłowym (Erskine i wsp., 2014), a inna wskazuje na poprawę jednego maksymalnego powtórzenia u nosicieli allelu X w porównaniu do genotypów RR (Clarkson i wsp., 2005a). Różnica w wynikach może być spowodowana wyjściową heterogenicznością grup oraz różnicą w stosowanych programach treningowych. Jednakże, wskazana wcześniej przewaga allelu R w sportach szybkościowo-siłowych może wskazywać na to, iż to jednak nosiciele allelu R będą lepiej reagować na trening siły, szybkości i mocy (Kikuchi i Nakazato, 2015). Przemawiać mogą za tym niektóre molekularne mechanizmy. Ahmetov i współautorzy (2014) wskazał na wyższy poziom testosteronu u zawodników, zarówno płci żeńskiej, jak i męskiej posiadających allel R w porównaniu do nosicieli genotypów XX. Norman i współautorzy (2014) z kolei wykazali, iż kinaza mTOR (tzw. ssaczy cel rapamycyny; mTOR) oraz kinaza p70S6k wskazują większą aktywność u nosicieli allelu R w porównaniu z genotypem XX, obserwowaną pod wpływem treningu sprinterskiego. mTOR jest kinazą białkową, która reguluje syntezę białka i wzrost komórek w odpowiedzi na czynniki wzrostu, składniki odżywcze, poziomy energii i stres (Bockaert i Marin, 2015).

Polimorfizm R577X *ACTN3* jest również powiązany z potreningowymi uszkodzeniami mięśni. Jest to związane ze strukturalną funkcją białka α -aktyniny 3, które buduje rusztowanie sarkomeru. Występuje ono tylko w włóknach szybko-kurczliwych, a jego brak u homozygot XX kompensuje alfa-aktynina-2 (MacArthur i wsp., 2007). Obydwie formy α -aktyniny kotwiczą prążki Z znajdujące się we włóknach mięśniowych (Beggs i wsp., 1992). Prążki Z są wrażliwe na pracę ekscentryczną mięśni (Fridén i Lieber, 2001), a modele myszy z zablokowanymi genami (z ang. *knock-out mouse*) pokazują, iż są mniej stabilne przy zwiększonej koncentracji α -aktyniny 2 (Seto i wsp., 2011). W wyniku intensywnej pracy ekscentrycznej mięśnie ulegają mikrouszkodzeniom (Pimenta i wsp., 2012). Niektóre źródła dostarczają informacji, iż genotyp RR *ACTN3* R577X może wpływać na ograniczenie uszkodzeń mięśniowych, co skutkuje skróconym czasem regeneracji

potreningowej (Clarkson i wsp., 2005b). Zależność taka wskazywałaby na silnie różnicujący efekt polimorfizmu R577X *ACTN3* i dawałaby przewagę osobom z korzystnym genotypem. Istnieją silne przesłanki za tym, iż allel X czy też genotyp XX są powiązane z wyższym poziomem markerów łączących się z uszkodzeniami mięśniowymi (Del Coso i wsp., 2017; Pimenta i wsp., 2012; Venkata, 2019). Jednakże nie wszystkie badania potwierdzają tę tezę wskazując na brak efektu wywołanego przez polimorfizm (Clarkson i wsp., 2005b) lub przypisując genotypowi RR większy spadek mocy w wyniku zaimplementowanych ćwiczeń (Venckunas i wsp., 2012)

W badaniach Del Coso (2017) badano wpływ kilku genów na poziom kinazy kreatynowej u maratończyków. U nosicieli allelu R nie obserwowano negatywnego wpływu zwiększonego poziomu CK, który pojawia się w wyniku pokonania maratonu. Nie jest to jednoznaczny wynik z uwagi na to, iż gen *ACTN3* był tylko jednym z kilku badanych genów. Jeden z innych badanych polimorfizmów mógł wywołać ten efekt. Jednakże wynik ten może służyć jako wsparcie dla wcześniej przytoczonych badań.

Podsumowując należy stwierdzić, iż większość badań wskazuje allel X i genotyp XX jako te, które są powiązane z większym poziomem markerów uszkodzenia mięśni, zarówno podczas typowej pracy ekscentrycznej, jak i specyficznego treningu sportowego czy rywalizacji sportowej (Belli i wsp., 2017; Del Coso i wsp., 2017; Pimenta i wsp., 2012; Vincent i wsp., 2010). Jednakże niezbędne jest powstanie kolejnych prac w powyższym temacie, a przytoczone doniesienia powinny być traktowane z dozą naukowej nieufności z powodu bardzo małych grup uczestniczących w badaniach.

Poszukiwania związku polimorfizmu R577X *ACTN3* z ryzykiem pojawienia się kontuzji aparatu ruchu to kolejna, obiecująca dziedzina w kontekście praktycznego zastosowania genetyki. Są one nieodłączną częścią zarówno amatorskiego, jak i zawodowego sportu. Możliwość oszacowania prawdopodobieństwa kontuzji na podstawie genotypu jest niesamowicie pożądaną wiedzą i na pewno niejeden klub sportowy byłby chętny, aby taką wiedzę posiadać.

Dowodzono, że allel R genu *ACTN3* wpływa na ograniczenie ryzyka kontuzji. Związane to może być z ochronnym wpływem białka α -aktyniny 3 na prążki Z, co wpływa ochronnie na tkankę mięśniową przy pracy ekscentrycznej (Clarkson i wsp., 2005b). Należy dodać, że to właśnie deficyty w ekscentrycznej pracy są najczęstszą

przyczyną kontuzji tylnej części uda u sportowców (Shield i Bourne, 2018). Dodatkowo nosiciele allelu R prezentują wyższy poziom masy mięśniowej (MacArthur i North, 2007), a w szczególności włókien szybkokurczliwych (Vincent i wsp., 2007). Okazało się, iż występowanie genotypu RR u pacjentów ze skręceniem stawu skokowego było znacznie rzadsze niż w grupie kontrolnej (Qi i wsp., 2016; Shang i wsp., 2015). Inne badania, przeprowadzone na grupie balerin, donoszą, że nosicielki genotypu XX są aż 4,7 razy bardziej podatne na skręcenie stawu skokowego niż nosicielki allelu R (Kim i wsp., 2014).

2. Metodologiczne podstawy badań

2.1. Cele badań, pytania i hipotezy badawcze

Celami poznawczymi przeprowadzonych badań są:

1. Określenie korelacji pomiędzy częstością występowania genotypów i alleli opisywanych w wybranych punktach polimorficznych I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3* a statusem sportowym polskich zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym oraz zawodników realizujących wysiłki szybkościowo-siłowe.
2. Określenie korelacji pomiędzy częstością występowania określonych kombinacji genotypów I/D *ACE* oraz R577X *ACTN3* a statusem sportowym polskich zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym oraz zawodników realizujących wysiłki szybkościowo-siłowe.

W odniesieniu do potencjalnego zastosowania w praktyce przeprowadzonych badań, czyli celu aplikacyjnego, istnieje możliwość wykorzystania danych genetycznych uzyskanych z badań asocjacyjnych do konstrukcji wstępnego testu diagnostycznego z wykorzystaniem układu dwugenowego, który może posłużyć jako dodatkowe źródło precyzyjnych informacji o predyspozycjach osobniczych do wykonywania wysiłków o charakterze wytrzymałościowym i szybkościowo-siłowym. Informacje tego typu mogą być pomocne między innymi w procesie doboru do sportu.

Postawionym **celem aplikacyjnym** jest:

1. Zastosowanie danych genetycznych uzyskanych na podstawie badań miejsc polimorficznych I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3* przeprowadzonych u polskich sportowców do konstrukcji testów diagnostycznych mogących mieć zastosowanie w procesie doboru do sportu.

Realizacja założonych celów wymagała postawienia następujących **pytań badawczych**:

1. Czy obecność określonych genotypów i alleli opisywanych w wybranych punktach polimorficznych (I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3*) ma wpływ na status

- sportowy polskich zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym oraz zawodników realizujących wysiłki szybkościowo-siłowe?
2. Czy kombinacja genotypów opisywanych w dwóch najczęściej badanych w kontekście sportowym miejscach polimorficznych (I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3*) koreluje ze statusem sportowym polskich zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym lub szybkościowo-siłowym?
 3. Czy kompilacja danych pochodzących z genetycznych badań asocjacyjnych przeprowadzonych u polskich sportowców z wykorzystaniem dwóch najczęściej badanych w kontekście sportu polimorfizmów genetycznych (I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3*) pozwala na konstrukcję wstępnego testu diagnostycznego, mogącego mieć zastosowanie w procesie doboru do sportu?

Sformułowano następujące **hipotezy badawcze**:

1. Genotyp II genu *ACE* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.
2. Genotyp XX genu *ACTN3* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.
3. Genotyp DD genu *ACE* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym.
4. Genotyp RR genu *ACTN3* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym.
5. Częstość występowania określonych kombinacji genotypów polimorfizmów genów *ACE* i *ACTN3* jest charakterystyczna dla sportowców realizujących różne wysiłki startowe, co potwierdzone jest przez istotnie statystycznie większą częstość występowania kombinacji genotypów II *ACE* i XX *ACTN3* wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze

wytrzymałościowym oraz kombinacji genotypów DD *ACE* i RR *ACTN3* wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.

6. Wstępny test diagnostyczny skonstruowany z wykorzystaniem układu dwóch polimorfizmów (I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3*) może być stosowany jako test wspomagający w procesie doboru do sportu, będąc źródłem dodatkowych informacji o predyspozycjach osobniczych do wykonywania wysiłków o charakterze wytrzymałościowym i szybkościowo-siłowym.

2.2. Materiał do badań

Pobór materiału prowadzony był pod kierunkiem dra Piotra Żmijewskiego w Instytucie Sportu w Warszawie, w ramach projektu „Genetyczne uwarunkowania postępów treningowych” zleconego przez Ministerstwo Sportu i Turystyki (umowa nr 2015.058/40/BP/DWM).

Grupę badaną stanowiło łącznie 359 sportowców reprezentujących trzy dyscypliny sportowe, tj. kolarstwo (n=139), pływanie (n=143) oraz podnoszenie ciężarów (n=77). Rekrutowani do badań zawodnicy to uczestnicy Mistrzostw Polski w kategoriach juniorskich lub seniorskich z minimum pięcioletnim stażem zawodniczym. Na potrzeby przeprowadzonego eksperymentu wszystkich sportowców w danej dyscyplinie (kolarze, pływacy, sztangiści) podzielono na dwie grupy, tj. (1) zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym (oznaczeni jako LD), do których zaliczono długodystansowych kolarzy (LDC) i długodystansowych pływaków (LDS) oraz (2) zawodników realizujących wysiłki szybkościowo-siłowe (SD), do których zaliczono krótkodystansowych kolarzy (SDC), krótkodystansowych pływaków (SDS) oraz sztangistów (LIFT).

W podgrupie kolarzy (n=139) znalazło się 95 mężczyzn i 44 kobiety (średni wiek ($\pm$ SD) wynosił odpowiednio $18,4 \pm 1,1$ i $17,1 \pm 1,5$ roku). Do udziału w badaniach zakwalifikowano kolarzy, którzy przez Polski Związek Kolarski zostali zakwalifikowani do kadr juniorskich narodowych uzyskując wysokie lokaty na imprezach mistrzowskich. W tej dyscyplinie do zawodników reprezentujących konkurencje sprinterskie zakwalifikowano zawodników, którzy swój najlepszy wynik sportowy uzyskali w konkurencjach odbywających się na torze, tj. sprincie klasycznym i sprincie olimpijskim. Do zawodników reprezentujących konkurencje

wytrzymałościowe zaliczono zawodników, którzy swoje najlepsze rezultaty (lokaty imprez sportowych) uzyskali w wyścigach szosowych.

W podgrupie pływaków ($n=143$) uczestniczyło 92 mężczyzn i 51 kobiet (średni wiek ($\pm$ SD) wynosił odpowiednio $17,7 \pm 1,4$ i $18,1 \pm 1,3$ roku). Do udziału w badaniach zaproszono zawodników, którzy w konkurencjach juniorskich uzyskali medal Mistrzostw Polski i zostali zakwalifikowani przez Polski Związek Pływacki do juniorskich kadr narodowych. Do zawodników reprezentujących konkurencje sprinterskie zakwalifikowano osoby, które swój najlepszy wynik sportowy (wyrażony punktami FINA), uzyskały w konkurencjach na dystansie 50m lub 100m. Do zawodników reprezentujących konkurencje długodystansowe zakwalifikowano osoby, które swój najlepszy wynik sportowy (wyrażony punktami FINA), uzyskały w konkurencjach na dystansie 200m i dłuższe (200m, 400m, 800m, 1500m).

Badani z podgrupy sztangistów ($n=77$) to 46 mężczyzn i 31 kobiet (średni wiek ($\pm$ SD) wynosił odpowiednio $18,0 \pm 1,2$ i $17,6 \pm 1,2$ roku). Wszyscy sztangiści prezentowali wysoki krajowy poziom sportowy, byli członkami kadry narodowej juniorów, ich wynik sportowy w dwuboju wynosił odpowiednio $231 \pm 41,6$ i $138 \pm 28,6$ kg. Wstępne badania wykazały, że uczestnicy byli zdrowi, wolni od kontuzji i nie brali żadnych środków dopingujących.

Grupę kontrolną stanowiło 281 zdrowych ochotników, 165 mężczyzn i 116 kobiet (średni wiek ($\pm$ SD) wynosił odpowiednio $21,2 \pm 1,3$ i $20,4 \pm 1,1$ roku), którzy nigdy nie uprawiali wyczynowo żadnej dyscypliny sportowej. Uczestnicy do grupy kontrolnej byli rekrutowani spośród studentów różnych wydziałów Uniwersytetu Szczecińskiego.

Przeprowadzone badania zostały objęte zgodą wydaną przez Komisję Etyki Badań Naukowych przy Instytucie Sportu w Warszawie (uchwała z dn. 14.07.2011) oraz Komisję Bioetyczną przy Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie (uchwała nr BN-001/45/08 z dn. 27.05.2008). Wszystkie procedury zostały przeprowadzone zgodnie z deklaracją helsińską World Medical Association oraz standardami badań w naukach o kulturze fizycznej i sporcie. W badaniach uwzględniono zasady przyjęte dla genetycznych badań asocjacyjnych zdefiniowanych w dokumencie STREGA (z ang. *Strengthening the Reporting of Genetic Association*) (Little i wsp., 2009). Wszystkie osoby uczestniczące w badaniu otrzymały materiały informacyjne odnośnie celu eksperymentu, zasad uczestnictwa oraz potencjalnego ryzyka z tego wynikającego. Każda osoba zakwalifikowana do badań, wypełniła i podpisała formularz dotyczący

świadomego i dobrowolnego uczestnictwa w badaniach genetycznych z zastrzeżeniem anonimowości oraz poufności uzyskanych danych. Jako wyczynowi sportowcy wszyscy zawodnicy z grupy badanej byli rutynowo badani pod kątem substancji zabronionych podczas zawodów i poza zawodami.

Wymazy z nabłonka jamy ustnej zostały pobrane od ochotników, którzy wyrazili zgodę na uczestnictwo w badaniach. Wymazy zostały pobrane za pomocą sterylnych szpatulek firmy Puritan (USA). Przed pobraniem każdy uczestników został poproszony o przepłukanie jamy ustnej wodą destylowaną, następnie materiał biologiczny został pobrany przez pocieranie energicznie szpatułką po wewnętrznej części policzków, z pominięciem zębów i dziąseł. Pobrane wymazy zostały natychmiast umieszczone w lodówce transportowej w celu zabezpieczenia materiału genetycznego przed degradacją i przewiezione do laboratorium, gdzie były przechowywane w stanie zamrożenia (-20°C) aż do momentu rozpoczęcia analiz.

2.3. Stosowane techniki badań naukowych

2.3.1. Molekularne analizy genetyczne

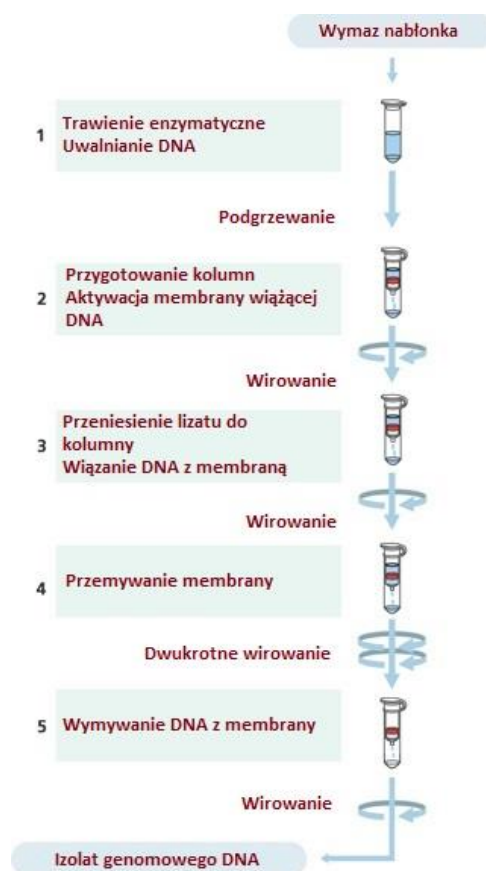
Wszystkie procedury związane z molekularnymi analizami genetycznymi zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Maciejewskiej-Skrendo, prof. AWF i S, w Zakładzie Biologicznych Podstaw Kultury Fizycznej i Laboratorium Genetyki Centrum Badań Strukturalno-Funkcjonalnych Człowieka Wydziału Kultury Fizycznej i Promocji Zdrowia Uniwersytetu Szczecińskiego.

2.3.1.1. Izolacja materiału genetycznego

Izolacja DNA z komórek nabłonka jamy ustnej odbywała się z użyciem zestawu Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Niemcy). Zestaw zapewnia prosty i wygodny sposób izolowania czystego DNA o wysokiej masie cząsteczkowej z różnych tkanek ssaków. Procedura izolacyjna odbywała się według wymienionych etapów (Rysunek 10):

1. Liza komórek i usuwanie RNA z roztworu.
2. Aktywacja membrany wiążącej DNA w kolumnach filtracyjnych.
3. Wiązanie DNA z membraną.

4. Dwukrotne przemywanie związanej z membraną DNA.
5. Wymywanie DNA z membrany.



Rysunek 10. Etapy izolacji DNA z zastosowaniem Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (źródło: www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/genelute-mammalian-genomic-dna-miniprep-kit.html, zmodyfikowano)

Szczegółowa procedura izolacyjna

Wszystkie czynności związane z izolacją DNA zostały przeprowadzone przy zastosowaniu jednorazowych rękawiczek, jałowych probówek oraz jednorazowych końcówek do pipet. Dodatkowo, aby uniknąć kontaminacji wszystkie analizy zostały przeprowadzone w komorach laminarnych przy zachowaniu sterylności.

Izolacja materiału genetycznego została przeprowadzona według zaleceń producenta. Zastosowano załączony protokół izolacyjny przeznaczony do oczyszczania całkowitego DNA pozyskanego z zawiesin komórkowych, według planu:

1. Wymazówki z nabłonkiem przebadanych osób zostały umieszczone w probówkach typu Eppendorf z 200 µl buforu zawieszającego (Resuspension Solution).

2. Następnie do zawiesiny komórek w buforze dodano z pomocą pipety 20 μ l Proteinazy K (20 mg/ml) i 200 μ l buforu lizującego (Lysis Solution C; pH=7,4).
3. Każda próbka została wymieszana przy użyciu Vortexa przez około 15 s do momentu uzyskania homogenicznego roztworu.
4. Próbkę zwirowano przez 30s przy RCF = 2000x (z ang. *relative centrifugal force* - względnej sile wirowania), żeby pozbyć się resztek płynu ze ścianek.
5. Próbkę została zainkubowana w cieplarni w temperaturze 70°C przez 10 min. Proteinaza K oraz bufor lizujący spowodowały dekompozycję białek komórkowych, a także rozpad struktur błoniastych komórek. Zawarta w zestawie proteinaza K była całkowicie wolna od aktywności DNAzy i RNAzy – zapewniło to stabilność izolowanego DNA.
6. Podczas inkubacji próbek przygotowane zostały kolumny filtracyjne umieszczone następnie w probówkach zbiorczych. Liczba kolumn odpowiadała liczbie analizowanych prób. 500 μ l buforu aktywującego (Column Preparation Solution) zostało dodanego do każdej z kolumn, w celu aktywacji membrany krzemionkowej do wiązania DNA oraz uzyskania maksymalnego wiązania DNA z membraną.
7. Kolumny zwirowano przy względnej sile wirowania równej 12000 x g przez 1 minutę. W wyniku tego cała objętość buforu aktywującego została przesączona przez membranę krzemionkową.
8. Po wirowaniu próbki z przesączem wyrzucono. Kolumny filtracyjne zostały przeniesione do nowych probówek zbiorczych.
9. Gdy zakończono inkubację w cieplarni próbki zostały zwirowane przy RCF = 2000 x g przez 30 s, aby pozbyć się resztek płynu ze ścianek.
10. Do próbek zostało dodane 20 μ l roztworu RNAzy A (5 μ g/ μ l; RNase A Solution).
11. Następnie wszystkie próbki przez chwilę worteksowano, aby uzyskać homogeniczny roztwór.
12. Próbkę z RNAzą były inkubowane przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. RNAza była całkowicie pozbawiona aktywności DNAzy, zagwarantowało to stabilność DNA.
13. Próbkę wirowano przy RCF = 2000 x g przez 30 s, aby pozbyć się resztek płynu ze ścianek.
14. Do próbek za pomocą pipety dodano po 200 μ l etanolu. Następnie dokładnie worteksowano przez około 15s, aby uzyskać homogeniczny roztwór.

15. Zawartość każdej próbki (około 640 μ l) przeniesiono do wcześniej przygotowanych kolumn filtracyjnych. Wirowano przy $RCF = 6500 \times g$ przez 1 minutę. W trakcie wirowania DNA został zabsorbowany na wcześniej zaktywowanej membranie. Zastosowane warunki pH uniemożliwiły osadzanie na membranie białek i innych zanieczyszczeń mogących hamować PCR.
16. Po wirowaniu próbki z przesączem zostały wyrzucone. Kolumny filtracyjne (z membranami wraz ze związanym DNA każdej izolowanej próbki) umieszczono w nowych próbkach zbiorczych.
17. Następnie przemywano DNA związane z membraną w kolumnie filtracyjnej. Do każdej kolumny dodawano po 500 μ l buforu myjącego (Wash Solution; pH=7.5). Spowodował on usunięcie zanieczyszczeń, bez uszkodzenia związanego DNA.
18. Kolumny zwirowano przy $RCF = 6500 \times g$ przez 1 minutę. Przez membranę krzemionkową ze związanym DNA przesączony został cały bufor myjący.
19. Po zwirowaniu próbki z przesączem zostały wyrzucone. Kolumny filtracyjne przeniesiono do nowych próbek zbiorczych.
20. Następnie, po raz kolejny do każdej kolumny dodano po 500 μ l buforu myjącego.
21. Kolumny zwirowano przez 3 minuty przy $RCF = 14000 \times g$.
22. Po zwirowaniu próbki z przesączem wyrzucono. Kolumny filtracyjne zostały umieszczone w nowych próbkach zbiorczych. Jeśli na dnie kolumny znajdowały się pozostałości płynu, to kolumny dodatkowo wirowano przy $RCF = 14000 \times g$ przez 1 minutę.
23. Po zwirowaniu próbki z przesączem zostały wyrzucone. Kolumny filtracyjne umieszczono w nowych próbkach zbiorczych. Kolumny pozostawiono otwarte na 2 minuty w celu odparowania etanolu.
24. Do każdej kolumny filtracyjnej dodano 200 μ l buforu wymywającego (Elution Solution; pH 8,5). Inkubowano je przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
25. Kolumny wirowano przez 1 minutę przy $RCF = 6500 \times g$ w celu przesączenia całej objętości buforu wymywającego przez membranę krzemionkową.
26. Po wirowaniu kolumny zostały wyrzucone. Probówki zbiorcze z przesączem (wyizolowany roztwór DNA) zachowano do wykorzystania przy dalszych analizach.

Po zakończeniu izolacji oceniano jakość uzyskanego DNA. Ilość, integralność i czystość uzyskanego DNA oceniono za pomocą urządzenia Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent, USA). Próbkę została umieszczona w zamrażarce z temperaturą -70°C. Zostały w stanie zamrożenia do czasu rozpoczęcia analiz molekularnych.

2.3.1.2. Aplikacja technik molekularnych do detekcji polimorfizmu wybranych genów

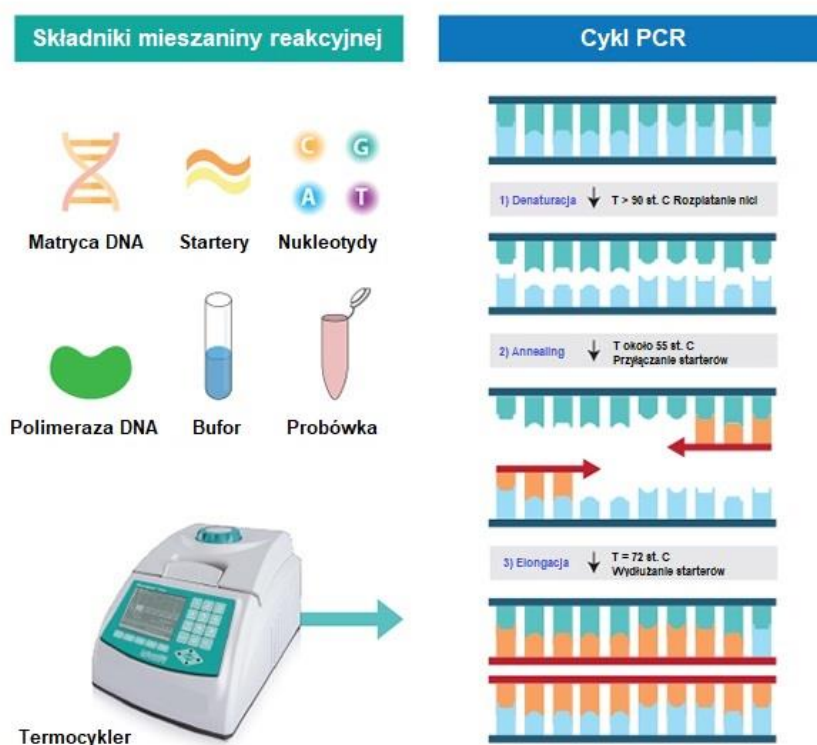
W celu detekcji ustalonych polimorfizmów w badanych genach markerowych przeprowadzona została aplikacja różnorodnych technik molekularnych, dostosowanych do charakteru wykrywanych mutacji. Wszystkie analizy odbywały się w oparciu o metody wywodzące się z łańcuchowej reakcji polimerazy (z ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), zastosowano zarówno klasyczną reakcję PCR, jak i jej modyfikację – PCR w czasie rzeczywistym (z ang. *Real-Time PCR*).

2.3.1.2.1. Zasada metody reakcji PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy została opracowana w 1987 roku przez grupę naukowców z USA. Pięć lat później w 1993 roku Kary Mullis – główny autor metody, otrzymał za nią nagrodę Nobla w dziedzinie chemii (Saiki i wsp., 1988). Proces łańcuchowej reakcji polimerazy stał się obecnie kluczową procedurą w laboratoriach badawczych biologii molekularnej. Technika PCR jest metodą *in vitro*, w której genomowe lub sklonowane sekwencje DNA lub RNA są selektywnie amplifikowane przy udziale enzymu z wykorzystaniem pary starterów oligonukleotydowych (Williams, 1989). W procesie wykorzystywana jest termostabilna polimeraza zdolna do pracy w wysokich temperaturach. Czułość reakcji pozwala na otrzymanie ponad 1 000 000 kopii pojedynczego genu, co pozwala na prowadzenie dalszych analiz w jego obrębie.

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi: matryca DNA, dwa startery, enzym polimeraza DNA, bufor stwarzający odpowiednie warunki dla działania polimerazy, jony magnezu oraz deoksynukleozydotrifosforany (dNTP). Specyficzność reakcji PCR zapewniają odpowiednio dobrane startery. Są to oligonukleotydy o długości 18-28 nt, komplementarne do końców danej sekwencji DNA, która ma podlegać powieleniu. Obydwa startery przyłączają się do dwóch pojedynczych nici, wyznaczając początek pracy dla polimerazy oraz determinując długość powstałego ampliconu. Startery

warunkują działanie polimerazy. Wydłuża ona nić i przyłącza nukleotydy do końca 3' istniejącego już łańcucha nukleotydowego. Startery powinny posiadać odpowiednią zawartość zasad GC (50-60%) oraz podobną temperaturę topnienia, mieszczącą się w zakresie 55-72°C (Słomski, 2004).



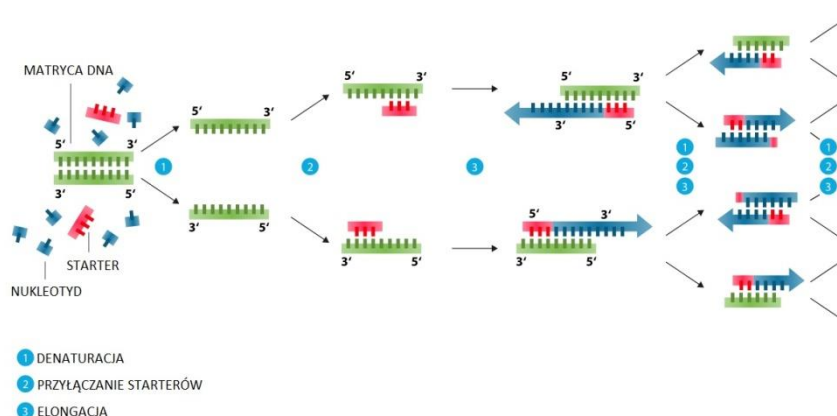
Rysunek 11. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR oraz uproszczony schemat przebiegu (źródło: www.primogenomic.com/nucleic_acid_test.html, zmodyfikowano)

Klasyczna reakcja PCR przebiega w następujących etapach (Rysunek 11):

1. Denaturacja DNA – polega na podgrzewaniu komory reakcyjnej do temperatury 94-98°C na 20-30 sekund. Powoduje to rozdzielenie podwójnej nici DNA w wyniku hydrolizy wiązań pomiędzy komplementarnymi zasadami, w wyniku czego powstają dwie pojedyncze nici.
2. Przyłączanie starterów (z ang. *annealing*) – temperatura jest obniżana do 50-62°C na 20-40 sekund, pozwalając na przyłączenie starterów do każdej z pojedynczych nici. Bardzo ważne jest ustalenie odpowiedniej temperatury przyłączania starterów, która powinna być wystarczająco niska, aby pozwolić na przyłączenie startera do nici, a zarazem wystarczająco wysoka, aby startery przyłączyły się jedynie

w idealnie komplementarnym miejscu i nigdzie indziej. Zazwyczaj stosuje się temperaturę o 3-5°C niższą od temperatury topnienia użytych starterów.

3. Elongacja – proces przyłączania nukleotydów przy udziale polimerazy. Stosowana temperatura jest zależna od rodzaju użytej polimerazy. Jest to najczęściej temperatura pomiędzy 75-80°C, a dla termostabilnej polimerazy Taq wynosi 72°C.



Rysunek 12. Schemat przebiegu reakcji PCR (By Enzoklop - Ownwork, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32003643>, zmodyfikowano).

Wszystkie trzy etapy reakcji PCR powtarzane cyklicznie prowadzą do powstania setek kopii namnażanego odcinka DNA. Każda nić, do której przyłączył się starter, a polimeraza dobudowała nukleotydy, staje się w następnym cyklu matrycą, w związku z czym ilość powstających fragmentów DNA rośnie wykładniczo (Rysunek 12). Po 30 cyklach pojedynczą kopię DNA można zwiększyć do miliona kopii (Saiki i wsp., 1988).

Jednym z częstszych błędów jest zastosowanie zbyt wielu cykli reakcji, gdyż dochodzi do powstawania produktów ubocznych. Przy braku produktu przy 35 cyklach należy raczej poprawić wydajność reakcji niż ją wydłużać (Słomski, 2004). Reakcja przebiega zaplanowaną ilość cykli, chyba, że dojdzie do wyczerpania jednego ze składników mieszaniny reakcyjnej. Brak starterów czy nukleotydów powoduje zatrzymanie reakcji. Podobnie dzieje się, gdy polimeraza DNA traci swoją aktywność.

Czynnikiem kluczowym, wpływającym w ogromnym stopniu na efektywność procesu jest polimeraza DNA. Polimerazy różnią się wydajnością, dokładnością oraz aktywnością endonukleazową. Stosowanie zbyt dużej ilości polimerazy może prowadzić do powstawania produktów niespecyficznych. Zbyt mała ilość z kolei może

skutkować brakiem produktu. Polimerazy nie odtwarzają komplementarnych sekwencji z pełną dokładnością. Dlatego zaleca się stosowanie polimeraz z wysoką aktywnością endonukleazową, dzięki czemu zastosowany enzym ma możliwość korekcji błędnie wprowadzonych nukleotydów. Przykładowo, błąd przyłączenia niekomplementarnego nukleotydu może wynosić od 1/10000 do 1/100000 nukleotydów (Słomski, 2004).

Do przeprowadzenia reakcji PCR stosuje się termocykler. Jest to urządzenie zawierające blok grzejny, dzięki któremu możliwe jest utrzymanie konkretnej temperatury przez określony czas. Możliwa jest również szybka zmiana temperatur, co umożliwia szybkie przechodzenie pomiędzy etapami reakcji. Nowoczesne termocyklery posiadają kilka bloków grzejnych, pozwalając na równoległe prowadzenie kilku reakcji w różnych warunkach (Skotarczak i Adamska, 2006).

2.3.1.2.2. Zasada metody elektroforezy kwasów nukleinowych

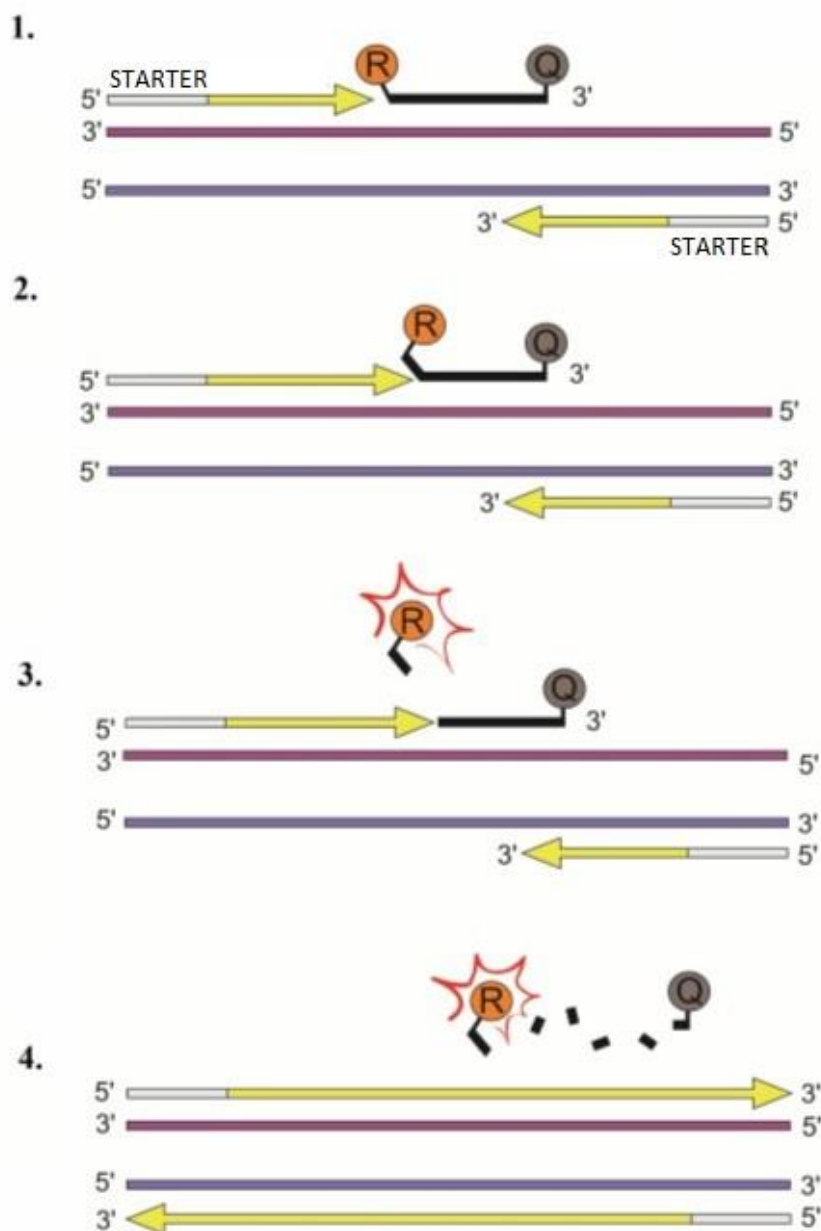
Do identyfikacji i wizualizacji powstałych w wyniku klasycznej metody PCR produktów służy elektroforeza. Polega ona na rozdziale otrzymanych cząsteczek w żelu w polu elektrycznym. Migracja cząsteczek zachodzi z różną prędkością – zależy od wielkości cząsteczki i jej ładunku (odwrotnie proporcjonalnie do jej masy i wprost proporcjonalnie do natężenia pola elektrycznego). Cały proces jest zależny od rodzaju nośnika, natężenia pola, temperatury, rodzaju buforu – jego stężenia i pH. Podczas procesu cząsteczki poruszają się z różną prędkością do jednej z elektrod dzięki czemu następuje ich rozdział. Proces elektroforezy można prowadzić na różnych nośnikach, które powinny być elektrycznie obojętne. Najczęściej stosowanymi są żel poliakrylamidowy oraz żel agarozowy. Polimeryzacja akrylamidu oraz bisakrylamidu jest podstawą do powstania żelu poliakrylamidowego. Elektroferaza z wykorzystaniem tego żelu zazwyczaj odbywa się wertykalnie.

Elektroforeza z wykorzystaniem żelu agarozowego prowadzona jest w aparatach ustawionych poziomo – horyzontalnie. Do produkcji żelu wykorzystywany jest agar czyli polisacharyd wyizolowany z krasnorostów. Agarozę rozpuszcza się w gotującej wodzie, po czym zostala się w temperaturze poniżej 40 st. Celsjusza. Powstały żel ma porowatą budowę. Dzięki czemu pozawala na migrację cząsteczek o różnej wielkości. Porowatą budowę żelu możemy regulować, stosując różne stężenia agarozy. Im większe stężenie, tym mniejsze pory i bogatsze usieciowanie.

2.3.1.2.3. Zasada metody reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (z ang. *Real-Time PCR*) została po raz pierwszy zaprezentowana w 1992 roku przez Higuchi'ego i współautorów (Higuchi i wsp., 1992). Opiera się ona na klasycznej reakcji PCR, jednakże umożliwia namnażanie DNA wraz z monitorowaniem ilości produktu w czasie rzeczywistym. Analiza jakościowa i ilościowa odbywa się tutaj na zasadzie pomiaru fluorescencji emitowanej przez składniki mieszaniny reakcyjnej, przyłączające się do powstających produktów (Rysunek 13). Wzrost fluorescencji może być w sposób ciągły monitorowany po każdym cyklu reakcji. Poziom emisji fluorescencji jest zależny od ilości i typu powstającego produktu reakcji (Higuchi i wsp., 1993).

Do detekcji polimorficznych form genu najczęściej stosuje się podwójnie znakowane sondy (metoda TaqMan). Wykorzystuje się w niej sondę fluorescencyjną swoistą dla danej formy polimorficznej genu. Znakowana jest ona na końcu 5' barwinikiem reporterowym (z ang. *reporter*), takim jak FAM, HEX czy JOE. Na drugim końcu, czyli 3' znajduje się barwnik tłumiący - wygaszacz (z ang. *quencher*): TAMARA, DABCYL. Podczas etapu przyłączania starterów sonda przyłącza się do amplifikowanego fragmentu DNA. Fizyczna odległość między reporterem a wygaszaczem umożliwia przenoszenie energii między fluorochromami i skutkuje hamowaniem emisji sygnału fluorescencji. Na etapie wydłużania starterów sonda zostaje zdegradowana przez polimerazę Taq, mającą aktywność 5'→3' egzonukleazy. Oddzielenie barwnika reporterowego od wygaszacza powoduje wzrost fluorescencji mierzonej przez urządzenie (Słomski, 2004).



Rysunek 13. Schemat reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Metoda hydrolityczna z sondą podwójnie znakowaną (TaqMan). Na obrazku R oznacza reporter , Q oznacza wygaszacz. (źródło: http://www.e-biotechnologia.pl/obrazki/sondy_taqman_real_time_pcr.jpg, zmodyfikowano)

2.3.1.2.4. Wykrywanie polimorfizmu insercyjno-delecyjnego (rs4646994) w genie *ACE*

Do oceny polimorfizmu insercyjno-delecyjnego I/D genu *ACE* w grupie badanej i kontrolnej wykorzystano technikę łańcuchowej reakcji polimerazy oraz elektroforezy kwasów nukleinowych w żelu agarozowym.

Etap pierwszy - reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Mieszanina reakcyjna o objętości 10 μ l zawierała 2 μ l izolatu DNA oraz 8 μ l mieszaniny reakcyjnej, w skład której wchodziły następujące odczynniki: woda sterylana, startery ACE-F (5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3') i ACE-R (5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3') o stężeniu 10 pM każdy (Genomed, Polska), bufor reakcyjny z Mg^{2+} (10x): 700 mM Tris-HCl pH 8.6 / 25 °C, 166 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$ (Novazym, Polska), wodny roztwór trójfosforanów deoksyrybonukleozydów: dATP, dCTP, dGTP, dTTP o stężeniu 2,5 mM każdy (Novazym, Polska), termostabilna AllegroTaq polimeraza DNA z aktywnością 5'-3' egzonukleazy o stężeniu 5 U/ μ l (Novazym, Polska) (Tabela 1).

W celu kontroli czystości odczynników stosowanych w reakcji, a także wykluczenia nieprawidłowości w trakcie trwania amplifikacji, każdorazowo stosowano kontrolę negatywną (ujemną), nie zawierającą w swoim składzie DNA matrycowego (tylko wodę) oraz kontrole pozytywne (dodatnie), zawierające w swoim składzie DNA kontrolne oczekiwanych genotypów, dające po amplifikacji specyficzne produkty określonej długości.

Amplifikację produktów PCR przeprowadzono w termocyklerze C1000 Touch™ Thermal Cycler (Biorad, USA). Profil temperaturowo-czasowy obejmował denaturację wstępną w temperaturze 95°C przez 5 minut oraz 30 cykli składających się z trzech etapów każdy: denaturacji właściwej w temperaturze 92°C przez 1 minutę, przyłączania starterów w temperaturze 58°C przez 1 minutę, a także elongację starterów w temperaturze 72°C przez 2 minuty i 30 sekund. Po zakończeniu reakcji produkty amplifikacji przechowywano w temperaturze 4°C do czasu wykonania dalszych etapów analizy molekularnej.

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej dla genu *ACE* (w przeliczeniu na jedną próbę)

Składniki mieszaniny	Objętość [μ l]
Woda	5,5
Bufor reakcyjny z Mg^{2+}	1,0
ACE-F	0,4
ACE-R	0,4
Mix dNTP	0,6
AllegroTaq Polimeraza DNA	0,1

Etap drugi – elektroforeza agarozowa

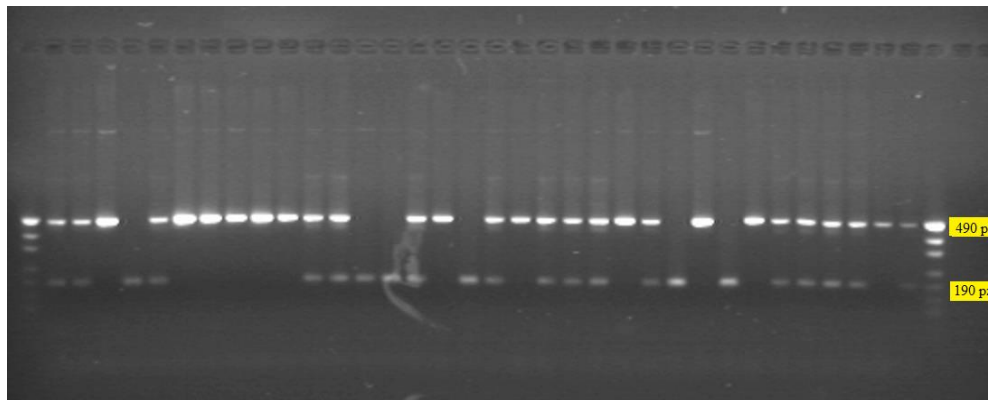
Separację produktów amplifikacji miejsca polimorficznego I/D genu *ACE* dokonano w trakcie elektroforezy w 2,0% żelu agarozowym. Żel przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości agarozy (Prona, Hiszpania) w buforze TAE (1x): 40 mM Tris (pH 8.3), 20 mM kwasu octowego, 1 mM EDTA (Biorad, Niemcy). Do tak przygotowanego żelu dodawano fluorescencyjny barwnik interkalujący EvaGreen (Biorad, USA), wylewano na uszczelniony separatorami stolik z umieszczonymi uprzednio grzebieniami, a następnie pozostawiano do wystygnięcia w celu polimeryzacji żelu.

Następnie stolik z żelem agarozowym umieszczono w waniencie elektroforetycznej SubCell® Model 192 (Biorad, USA) wypełnionej buforem TAE (1x) (Biorad, Niemcy). Do przygotowanych w żelu dołków nakładano produkty amplifikacji obciążone buforem do nakładania prób Nucleic Acid Sample Loading Buffer (5x) (Biorad, USA), do ostatniego dołka w rzędzie dodawano marker mas cząsteczkowych Nova 100 bp DNA ladder (Novazym, Polska). Elektroforezę prowadzono pod napięciem 100 mV przez 60 minut.

Następnie żel umieszczano w komorze trans iluminatora ChemiDocMP™ Imaging System (Biorad, USA), włączano lampę UV i oceniano przybliżoną wielkość rozdzielanych fragmentów DNA na podstawie sygnału fluorescencji dla poszczególnych prób. W celu archiwizacji wykonywano zdjęcie cyfrowe żelu (Zdjęcie 3).

Jeśli obserwowano wyłącznie jeden rodzaj produktu o przybliżonej wielkości 490 pz to próbę klasyfikowano jako genotyp II, jeśli obserwowano wyłącznie jeden

rodzaj produktu o przybliżonej wielkości 190 pz to próbę klasyfikowano jako genotyp DD, natomiast gdy obserwowano dwa rodzaje produktów (wielkości 490 pz oraz 190pz) to próba była określana jako genotyp ID.



Zdjęcie 3. Zdjęcie żelu agarozowego po wykonaniu elektroforezy. Jeden produkt o długości 490 pz – genotyp II, jeden produkt o długości 190 pz – genotyp DD, dwa produkty (490 pz oraz 190 pz) – genotyp ID.

2.3.1.2.5. Wykrywanie polimorfizmu R577X (rs1815739) w genie *ACTN3*

W celu określenia genotypów badanych osób zastosowano technikę łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Wizualizacja przyrostu produktów dokonywana była dzięki wykorzystaniu strategii opartej na analizie emisji fali świetlnej fluorescencyjnych sond molekularnych typu TaqMan, których działanie oparte jest na zjawisku bezpromienistego transferu energii (z ang. FRET, ang. *fluorescence resonance energy transfer*).

W czasie analizy korzystano z komercyjnego zestawu zawierającego dwa rodzaje starterów oraz 2 rodzaje sond typu TaqMan (TaqMan® SNP Genotyping Assay nr C____590093_1_, Thermofisher Scientific, USA). Sondy znakowane były na końcu 5' dwoma rodzajami barwników fluorescencyjnych. Barwnikiem reporterowym FAM o emisji fali świetlnej długości 517 nm, dla którego sygnał odczytywano na kanale 1 wybarwione były sondy dedykowane dla allelu R, natomiast barwnikiem reporterowym VIC o emisji fali świetlnej długości 551 nm, dla którego sygnał odczytywano na kanale 2 wybarwione były sondy dedykowane dla allelu X. Mieszanina reakcyjna o objętości 10 µl zawierała 2 µl izolatu DNA oraz 8 µl mieszaniny reakcyjnej, w skład której wchodziły następujące odczynniki: woda sterylna, zestaw TaqMan® SNP Genotyping Assay nr C____590093_1_, 20x (Thermofisher Scientific, USA), bufor reakcyjny z Mg^{2+} (10x): 700 mM Tris-HCl pH 8.6 / 25 °C, 166 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$

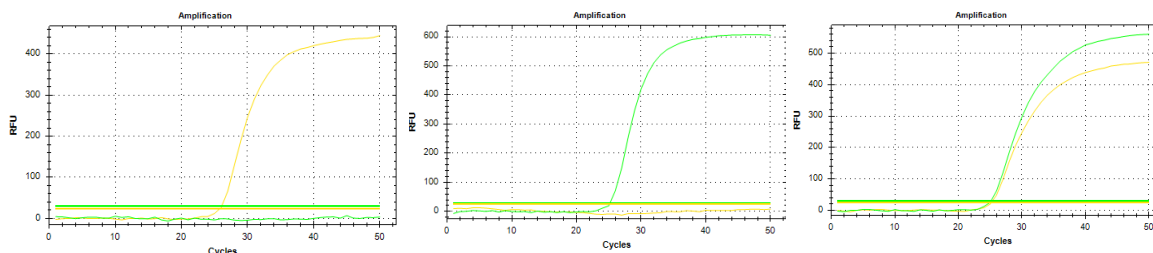
(Novazym, Polska), wodny roztwór trójfosforanów deoksyrybonukleozydów: dATP, dCTP, dGTP, dTTP o stężeniu 2,5 mM każdy (Novazym, Polska), termostabilna AllegroTaq Polimeraza DNA z aktywnością 5'-3'egzonukleazy o stężeniu 5 U/μL (Novazym, Polska) (Tabela 2).

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej na genu *ACTN3* (w przeliczeniu na jedną próbę)

Składniki mieszaniny	Objętość[μl]
Woda	5,7
Bufor reakcyjny z Mg ²⁺	1,0
TaqMan® SNP Genotyping Assay C____590093_1_	0,6
Mix dNTP	0,6
AllegroTaq Polimeraza DNA	0,1

W celu kontroli czystości odczynników stosowanych w reakcji, a także wykluczenia nieprawidłowości w trakcie trwania amplifikacji, każdorazowo stosowano kontrolę negatywną (ujemną), nie zawierającą w swoim składzie DNA matrycowego (tylko wodę) oraz kontrole pozytywne (dodatnie) zawierające w swoim składzie DNA kontrolne oczekiwanych genotypów, dające po amplifikacji specyficzne produkty reakcji w postaci przyrostu fluorescencji dla poszczególnych kanałów.

Analizę genotypowania przeprowadzono w termocyklerze CFX Connect™ Real-Time System (Biorad, USA). Profil temperaturowo-czasowy obejmował denaturację wstępną w temperaturze 95°C przez 5 minut oraz 50 cykli składających się z dwóch etapów każdy: denaturacji w temperaturze 92°C przez 15 sekund oraz przyłączania starterów i sond, a także elongacji starterów w temperaturze 60°C przez 1 minutę. W trakcie trwania analizy przyrost ilości produktów w badanych próbach obserwowano po każdym cyklu na ekranie komputera. Po 50 cyklach reakcji odczytano wyniki (Rysunek 14). Jeśli rejestrowano wyłącznie sygnał fluorescencji na kanale 1 (barwnik reporterowy FAM o emisji fali świetlnej długości 517 nm) to próbę klasyfikowano jako genotyp RR, jeśli odnotowywano fluorescencję wyłącznie na kanale 2 (barwnik reporterowy VIC o emisji fali świetlnej długości 551 nm) próbę opisywano jako genotyp XX, natomiast, gdy sygnał obserwowano na obydwu kanałach jednocześnie, próba była określana jako genotyp RX.



Rysunek 14. Przykładowy wynik genotypowania przeprowadzony w punkcie polimorficznym rs1815739 w genie *ACTN3*. Od lewej: krzywa fluorescencji obserwowana dla próby o genotypie homozygoty typu RR (sygnał na kanale żółtym), krzywa fluorescencji obserwowana dla próby o genotypie homozygoty typu XX (sygnał na kanale zielonym), krzywa fluorescencji obserwowana dla próby o genotypie heterozygoty RX (sygnał na kanale zielonym i żółtym).

2.3.2. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone pod kierunkiem dra hab. Mariusza Kaczmarczyka, prof. AWFIS, z Pracowni Medycyny Fizykalnej w Katedrze Sportu Powszechnego Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku.

Z uwagi na charakterystykę materiału badanego (próby materiału biologicznego pobrane od sportowców wysokokwalifikowanych), większość obliczeń statystycznych była oparta o metody nieparametryczne. Zgodność częstości genotypów z teoretycznym rozkładem ustalonym zgodnie z prawem Hardy-Weinberga badano za pomocą testu χ^2 z liczbą stopni swobody (df, z ang. *degree of freedom*) równą 1. Częstości alleli obliczano na podstawie obserwowanej liczby genotypów. Częstości genotypów i alleli pomiędzy grupami porównywano za pomocą testu χ^2 lub dokładnego testu Fischera. Wartości ilorazu szans (OR, z ang. *odds ratio*) wraz z 95% przedziałem ufności (95% CI, z ang. *confidence interval*) obliczano za pomocą regresji logistycznej. Powyższe analizy przeprowadzono w programie Statistica (Dell Inc., version 13, software.dell.com). Interakcje międzygenowe (*ACE* x *ACTN3*) analizowano za pomocą modułu *SNPassoc* w wersji 1.9.2 dla pakietu statystycznego R (wersja 3.1.0, <https://cran.r-project.org>) dla 3 modeli: kodominującego, dominującego oraz recesywnego (modele dominujące i recesywne zostały utworzone w odniesieniu do alleli I oraz X, odpowiednio dla polimorfizmu genu *ACE* i *ACTN3*). Istotność interakcji *ACE* x *ACTN3* testowano za pomocą testu ilorazu wiarygodności (LRT, z ang. *likelihood ratio test*), w którym statystyka testowa wyrażona jest wzorem:

$$\chi^2 = -2 * (\log L_P - \log L_A),$$

gdzie L_P to maksimum funkcji największej wiarygodności dla modelu pełnego (z uwzględnieniem epistazy), L_A to maksimum funkcji największej wiarygodności dla modelu addycyjnego bez interakcji (epistazy), dla liczby stopni swobody równej różnicy liczby zmiennych modelu pełnego i modelu zredukowanego (bez interakcji).

3. Wyniki

3.1. Wyniki genotypowania polimorfizmu insercyjno-delecyjnego (rs4646994) w genie *ACE*

W całej grupie (u sportowców i w grupie kontrolnej) częstości genotypów opisywanych dla polimorfizmu genu *ACE* były zgodne z częstościami oczekiwanymi zgodnie z prawem Hardy-Weinberga (*ACE*: $\chi^2=0,53$, $p=0,467$). W poszczególnych grupach sportowców i w grupie kontrolnej brak odchyleń od oczekiwanych częstości genotypów zaobserwowano dla polimorfizmu *ACE*: $\chi^2=0,53$, $p=0,467$ (LDC, długodystansowi kolarze, $n=105$), $\chi^2=1,98$, $p=0,159$ (LDS, długodystansowi pływacy, $n=42$), $\chi^2=0,01$, $p=0,920$ (LIFT, sztangiści, $n=77$), $\chi^2=1,06$, $p=0,303$ (SDC, krótkodystansowi kolarze, $n=34$), $\chi^2=0,32$, $p=0,572$ (SDS, krótkodystansowi pływacy, $n=101$), $\chi^2=0,05$, $p=0,823$ (Kon, grupa kontrolna, $n=281$).

W Tabeli 3 przedstawiono wyniki porównania częstości genotypów i alleli analizowanego polimorfizmu w genie *ACE* w sportach wytrzymałościowych (LD, $n=147$) oraz szybkościowo-siłowych (SD+LIFT, $n=212$), względem grupy kontrolnej (Kon, $n=281$). Częstość genotypów i alleli polimorfizmu insercyjno-delecyjnego nie różniła się istotnie pomiędzy grupami sportowców a grupą kontrolną.

W Tabeli 4 zestawiono wyniki porównania genotypów i alleli z uwzględnieniem podziału na poszczególne dyscypliny sportowe. Z wyjątkiem grupy LIFT częstość genotypów i alleli polimorfizmu *ACE* różniła się pomiędzy grupami sportowców i grupą kontrolną. Częstość allelu I była istotnie mniejsza u długodystansowych kolarzy (LDC, 34,8%) i istotnie większa u długodystansowych pływaków (LDS, 82,1%) w porównaniu do grupy kontrolnej (34,8% vs 44,7%, $p=0,013$; 82,1% vs 44,7%, $p=0,0001$, odpowiednio dla LDC i LDS). Podobnie, częstość allelu I była istotnie mniejsza w grupie krótkodystansowych kolarzy (SDC, 25,0%), a większa w grupie krótkodystansowych pływaków (SDS, 54,0%), niż w grupie kontrolnej (25,0% vs 44,7%, $p=0,002$, 54,0% vs 44,7%, $p=0,023$, odpowiednio dla SDC i SDS).

Tabela 3. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów ACE u sportowców i w grupie kontrolnej

Grupa	II (n=141)	ID (n=309)	DD (n=190)	p vs Kon	I (n=591)	D (n=689)	p vs Kon
LD (n=147)	38 (25,9%)	66 (44,9%)	43 (29,3%)	p=0,418 p _{DOM} =0,715 p _{REC} =0,188	142 (48,3%)	152 (51,7%)	0,311
SD+LIFT (n=212)	46 (21,7%)	106 (50,0%)	60 (28,3%)	p=0,802 p _{DOM} =0,523 p _{REC} =0,702	198 (46,7%)	226 (53,3%)	0,525
Kon (n=281)	57 (20,3%)	137 (48,8%)	87 (31,0%)	---	251 (44,7%)	311 (55,3%)	---

LD – LDC+LDS (długodystansowi kolarze i długodystansowi pływacy); SD+LIFT – krótkodystansowi kolarze, krótkodystansowi pływacy (SDC+SDS) i sztangiści; Kon – grupa kontrolna; p_{DOM} – II+ID *versus* DD, p_{REC} – DD+ID *versus* II, p_{DOM} – XX+RX *versus* RR, p_{REC} – RR+RX *versus* XX

Tabela 4. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów *ACTN3* u sportowców i w grupie kontrolnej

Grupa	XX (n=105)	RX (n=309)	RR (n=226)	p vs Kon	X (n=436)	R (n=844)	p vs Kon
LD (n=147)	45 (30,6%)	75 (51,0%)	27 (18,4%)	p<0,0001 p _{DOM} <0,0001 p _{REC} =0,00009	117 (39,8%)	177 (60,2%)	0,172
SD+LIFT (n=212)	19 (9,0%)	109 (51,4%)	84 (39,6%)	p=0,110 p _{DOM} =0,770 p _{REC} =0,058	122 (28,8%)	302 (71,2%)	0,037
Kon (n=281)	41 (14,6%)	125 (44,5%)	115 (40,9%)	---	197 (35,1%)	365 (64,9%)	---

LD – LDC+LDS (długodystansowi kolarze i długodystansowi pływacy); SD+LIFT – krótkodystansowi kolarze, krótkodystansowi pływacy (SDC+SDS) i sztangiści; Kon – grupa kontrolna; p_{DOM} – II+ID *versus* DD, p_{REC} – DD+ID *versus* II, p_{DOM} – XX+RX *versus* RR, p_{REC} – RR+RX *versus* XX

3.2. Wyniki genotypowania polimorfizmu R577X (rs1815739) w genie ACTN3

W całej grupie (u sportowców i w grupie kontrolnej) częstości genotypów opisywanych dla polimorfizmu w genie *ACTN3* były zgodne z częstościami oczekiwanymi zgodnie z prawem Hardy-Weinberga (*ACTN3*: $\chi^2=0$, $p=1,0$). Zgodność z prawem Hardy-Weinberga zanotowano dla grup LDC ($\chi^2=0,21$, $p=0,647$), LDS ($\chi^2=0,01$, $p=0,920$), SDC ($\chi^2=0,29$, $p=0,590$) i grupy kontrolnej ($\chi^2=0,54$, $p=0,462$), podczas gdy w grupach LIFT ($\chi^2=4,88$, $p=0,027$) i SDS ($\chi^2=19,8$, $p=0,000009$), obserwowane częstości genotypów różniły się istotnie od częstości teoretycznych. W Tabeli 5 przedstawiono wyniki porównania częstości genotypów i alleli analizowanego polimorfizmu w genie *ACTN3* w sportach wytrzymałościowych (LD, $n=147$) oraz szybkościowo-siłowych (SD+LIFT, $n=212$), względem grupy kontrolnej (K, $n=281$). Zostały zaobserwowane istotne statystycznie różnice dla polimorfizmu genu *ACTN3*. Częstość genotypów, ale nie alleli, różniła się istotnie pomiędzy grupą LD i grupą kontrolną dla każdego z trzech analizowanych modeli genetycznych (tj. ogólnego – XX vs RX vs RR, dominującego - RR+RX vs XX oraz recesywnego - RR vs XX+RX). Częstość występowania genotypu XX u sportowców (LD) w odniesieniu do kontroli była ponad 2,5 razy większa w porównaniu do nosicieli allelu R (OR=2,58, 95% CI 1,59-4,18, $p=0,00009$), podczas gdy stosunek sportowców (LD) do kontroli wśród nosicieli allelu X (XX+RX) był ponad 3 krotnie większy w porównaniu do homozygot RR (OR=3,08, 95% CI 1,90-4,98, $p<0,0001$). Częstość genotypów *ACTN3* wśród sportowców rywalizujących w dyscyplinach wymagających szybkości i siły (SD+LIFT) nie różniła się istotnie w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaobserwowano natomiast różnicę w częstości alleli na korzyść allelu R w grupie SD+LIFT (71,2 % vs 64,9%, $p=0,037$, OR=1,34, 95% CI 1,02-1,75).

Tabela 5. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów ACE u sportowców i w grupie kontrolnej z uwzględnieniem dyscyplin sportowych

Grupa	II (n=141)	ID (n=309)	DD (n=190)	p vs Kon	I (n=591)	D (n=689)	p vs Kon
LDC (n=105)	11 (10,5%)	51 (48,6%)	43 (40,9%)	p=0,040 p _{DOM} =0,065 p _{REC} =0,024	73 (34,8%)	137 (65,2%)	0,013
LDS (n=42)	27 (64,3%)	15 (35,7%)	0 (0%)	p<0,0001 p _{DOM} =0,00002 p _{REC} <0,0001	69 (82,1%)	15 (17,9%)	0,0001
LIFT (n=77)	17 (22,1%)	38 (49,4%)	22 (28,6%)	p=0,899 p _{DOM} =0,686 p _{REC} =0,731	72 (46,8%)	82 (53,2%)	0,644
SDC (n=34)	1 (2,9%)	15 (44,1%)	18 (52,9%)	p=0,009 p _{DOM} =0,010 p _{REC} =0,014	17 (25,0%)	51 (75,0%)	0,002
SDS (n=101)	28 (27,7%)	53 (52,5%)	20 (19,8%)	p=0,069 p _{DOM} =0,032 p _{REC} =0,123	109 (54,0%)	93 (46,0%)	0,023
Kon (n=281)	57 (20,3%)	137 (48,8%)	87 (30,9%)	---	251 (44,7%)	311 (55,3%)	---

LDC – długodystansowi kolarze; LDS – długodystansowi pływacy; LIFT – sztangiści; SDC – krótkodystansowi kolarze; SDS – krótkodystansowi pływacy; Kon – grupa kontrolna; p_{DOM} – II+ID *versus* DD, p_{REC} – DD+ID *versus* II, p_{DOM} – XX+RX *versus* RR, p_{REC} – RR+RX *versus* XX

Tabela 6. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów *ACTN3* u sportowców i w grupie kontrolnej z uwzględnieniem dyscyplin sportowych

Grupa	XX (n=105)	RX (n=309)	RR (n=226)	p vs Kon	X (n=436)	R (n=844)	p vs Kon
LDC (n=105)	32 (30,5%)	54 (51,4%)	19 (18,1%)	p=0,00001 p _{DOM} =0,00003 p _{REC} =0,0004	83 (39,5%)	127 (60,5%)	0,250
LDS (n=42)	13 (30,9%)	21 (50,0%)	8 (19,1%)	p=0,005 p _{DOM} =0,006 p _{REC} =0,008	34 (40,5%)	50 (59,5%)	0,333
LIFT (n=77)	12 (15,6%)	25 (32,5%)	40 (51,9%)	p=0,148 p _{DOM} =0,084 p _{REC} =0,828	64 (41,6%)	90 (58,4%)	0,137
SDC (n=34)	5 (14,7%)	18 (52,9%)	11 (32,4%)	p=0,596 p _{DOM} =0,335 p _{REC} =0,084	21 (30,9%)	47 (69,1%)	0,495
SDS (n=101)	2 (1,9%)	66 (65,4%)	33 (32,7%)	p=0,0001 p _{DOM} =0,144 p _{REC} =0,0006	37 (18,3%)	165 (81,7%)	0,0001
Kon (n=281)	41 (14,6%)	125 (44,5%)	115 (40,9%)	---	197 (35,1%)	365 (64,9%)	---

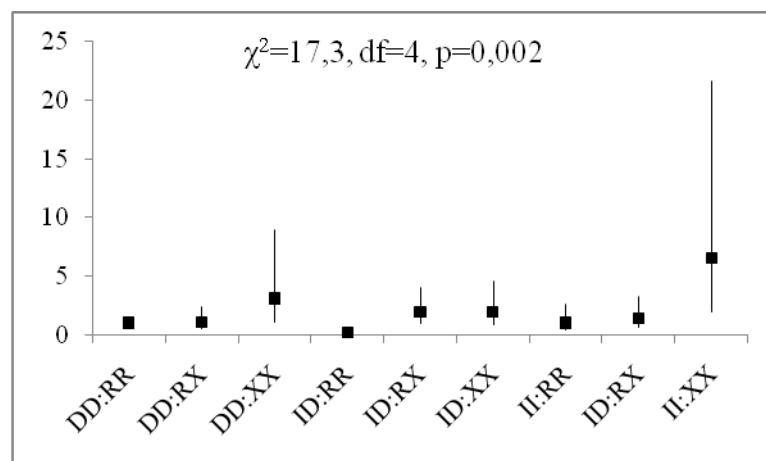
LDC – długodystansowi kolarze; LDS – długodystansowi pływacy; LIFT – sztangiści; SDC – krótkodystansowi kolarze; SDS – krótkodystansowi pływacy; Kon – grupa kontrolna; p_{DOM} – II+ID *versus* DD, p_{REC} – DD+ID *versus* II, p_{DOM} – XX+RX *versus* RR, p_{REC} – RR+RX *versus* XX

W Tabeli 6 zestawiono wyniki porównania genotypów i alleli z uwzględnieniem podziału na poszczególne dyscypliny sportowe. Dla polimorfizmu *ACTN3* istotne różnice w częstości genotypów zaobserwowano dla grup LDC, LDS i SDS, podczas gdy różnice w częstości alleli stwierdzono jedynie dla grupy SDS. W analizie genotypowej stwierdzono (w porównaniu do grupy kontrolnej) nadreprezentację genotypów zawierających allel X w grupach sportowców rywalizujących na długich dystansach (LDC: model dominujący (XX+RX) – 81,9% vs 59,1%, $p_{DOM}=0,00003$, model recesywny (XX) – 30,5% vs 14,6%, $p_{REC}=0,0004$; LDS: model dominujący (XX+RX) – 80,9% vs 59,1%, $p_{DOM}=0,006$, model recesywny (XX) – 30,9% vs 14,6%, $p_{REC}=0,008$). Jednak nadreprezentacja allelu X w stosunku do grupy kontrolnej nie była istotna statystycznie (LDC: 39,5% vs 35,1%, $p=0,250$; LDS: 40,5% vs 35,1%, $p=0,333$). Nadreprezentację allelu R w stosunku do grupy kontrolnej stwierdzono wśród sportowców rywalizujących na krótkich dystansach, ale tylko wśród pływaków (SDS) różnica w częstości alleli osiągnęła istotność statystyczną (81,7% vs 64,9%, $p=0,0001$). Dodatkowo w tej grupie zaobserwowano ponad 7-krotnie mniejszą częstość genotypu XX w porównaniu do grupy kontrolnej (1,9% vs 14,6%, $p_{REC}=0,0006$).

3.3. Analiza oddziaływań międzygenowych dla kombinacji genotypów I/D *ACE* oraz R577X *ACTN3*

W Tabeli 7 przedstawiono wyniki analizy oddziaływań międzygenowych dla trzech modeli genetycznych, tj. kodominującego (*ACE*: II vs ID vs DD, *ACTN3*: XX vs RX vs RR), dominującego (*ACE*: II+ID vs DD, *ACTN3*: XX+RX vs RR) oraz recesywnego (*ACE*: II vs DD+ID, *ACTN3*: XX vs RR+RX), dla dwóch zmiennych zależnych dychotomicznych (dwustanowych), będących odzwierciedleniem przynależności do grupy sportowców lub do grupy kontrolnej (LD vs K, SD+LIFT vs K).

Porównanie sportowców należących do grupy LD z grupą kontrolną ujawniło istnienie interakcji pomiędzy dwoma badanymi genami przy założeniu modelu kodominującego (Wykres 1, $\chi^2=17,3$, $df=4$, $p=0,002$) oraz dominującego (Wykres 2, $\chi^2=6,04$, $df=1$, $p=0,014$) dla tych genów, ale nie dla modelu recesywnego (Wykres 3, $\chi^2=2,13$, $df=1$, $p=0,145$).

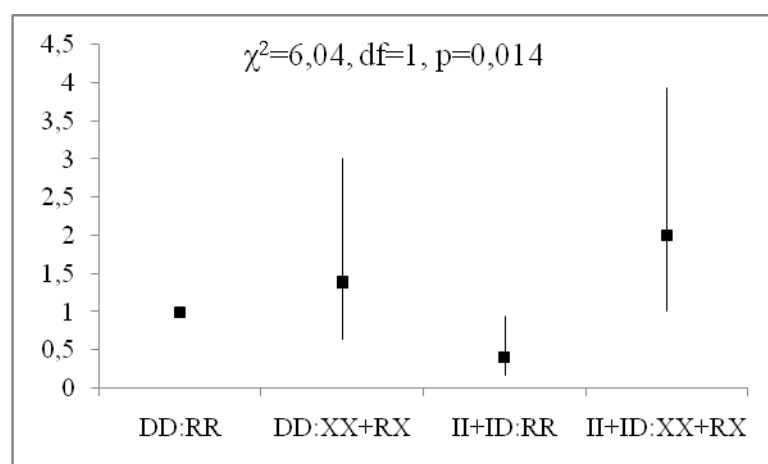


Wykres 1. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy LD w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego

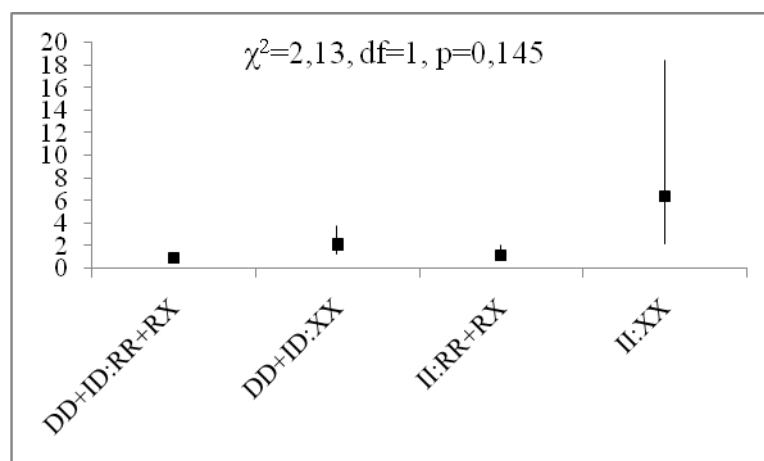
Tabela 7. Interakcja pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3*

<i>ACE</i> x <i>ACTN3</i>		RR		RX		XX		p vs K
		n	OR (95% CI)	n	OR (95% CI)	n	OR (95% CI)	
LD (n=147)	DD	14	1,0	18	1,05 (0,46-2,40)	11	3,06 (1,04-8,97)	0,002 (K) 0,014 (D) 0,145 (R)
	ID	4	0,18 (0,05-0,58)	41	1,93 (0,92-4,06)	21	1,94 (0,84-4,51)	
	II	9	0,98 (0,36-2,63)	16	1,38 (0,58-3,29)	13	6,50 (1,95-21,65)	
SD+LIFT (n=212)	DD	29	1,0	23	0,65 (0,32-1,31)	8	1,07 (0,37-3,13)	0,098 (K) 0,180 (D) 0,799 (R)
	ID	39	0,83 (0,44-1,56)	58	1,32 (0,71-2,45)	9	0,40 (0,16-0,99)	
	II	16	0,84 (0,38-1,88)	28	1,17 (0,57-2,38)	2	0,48 (0,09-2,67)	
Kon (n=281)	DD	35	-	43	-	9	-	---
	ID	57	-	53	-	27	-	
	II	23	-	29	-	5	-	

LD – LDC+LDS (długodystansowi kolarze i długodystansowi pływacy);
SD+LIFT – krótkodystansowi kolarze, krótkodystansowi pływacy (SDC+SDS)
i sztangiści; Kon – grupa kontrolna; K – model kodominujący, D – model dominujący,
R – model recesywny (w odniesieniu do alleli I oraz X)



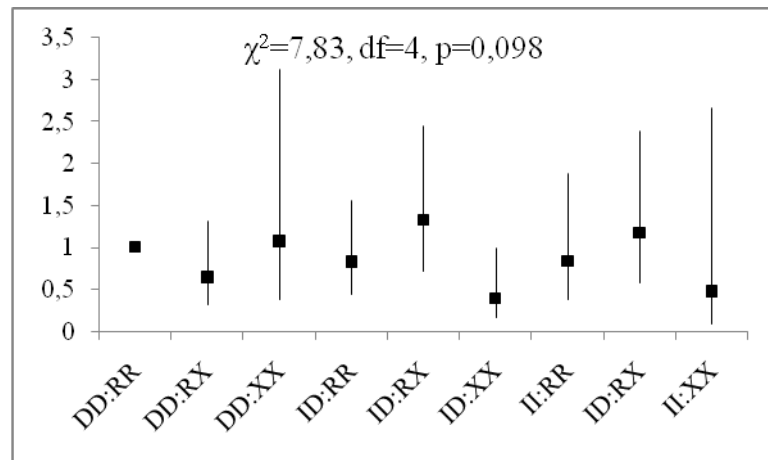
Wykres 2. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy LD w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego



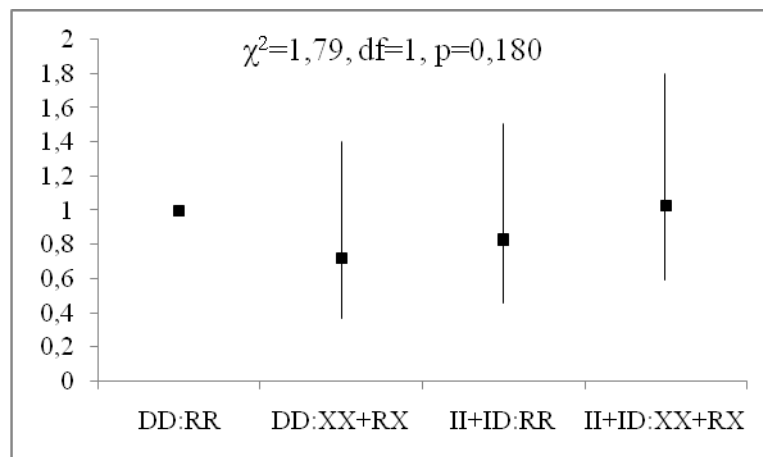
Wykres 3. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy LD w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego

Dla modelu kodominującego wartości ilorazu szans mieściły się w zakresie 0,18 (dla kombinacji genotypów ID:RR) i 6,50 (dla II:XX, Wykres 1) oraz w zakresie 0,41 (II+ID:RR) i 2,00 (II+ID:XX+RX) w przypadku modelu dominującego (Wykres 2). Stosunek sportowców (LD) do kontroli wśród osób o układzie genotypowym II:XX był 6,5 razy większy w porównaniu do podwójnych homozygot DD:RR (OR=6,50, 95% CI 1,95-21,65, $p=0,002$ [dwustronny dokładny test Fischera]), podczas gdy stosunek sportowców (LD) do kontroli wśród osób o genotypie ID:RR był ponad 5,5 krotnie mniejszy w porównaniu do podwójnych homozygot DD:RR (OR=0,18, 95% CI 0,05-0,58, $p=0,034$ [dwustronny dokładny test Fischera]). Nie stwierdzono natomiast interakcji dla zmiennej odzwierciedlającej przynależność do grupy sportowców (SD+LIFT) lub do grupy kontrolnej (model kodominujący, $\chi^2=7,82$, $df=4$, $p=0,098$,

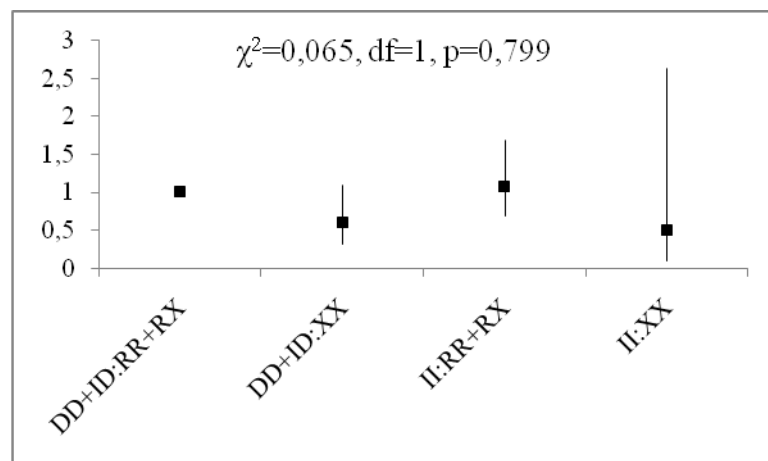
Wykres 4; model dominujący, $\chi^2=1,79$, $df=1$, $p=0,180$, Wykres 5; model recesywny, $\chi^2=0,065$, $df=1$, $p=0,799$, Wykres 6).



Wykres 4. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego



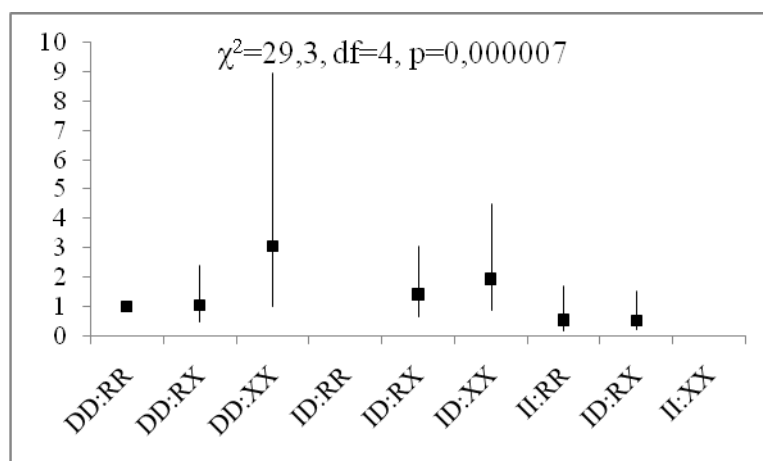
Wykres 5. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego



Wykres 6. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego

Wyniki analizy interakcji *ACE* x *ACTN3* dla poszczególnych dyscyplin (z wyjątkiem grup LDS i SDC, ze względu na niedostateczną liczebność grup, odpowiednio 42 i 34) przedstawiono w Tabeli 8 oraz na wykresach 7-15.

Analizując grupę LDC wchodzącą w skład grupy LD stwierdzono istotne interakcje dla każdego rozpatrywanego modelu genetycznego: kodominującego, $\chi^2=29,3$, $df=4$, $p=0,000007$ (Wykres 7), dominującego, $\chi^2=8,58$, $df=1$, $p=0,003$ (Wykres 8); recesywnego, $\chi^2=3,98$, $df=1$, $p=0,046$ (Wykres 9). Wartości ilorazu szans mieściły się w przedziale 0,52 (II:RX)-3,06 (DD:XX) dla modelu kodominującego (Wykres 7), 0,16 (II+ID:RR)-1,39 (DD:XX+RX) dla modelu dominującego (Wykres 8) oraz 0,64 (II:RR+RX)-2,70 (DD+ID:XX) dla modelu recesywnego (Wykres 9).

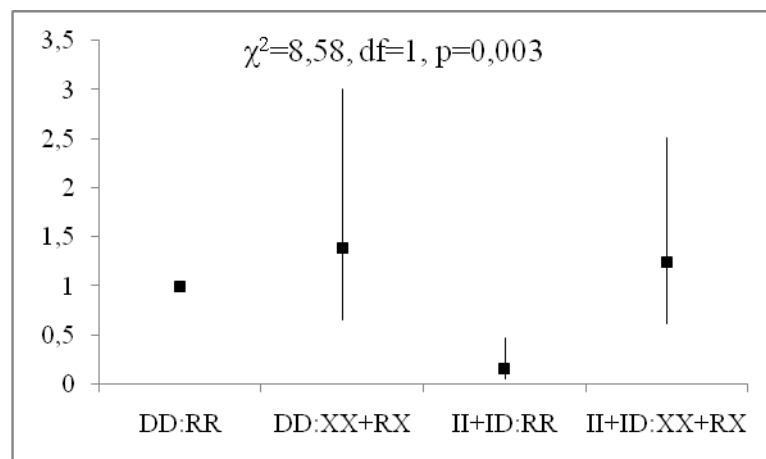


Wykres 7. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy LDC w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego

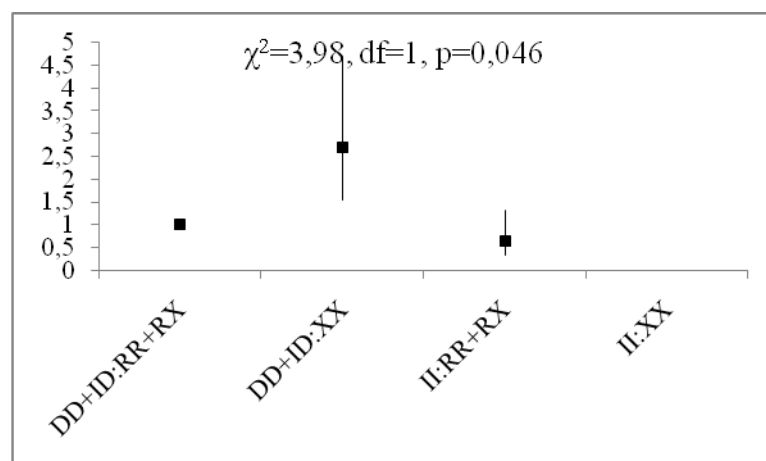
Tabela 8. Interakcja pomiędzy ACE i ACTN3 z uwzględnieniem poszczególnych dyscyplin

ACE x ACTN3		RR		RX		XX		p vs Kon
		n	OR (95% CI)	n	OR (95% CI)	n	OR (95% CI)	
LDC (n=105)	DD	14	1,0	18	1,05 (0,46-2,40)	11	3,06 (1,04-8,97)	0,000007 (K) 0,003 (D) 0,046 (R)
	ID	0	0	30	1,42 (0,66-3,04)	21	1,94 (0,84-4,51)	
	II	5	0,54 (0,17-1,71)	6	0,52 (0,18-1,52)	0	0	
LIFT (n=77)	DD	13	1,0	3	0,19 (0,05-0,71)	6	1,79 (0,53-6,04)	0,028 (K) 0,436 (D) 0,076 (R)
	ID	18	0,85 (0,37-1,95)	14	0,71 (0,30-1,69)	6	0,60 (0,20-1,78)	
	II	9	1,05 (0,39-1,86)	8	0,74 (0,27-2,04)	0	0	
SDS (n=101)	DD	6	1,0	14	1,90 (0,66-5,46)	0	0	0,099 (K) 0,851 (D) 0,009 (R)
	ID	21	2,15 (0,79-5,84)	32	3,52 (1,33-9,30)	0	0	
	II	6	1,52 (0,44-5,30)	20	4,02 (1,43-11,34)	2	2,33 (0,37-14,92)	
Kon (n=281)	DD	35	-	43	-	9	-	---
	ID	57	-	53	-	27	-	
	II	23	-	29	-	5	-	

LDC – długodystansowi kolarze; LIFT – sztangiści; SDS – krótkodystansowi pływacy; Kon – grupa kontrolna, K – model kodominujący, D – model dominujący, R – model recesywny (w odniesieniu do alleli I oraz X)

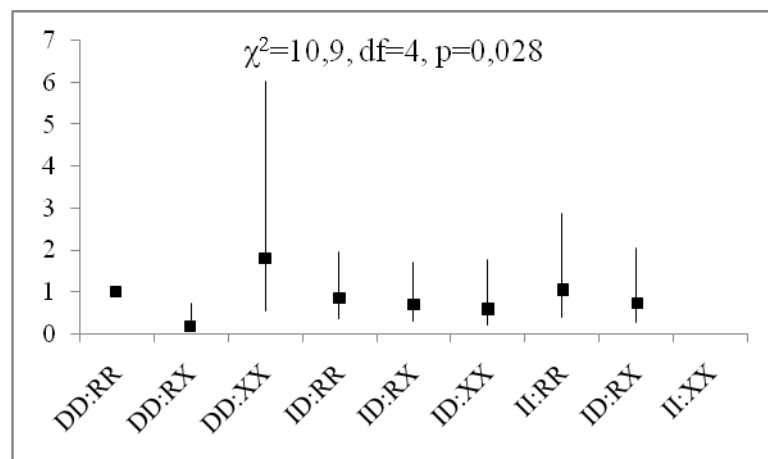


Wykres 8. Analiza interakcji pomiędzy genotypami ACE i ACTN3 u sportowców z grupy LDC w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego

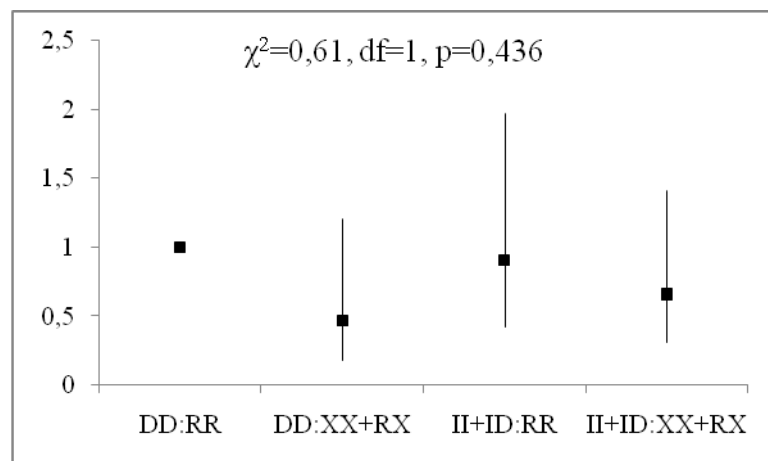


Wykres 9. Analiza interakcji pomiędzy genotypami ACE i ACTN3 u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego

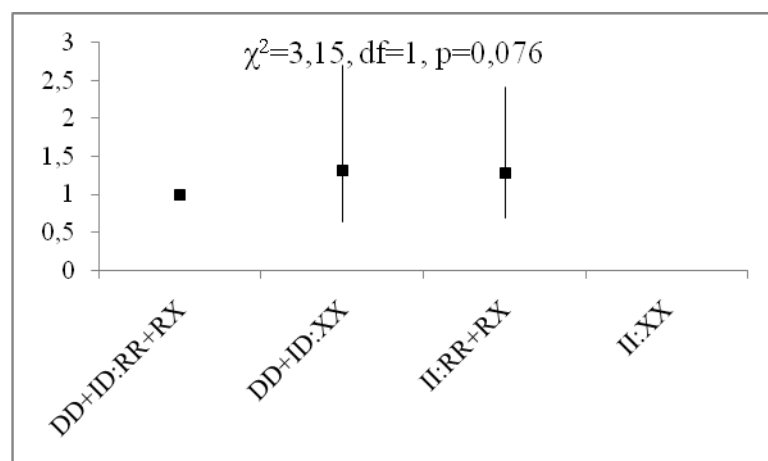
Z kolei, analizując grupy LIFT i SDS, wchodzące w skład grupy SD+LIFT ujawniono interakcje dla modelu kodominującego (LIFT vs K, $\chi^2=10,9$, $df=4$, $p=0,028$, Wykres 10) oraz recesywnego (SDS vs K, $\chi^2=6,78$, $df=1$, $p=0,009$, Wykres 15). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnej interakcji pomiędzy genami (Wykresy 11-14).



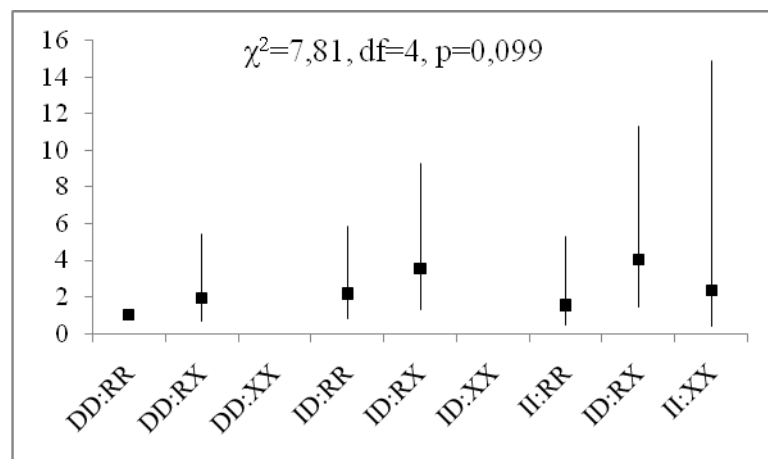
Wykres 10. Analiza interakcji pomiędzy genotypami ACE i ACTN3 u sportowców z grupy LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego



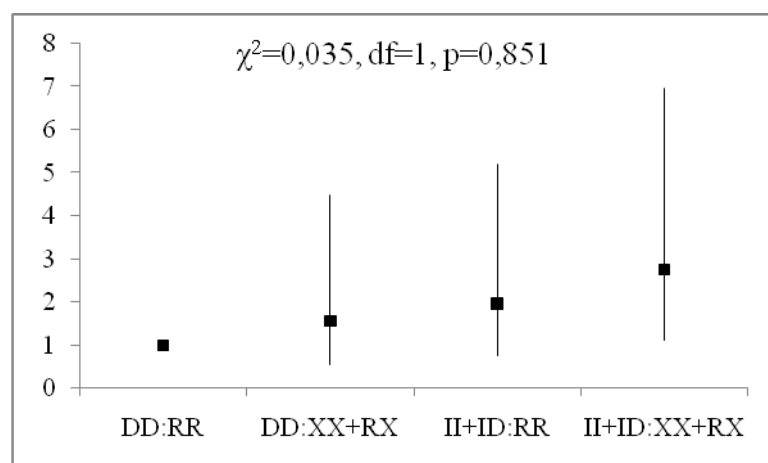
Wykres 11. Analiza interakcji pomiędzy genotypami ACE i ACTN3 u sportowców z grupy LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego



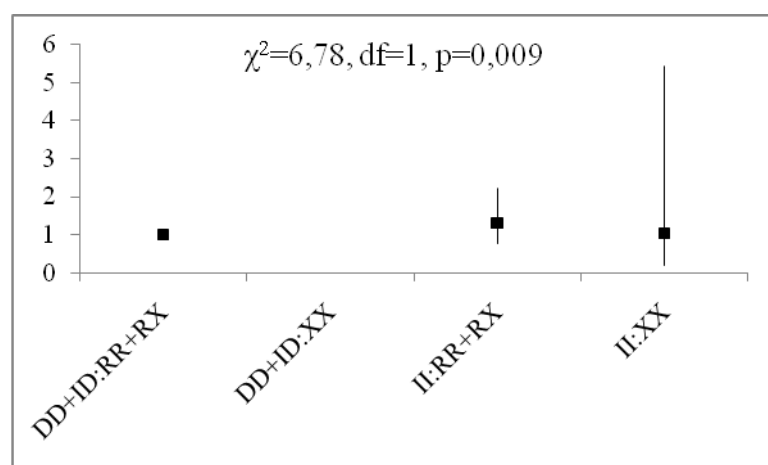
Wykres 12. Analiza interakcji pomiędzy genotypami ACE i ACTN3 u sportowców z grupy LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego



Wykres 13. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy SDS w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego



Wykres 14. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy SDS w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego



Wykres 15. Analiza interakcji pomiędzy genotypami *ACE* i *ACTN3* u sportowców z grupy SDS w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego

4. Dyskusja

Istotą przeprowadzonych badań była weryfikacja następujących hipotez badawczych:

1. Genotyp II genu *ACE* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.
2. Genotyp XX genu *ACTN3* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.
3. Genotyp DD genu *ACE* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym.
4. Genotyp RR genu *ACTN3* występuje w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym.
5. Częstotliwość występowania określonych kombinacji genotypów polimorfizmów genów *ACE* i *ACTN3* jest charakterystyczna dla sportowców realizujących różne wysiłki startowe, co potwierdzone jest przez istotnie statystycznie większą częstotliwość występowania kombinacji genotypów II *ACE* i XX *ACTN3* wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym oraz kombinacji genotypów DD *ACE* i RR *ACTN3* wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym.
6. Wstępny test diagnostyczny skonstruowany z wykorzystaniem układu dwóch polimorfizmów (I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3*) może być stosowany jako test wspomagający w procesie doboru do sportu, będąc źródłem dodatkowych informacji o predyspozycjach osobniczych do wykonywania wysiłków o charakterze wytrzymałościowym i szybkościowo-siłowym.

Poniżej przedstawiono efekty weryfikacji powyższych hipotez.

4.1. Częstość genotypu ACE II u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym

Gen *ACE* kodujący konwertazę angiotensynową jest jednym z najlepiej przebadanych w kontekście osiągania wysokich wyników w sportach wytrzymałościowych. Liczne publikacje wskazują na istotne znaczenie allelu I w dyscyplinach wymagających długotrwałego wysiłku, takich jak wspinaczka wysokogórska, biegi długodystansowe czy wioślarstwo (Ciężczyk i wsp., 2009; Hruskovicova i wsp., 2006; Montgomery i wsp., 1998).

W prezentowanej pracy, w grupie sportowców wytrzymałościowych (LD) nie znaleziono istotnej statystycznie różnicy w rozkładzie genotypów *ACE* I/D w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,418$). Jednak rozpatrując tę grupę z podziałem na poszczególne dyscypliny zarysowują się takowe różnice. W grupie długodystansowych kolarzy LDC ($n=105$), rozkład genotypów różnił się znacząco w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,04$). Rozkład alleli również ($p=0,013$). Jednakże zaskakuje niska częstotliwość występowania genotypu II w porównaniu do grupy kontrolnej (10,5% vs 20,3%) w sporcie typowo wytrzymałościowym, jakim jest kolarstwo długodystansowe. Co ciekawe, bardzo zbliżony procentowy udział genotypu II otrzymał Muniesa i współautorzy (2010) badając grupę światowej klasy wioślarzy wagi lekkiej (10,3%). Z kolei badania Lucia i współautorów (2006) wskazują na wyższe występowanie genotypu DD w grupie pięćdziesięciu światowej klasy hiszpańskich kolarzy w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grupy biegaczy klasy olimpijskiej. Podobna prawidłowość zarysowuje się w rozkładzie alleli, gdzie allel D występuje znacznie częściej w grupie kolarzy niż biegaczy (65% vs 46,3%), co jest bardzo zbliżone do częstości występowania allelu D w niniejszej pracy równej 65,2%. Częstość allelu D równą 63,51% otrzymano również u kolarzy w populacji irańskiej (Shahmoradi i wsp., 2014). Obserwacje te tłumaczy się twierdzeniem, że prawdopodobnie kolarstwo jest kombinacją wysiłku wytrzymałościowego i siłowego (Lucia i wsp., 2001; Maron i Pelliccia, 2006). Bazując na literaturze oraz powyższych wynikach można przypuszczać, że to allel D, a nie I odgrywa istotną rolę w osiąganiu wysokich wyników w kolarstwie (Lucia i wsp., 2006; Shahmoradi i wsp., 2014).

Z kolei Alvarez i współautorzy (2000) w grupie sześćdziesięciu elitarnych sportowców, w tym 25 kolarzy, zauważyli częstsze występowanie allelu I. Wyniki te są

w opozycji do wyżej przytoczonych, prawdopodobnie ze względu na heterogeniczny charakter badanej grupy, składającej się z kolarzy, biegaczy i piłkarzy ręcznych. Ponadto zbyt mała liczebność cyklistów nie pozwala na wyciągnięcie rzetelnych wniosków. Badania Shahmoradiego i współautorów (2014) podobnie jak poprzednie wskazują na częstsze występowanie allelu I w porównaniu do grupy kontrolnej. W tym przypadku badania również oparte były na grupie sportowców z wielu dyscyplin. Jak wcześniej zasugerowano rzetelne, wyniki można uzyskać jedynie badając homogeniczną grupę sportowców o najwyższym poziomie sportowym, uprawiających jedną dyscyplinę (Woods i wsp., 2001).

Zupełnie inaczej wygląda rozkład genotypów w grupie długodystansowych pływaków (LDS, $n=42$). Częstość występowania genotypów różni się znacznie od grupy kontrolnej ($p<0,0001$). W oczy rzuca się znacznie wyższy, procentowy udział genotypu II w porównaniu do grupy kontrolnej (64,3% do 20,3%) a także zupełny brak osób z genotypem DD. Różnice zaznaczają się również w rozkładzie alleli, gdzie znacznie częściej występuje allel I (82,1%) niż allel D (17,9%). Otrzymane wyniki są zgodne z otrzymanymi przez Myersona i współautorów (1999), który wykazał zwiększającą się częstość allelu I u osób pokonujących dłuższy dystans. Częstość występowania allelu I w niniejszej grupie długodystansowych pływaków (LDS), wynosząca 64,3%, jest bardzo zbliżona do otrzymanej w grupie biegaczy rywalizujących na dystansie ponad 5000 m, równej 62% (Myerson i wsp., 1999). Pływania dotyczą również badania Tsianosa i współautorów (2004), przeprowadzone na grupie 35 pływaków startujących na dystansach powyżej 1 km. Wykazano znacznie częstsze występowanie allelu I (59%) w grupie długodystansowców (dystans 25 km) w porównaniu do startujących na dystansach od 1 do 10 km (29%). Jednoznaczny obraz wyników zaburza jedna z publikacji Wanga i współautorów (2013), w której to wykazano znacznie częstsze występowanie allelu I w grupie pływaków na krótkich dystansach w populacji wschodnio-azjatyckiej. Związane jest to z faktem, iż częstotliwość allelu I wśród Chińczyków i Japończyków wynosi odpowiednio 0,3 oraz 0,4 (Ishigami i wsp., 1995). W związku z tym oddziaływanie polimorfizmu ACE ID może być odmienne niż jest to w przypadku rasy kaukaskiej.

Allel I genu *ACE* wydaje się być ciekawym kandydatem na marker genetyczny powiązany z wysokimi osiągnięciami w sporcie. Taka zależność to prawdopodobnie wynik jego wpływu na mechanizmy związane z utrzymaniem zdrowia układu krążenia,

poprawą wydolności tlenowej (Rankinen i wsp., 2000a), czy poprawą wydajności mięśniowej (Folland i wsp., 2000). Próbę odpowiedzenia na pytanie czy allel I determinuje osiągnięcia w dyscyplinach wytrzymałościowych podjęło wielu badaczy. Jednoznaczne wyniki otrzymano w kilku badaniach dotyczących wioślarstwa. W grupie australijskich wioślarzy (Gayagay i wsp., 1998) dowiedziono częstsze występowanie allelu I w porównaniu do grupy kontrolnej (57% do 43%, $P < 0,02$). Tak samo jak w populacji polskich wioślarzy (56.3 % vs. 44.3 %, $P = 0.038$) (Ciężczyk i wsp., 2009). Również w populacji hiszpańskiej stwierdzono, że profil poligeniczny opierający się między innymi na genie *ACE* faworyzuje i odróżnia najlepszych wioślarzy wagi lekkiej od ogólnej populacji (Muniesa i wsp., 2010).

W przypadku biegów długodystansowych już wcześniej wspomniany Myerson zauważył zwiększającą się częstość allelu I wraz z przebiegniętym dystansem (Myerson i wsp., 1999). Podobne wnioski wysuwa Hruskovicova i współautorzy (2006), testując populację długodystansowych biegaczy. Wyniki jej badań wskazują na zwiększone występowanie allelu I w grupie biegaczy plasujących się na miejscach od 1 do 50 w biegu maratońskim.

Pomimo licznych publikacji ukazujących wpływ polimorfizmu genu *ACE* na wyniki sportowe, liczne badania zaprzeczają istnieniu takiej zależności. Już Rankinen i współautorzy w badaniach z 2000 roku (Rankinen i wsp., 2000b), przeprowadzonych na grupie 192 sportowców, pochodzących z czterech krajów i reprezentujących 6 dyscyplin wytrzymałościowych stwierdza, że polimorfizm *ACE* ID nie jest wyznacznikiem wytrzymałości krążeniowo-oddechowej i nie wpływa na wydajność w sporcie. Podobne wnioski wyciągnął Scott i współautorzy (2005) badając populację kenijskich biegaczy długodystansowych. Holdys i współautorzy (2011) z kolei wskazała na brak związku polimorfizmu *ACE* ID z wartościami VO_{2max} w populacji polskiej.

W ostatnich latach opublikowano wiele badań bazujących na bardzo licznych grupach złożonych z kilku populacji. Publikacja Papadimitriou i współautorów (2018) dotycząca 698 biegaczy z trzech kontynentów zaprzecza jakoby polimorfizm *ACE* ID był powiązany z czasami ukończenia biegów na długich dystansach – od 1500 m do maratonu. Rankinen i współautorzy (2016) w równie obszernej publikacji, opartej na sportowcach z czterech kontynentów, po przebadaniu 45 markerów genetycznych

(w tym genu *ACE*), wskazuje na brak konkretnego wariantu określającego model światowej klasy zawodnika wytrzymałościowego.

Jak widać rozbieżność otrzymanych w literaturze wyników nie pozwala jednoznacznie stwierdzić czy allel I jest rzetelnym markerem służącym do określenia talentu sportowego. Wyniki przemawiające za, otrzymane były zazwyczaj w badaniach na niewielkiej grupie sportowców jednej populacji. Natomiast wyniki zaprzeczające, to badania międzynarodowych konsorcjów jak np. GWAS, oparte na liczonych w setkach i tysiącach grupach badanych. Może to być związane z tym, że zmienność międzyosobnicza związana z wytrzymałością jest wynikiem wpływu wielu znanych, ale i rzadkich wariantów genetycznych, z których żadnemu jeszcze nie została przypisana istotność na poziomie genomu lub nie był konsekwentnie replikowany (Papadimitriou i wsp., 2018).

4.2. Częstość genotypu *ACTN3* XX u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym

Jednym z najczęściej badanych w kontekście talentu sportowego zarówno w sportach szybkościowych, jak i wytrzymałościowych jest gen *ACTN3*. Alfa-aktynina 3 jest składnikiem prążków Z w sarkomerze, gdzie łączy cienkie filamenty aktynowe, wspierając tworzenie swoistej sieci oraz koordynując skurcze miofibrilli (Mills, 2001). Jednocześnie gen *ACTN3*, mianowany często „genem szybkości”, również brany jest pod uwagę w kontekście predyspozycji genetycznych do wysiłków wytrzymałościowych. W literaturze, często przypisuje się allelowi X (którego obecność jest powiązana z nie powstawaniem prawidłowej alfa-aktyniny 3) związek z osiągnięciami na długich dystansach (Yang i wsp., 2003).

Wcześniej przeprowadzone badania na myszach z zablokowanym (znokautowanym) genem *ACTN3* były próbą odwzorowania braku alfa-aktyniny 3 w ludzkim organizmie (MacArthur i North, 2007). Myszy takie wykazały wyższą ilość enzymów oksydacyjnych oraz niższą aktywność enzymów zaangażowanych w ścieżki beztlenowe. Większa kumulacja glikogenu oraz zmiana właściwości włókien mięśniowych dostosowanych do spowolnionego metabolizmu mogą być znakami przystosowania się do wysiłku wytrzymałościowego (MacArthur i North, 2007).

Zarówno w grupie długodystansowych kolarzy, jak i pływaków znaleziono różnicę w rozkładzie genotypów *ACTN3* R577X w porównaniu do grupy kontrolnej, przy $p=0,00001$ dla kolarzy i $p=0,005$ dla pływaków. Uwagę zwraca częstość występowania genotypu XX, którego procentowy udział to 30,5% u kolarzy i 30,9% u pływaków. Są to wartości podwójnie przewyższające częstość występowania genotypu XX w grupie kontrolnej, wynoszącą 14,6%.

Przybliżone wyniki do uzyskanych opublikował Eynon i współautorzy (2009). Zanotował częstsze występowanie genotypu *ACTN3* 577XX w grupie sportowców wytrzymałościowych (34%) w odniesieniu do grupy kontrolnej (18%) i grupy sprinterów (13%).

Zupełnie inaczej wygląda rozkład genotypów *ACTN3* R577X w populacji afrykańskiej, uważanej za jedną z najbardziej znaczących w biegach długodystansowych. Rozkład genotypów elitarnych biegaczy nie różnił się istotnie od grupy kontrolnej. W badaniach Yang'a i współautorów (2007) genotyp XX wśród Nigeryjczyków w ogóle się nie pojawił, w populacji Kenijczyków osiągnął poziom ok. 1%, a u Etiopczyków wyniósł 11%. Może to wskazywać na to, iż brak α -aktyniny 3 nie jest determinantą wysokich wyników afrykańskich biegaczy, u których być może kluczowe są inne warianty genetyczne.

Wbrew wynikom niniejszej pracy, kilka kolejnych publikacji wskazuje na brak związku polimorfizmu *ACTN3* R577X z wynikami w sportach wytrzymałościowych (Ahmetov i wsp., 2008; Lucia i wsp., 2006). W populacji rosyjskich sportowców dowiedziono, iż zarówno genotyp XX (5.7% vs. 14.5%; $P < 0.0001$) jak i allel X (33.2% vs. 39.0%; $P = 0.0025$) występują znacznie rzadziej w grupie wioślarzy w porównaniu do grupy kontrolnej (Ahmetov i wsp., 2008). Ponadto, żaden z wysoce elitarnych sportowców nie posiadał genotypu XX. Wbrew oczekiwaniom to zawodnicy o genotypie RR, a nie jak wcześniej przypuszczano XX, osiągalni lepsze czasy w wyścigach długodystansowych niż ci z genotypem RX czy XX.

Z literatury wynika, że genotyp *ACTN3* R577X nie wpływa na wybitnie wytrzymałościowy wysiłek, jakim jest kolarstwo szosowe (Lucia i wsp., 2006). W badaniach Lucii i współautorów (2006) częstość genotypu XX wyniosła 17,9% w grupie kontrolnej i 26% u kolarzy. Chociaż wyniki wykazują podobną tendencję do otrzymanych w niniejszej pracy, to nie osiągnęły one poziomu istotności

statystycznej ($p > 0,05$). W związku z tym można przypuszczać, że kolarze z α -aktyniną 3, jak i jej brakiem w mięśniach, mogą osiągać najlepsze, światowe wyniki w prestiżowych wyścigach. Oba genotypy mogą również dostarczać korzyści dla kolarzy wytrzymałościowych (Lucia i wsp., 2006).

Brak wpływu *ACTN3* na wyniki w sportach wytrzymałościowych zanotowano również w triathlonie. W badaniach Saunders i współautorów z 2007 roku wśród dziesiątki najlepszych sportowców zaledwie trzech posiadało genotyp XX, natomiast siedmiu pozostałych RR.

Badania na polskiej populacji topowych wioślarzy również nie wskazują na znaczenie genu *ACTN3* w osiąganiu wysokich wyników (Ciężczyk i wsp., 2012). Genotyp XX występował znacząco rzadziej w grupie sportowców niż w grupie kontrolnej (6,4 % vs 15%), jednakże ze względu na heterogeniczność badanych grup nie można powyższych wyników odnieść do wyników z niniejszej pracy.

Podążając tropem sportów indywidualnych zbadano również wpływ polimorfizmu R577X genu *ACTN3* na osiągi w grach zespołowych. Piłka nożna jest sportem, w którym możemy wyodrębnić wysiłki o różnej intensywności. Dlatego też możliwość generowania silnych skurczów z dużą prędkością może być czynnikiem decydującym o wynikach w tej dyscyplinie. Gen *ACTN3* kodujący α -aktyninę 3 jest pierwszym genem mięśni szkieletowych, dla którego wykazano powiązanie pomiędzy genotypem a wynikiem sportowym (McArthur i North, 2004 i 2007). Jak się okazuje może on mieć istotny wpływ na wyniki w tak popularnej dyscyplinie jaką jest piłka nożna. Przeciętny piłkarz podczas meczu pokonuje od 8000 do 12000 m. Większość tego dystansu to chód lub luźny bieg. Około 20 % stanowi bieg z maksymalną lub submaksymalną prędkością, występujący zazwyczaj w decydujących fazach meczu (Santiago i wsp., 2007). W eksperymencie przeprowadzonym na grupie 60 profesjonalnych piłkarzy grających na najwyższym poziomie, grupę kontrolną stanowiły 123 osoby nie związane ze sportem oraz grupa 52 światowej klasy sportowców wytrzymałościowych (Santiago i wsp., 2007). Z otrzymanych danych jednoznacznie wynika, że rozkład genotypu RX oraz RR jest znacząco różny od rozkładu otrzymanego w grupie kontrolnej oraz w grupie sportowców wytrzymałościowych. Allel R występuje częściej u przebadanych piłkarzy niż w grupie kontrolnej i grupie sportowców wytrzymałościowych. A zatem wniosek, iż istnieje

korelacja pomiędzy polimorfizmem *ACTN3* R577X a statusem elitarnego piłkarza wydaje się być trafny.

Brak związku genotypu RR z osiągnięciami w sportach drużynowych sugerują jednak publikacje autorstwa naukowców z trzech niezależnych ośrodków. Znaczącego związku nie uzyskano w grupie litewskich sportowców (Gineviciene i wsp., 2011), u walijskich rugbystów (Bell i wsp., 2012), jak również w grupie włoskich zawodników reprezentujących różne dyscypliny drużynowe (Sessa i wsp., 2011). Obszerne badania Eynona i współautorów (2013) obejmujące sportowców gier zespołowych z trzech krajów także sugerują brak wpływu polimorfizmu genu *ACTN3* na osiągnięcia sportowe.

Podsumowując, należy stwierdzić, iż rozpatrując grupę sportowców wytrzymałościowych istotną zależność uzyskano jedynie w rozkładzie alleli genu *ACTN3* R577X w porównaniu do grupy kontrolnej, co znajduje odniesienie w literaturze (Eynon i wsp., 2009). Biorąc pod uwagę dwie wyselekcjonowane grupy sportowców wytrzymałościowych – kolarzy i pływaków uwidaczniają się różnice w rozkładzie genotypów, zarówno dla polimorfizmu genu *ACE* ID, jak i *ACTN3* R577X. Istotnej statystycznie różnicy nie można jedynie zanotować w rozkładzie alleli wśród obu dyscyplin.

Otrzymane dane są zgodne z wcześniej postawioną hipotezą jakoby genotypy II genu *ACE* oraz XX genu *ACTN3* występowały w sposób statystycznie istotny częściej wśród sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym w stosunku do grupy kontrolnej, co pozwala na potwierdzenie tejże hipotezy na podstawie przeprowadzonych analiz.

4.3. Częstość genotypu *ACE* DD u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym

Gen *ACE* uznawany jest za bardzo istotny w kontekście poszukiwania talentu sportowego. Domniemywa się, że ma on również wpływ na funkcjonalny przerost lewej komory serca (Hernández i wsp., 2003; Montgomery, 1997). Badania Folland'a i współautorów (2000) wskazują na to, iż polimorfizm *ACE* może wpływać

na zwiększenie siły u osób poddanych treningowi. Dodatkowo, genotyp DD genu *ACE* został uznany za wspierający wysiłki szybkościowo-siłowe (Puthucheary i wsp., 2011).

Rozkład genotypów *ACE* I/D obserwowany w grupie badanych w niniejszej rozprawie doktorskiej sportowców szybkościowo-siłowych (SD+LIFT) nie różnił się znacząco od grupy kontrolnej. Jednakże biorąc pod uwagę jedynie kolarzy krótkodystansowych (SDC) możemy zauważyć istotną różnicę w rozkładzie genotypów w porównaniu do grupy kontrolnej (II 2,9%, ID 44,1%, DD 52,9% vs II 20,3%, ID 48,8%, DD 30,9%, $p=0,009$). Na uwagę zasługuje fakt, iż tylko jeden kolarz posiadał genotyp II. Costa i współautorzy (2009a) również zanotowali podobną prawidłowość u elitarnych pływaków portugalskich - specjalizujących się w krótkich dystansach - utrzymując bardzo zbliżony wynik genotypowania (0% II, 44% ID, 56% DD, $p=0,021$). Istnieje również istotny statystycznie trend wskazujący na większą częstość występowania allelu D w porównaniu do grupy kontrolnej (75% vs 62%). Stosunek częstości występowania alleli (75% D i 25% I) jest bardzo zbliżony do wcześniej otrzymanego przez Costę i współautorów (2009) (78% D i 22% I). Jest to zgodne z literaturą, która potwierdza znaczenie allelu D w osiągnięciu wysokich wyników na dystansach sprinterskich (Costa i wsp., 2009a; Myerson i wsp., 1999).

Costa i współautorzy (2009a) wykazał częstsze występowanie allelu D wśród czołowych pływaków-sprinterów portugalskich w porównaniu do grupy kontrolnej (78% vs 62%, $p=0,029$). Co ważne, żaden z objętych badaniem światowej klasy pływaków nie miał genotypu II (wobec 16% w grupie kontrolnej). W innych badaniach (Costa i wsp., 2009b) wykazał istotny związek genotypu DD oraz allelu D z siłą mięśniową – na podstawie siły uścisku dłoni. Dodatkowo allel D wpływał na zwiększoną siłę uścisku dłoni u kobiet zaklasyfikowanych do grupy wytrzymałościowej oraz na wyskok obunóż z zamachem (CMJ) u wszystkich kobiet.

Do podobnych wniosków doszedł Myerson i współautorzy (1999). Prowadzone przez ten zespół badania na sprinterach wykazały obecność genotypu DD u 45% biegaczy, wobec 26% częstotliwości występowania tego genotypu wykazanej w populacji angielskiej. Istotne statystycznie były także różnice w występowaniu allelu D (sprinterzy 65% vs kontrola 51%, $p=0,009$).

Podobne wnioski dotyczące polimorfizmu genu *ACE* opublikował Woods i współautorzy (2001). Wykazali oni znacznie większą częstość występowania allelu D

w grupie pływaków w porównaniu do grupy kontrolnej składającej się z rekrutów armii brytyjskiej. Zależność ta była zauważalna jedynie w grupie najlepszych sportowców.

Tsianos i współautorzy (2004) dostrzegli z kolei częstsze występowanie allelu D u pływaków startujących na dystansie 1-10 km ,niż u rywalizujących na dystansie 25km (71% do 41%). Może to wskazywać na pozytywny wpływ allelu D na generowanie mocy w wysiłkach o umiarkowanym czasie trwania.

Również Nazarov i współautorzy (2001) zanotowali istotną różnicę w rozkładzie allelu D pomiędzy sportowcami rywalizującymi na krótkim dystansie a grupą kontrolną ($p=0,001$). W tym przypadku wyróżniających się krótkodystansowych pływaków różnice w rozkładzie genotypów DD nie były jednak istotne statystycznie (44% wśród pływaków do 24% w kontroli, $p=0,113$).

Biorąc pod uwagę rozkład genotypów ACE ID w grupach ciężarowców (LIFT) i krótkodystansowych pływaków (SDS) w porównaniu do grupy kontrolnej należy stwierdzić, że nie obserwowano istotnych statystycznie różnic. Częstość występowania genotypu DD w dwóch powyższych grupach jest niższa niż w grupie kontrolnej. Jak wcześniej wspomniano (Woods i wsp., 2001) istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną a sportowcami zaznaczają się najczęściej w wyselekcjonowanej grupie sportowców najwyższej klasy (z ang. *elite*). W związku z tym, grupa uczestników Mistrzostw Polski przebadanych na potrzeby niniejszej pracy wydaje się nie prezentować odpowiednio wysokiego poziomu sportowego, aby istotne różnice mogły się pojawić.

Brak korelacji w niniejszym badaniu nie jest odosobnionym przypadkiem. Dwoje z autorów wskazuje na brak podobnych zależności opierając się na testach różnych populacji. Papadimitriou i współautorzy (2009), wbrew wcześniejszym doniesieniom (Papadimitriou i wsp., 2008), nie wykazali istotnego znaczenia allelu D w grupie greckich sportowców szybkościowo-siłowych. Z kolei Yang i współautorzy (2007) wskazuje na brak różnic w rozkładzie genotypów u nigeryjskich sportowców szybkościowo-siłowych a grupą kontrolną.

Podsumowując, należy stwierdzić, iż opisane wyżej zależności pozostawiają dużą dowolność w interpretacji wyników. Zależności w rozkładzie genotypów dla genu ACE ID otrzymano u zaledwie jednej z trzech wyodrębnionych grup – krótkodystansowych kolarzy. Nie były one dostrzegalne przy rozpatrywaniu ogólnej

grupy sportowców szybkościowo-siłowych. Zależności w rozkładzie genotypów dla genu *ACTN3* R577X otrzymano również dla jednej z trzech wyselekcjonowanych grup – krótkodystansowych pływaków. Tu z kolei można było dostrzec różnicę w rozkładzie alleli rozpatrując wszystkie trzy grupy razem.

W związku z tym należy stwierdzić, że na podstawie otrzymanych danych nie można jednoznacznie potwierdzić postawionej wcześniej hipotezy, jakoby genotypy DD genu *ACE* oraz RR genu *ACTN3* występowały w sposób statystycznie istotny częściej wśród sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym w stosunku do grupy kontrolnej.

4.4. Częstość genotypu *ACTN3* RR u zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym

Polimorfizm R577X w genie *ACTN3*, a dokładnie allel R, został uznany przez wielu badaczy za istotny w kontekście osiągania wyników sportowych w dyscyplinach szybkościowo-siłowych (Clarkson i wsp., 2005a; Papadimitriou i wsp., 2016; Pereira i wsp., 2013a). Natomiast genotyp XX oraz allel X mogą odgrywać znaczącą rolę w wysiłkach wytrzymałościowych (Eynon i wsp., 2009). Podobnie allel D w genie *ACE* prawdopodobnie predysponuje do intensywnych wysiłków o krótkim czasie trwania (Eider i wsp., 2013). Obydwa geny stały się równocześnie podstawą wielu komercyjnych testów stworzonych m.in. do poszukiwania talentów sportowych (Savulescu i Foddy, 2005; Webborn i wsp., 2015).

W niniejszej pracy rozpatrywano rozkład genotypów zarówno w szerokiej grupie sportowców reprezentujących dyscypliny szybkościowo-siłowe, jak i w poszczególnych grupach zawodników z jednej dyscypliny. Częstość genotypów *ACTN3* R577X w grupie sportowców szybkościowo-siłowych, w skład której weszli krótkodystansowi kolarze i pływacy, jak również sztangiści, nie różniła się w sposób istotny od częstości obserwowanej w grupie kontrolnej. Rozkład geotypów RR oraz RX jest zbliżony do grupy kontrolnej i nie zanotowano tu istotności statystycznej. Natomiast rozkład alleli wskazuje na znacznie częstsze występowanie allelu R niż X (71,2% R i 28,8% X). Podobne badania przeprowadził Yang i współautorzy (2003). W eksperymencie uczestniczyło 107 zawodników reprezentujących dyscypliny szybkościowo-siłowe, wśród których znalazło się między innymi 42 pływaków i 7

kolarzy. Przedstawiciele sportów szybkościowo-siłowych (kobiety i mężczyźni) wykazywali wyższą częstość występowania allelu R oraz znacznie niższą częstość allelu X niż grupa kontrolna. Rozkład alleli zarejestrowany przez Yang i współautorów (2003) kształtował się następująco: 72% R i 28% X i był niemal identyczny z uzyskanym w powyższej pracy. Co ciekawe, genotyp RX występował częściej u kobiet trenujących sporty szybkościowo-siłowe, przy braku podobnego efektu u mężczyzn. Według badaczy polimorfizm *ACTN3* R577X może w różnym stopniu wpływać na wynik sportowy u mężczyzn i kobiet – autorzy sugerowali, że być może dzięki androgenom efekt genu *ACTN3* nie jest tak widoczny u sportowców płci męskiej (Yang i wsp. 2003).

Ciekawe badania, potwierdzające wcześniejsze wyniki przeprowadził Eynon i współautorzy (2009). W badaniu tym udział wzięło 155 izraelskich sportowców: biegaczy wytrzymałościowych i sprinterów oraz 240 osoby tworzące grupę kontrolną. Wśród sprinterów dystrybucja alleli R i X oraz genotypów *ACTN3* 577RR różniła się znacząco od grupy sportowców wytrzymałościowych i grupy kontrolnej. Porównanie sprinterów topowych oraz tych na poziomie krajowym pokazało, że allel R występuje częściej u tych najlepszych. Wyniki dostarczają dowodów na to, iż allel R może być powiązany z osiąganiem wysokich laurów w sprincie na najwyższym poziomie sportowym.

Nawiązaniem oraz potwierdzeniem powyższych danych jest praca Niemi i Majammaa (2005) dotycząca fińskich sportowców. W grupie sprinterów, rywalizujących na najwyższym poziomie (n=23) nie znaleziono ani jednego genotypu XX, co wskazuje na to, iż allel R może mieć faworyzujący wpływ na osiągnięcia w dyscyplinach wymagających silnych skurczów mięśniowych generowanych z dużą szybkością. Podobnie w badaniach na populacji rosyjskiej (Druzhevskaya i wsp., 2008), obejmujących pokaźną grupę 486 sportowców dyscyplin siłowo-szybkościowych, również stwierdzono znacznie mniejszą częstość występowania genotypu XX w porównaniu do grupy kontrolnej (6,4% vs 14,2%). Trend wskazujący na rzadsze występowanie genotypu XX był tym bardziej wyraźny, im większy poziom sportowy zawodnika. Co ciekawe, występowanie genotypu XX u sportowców wybitnie elitarnych było bardzo rzadkie. Tylko jedna osoba z powyższej grupy (n=29) posiadała genotyp XX.

Za pozytywnym znaczeniem allelu R w wysiłkach siłowych przemawiają również inne źródła. Warto zwrócić uwagę na publikację Clarksona i współautorów (2005a) dotyczącą związku polimorfizmu *ACTN3* R577X z odpowiedzią na zaaplikowany trening. Badania te wskazują na znaczenie allelu R w osiąganiu lepszych wyników siłowych w populacji 355 kobiet poddanych dwunastotygodniowemu treningowi siłowemu.

Generowanie silnych skurczów z dużą szybkością to bardzo pożądana cecha we wszystkich sportach szybkościowo-siłowych. Alfa-aktynina to białko szkieletowe, które odpowiada za intensywną pracę mięśni (MacArthur i North, 2004). Rozpatrując grupę sportowców szybkościowo-siłowych zwierzbowanych do badań zrealizowanych na potrzeby przygotowania prezentowanej rozprawy doktorskiej, z uwzględnieniem podziału na poszczególne dyscypliny, należy stwierdzić, że rozkład genotypów wśród sztangistów nie różnił się znacząco od grupy kontrolnej. Częstość genotypu RR jest wyższa w grupie badanych w porównaniu do grupy kontrolnej, jednakże obserwowana różnica nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Może to być spowodowane tym, iż w grupie badanej znajdowali się zawodnicy o różnym poziomie sportowym – uczestnicy Mistrzostw Polski. Według literatury wpływ polimorfizmu *ACTN3* R577X jest widoczny najbardziej u zawodników najwyższej klasy określanych w literaturze mianem „elite”.

Brak związku polimorfizmu *ACTN3* R577X z osiągnięciami w judo – dyscyplinie, w której siła mięśniowa odgrywa znaczną rolę, zanotował Rodriguez-Romo i współautorzy (2013). Wśród elitarnych judoków w populacji hiszpańskiej wykazano brak związku polimorfizmu *ACTN3* R577X z wynikami w sportowym judo (częstość *ACTN3* XX u judoków równa 23,1%). Jednocześnie autorzy poddają pod wątpliwość zasadność testów opartych na polimorfizmie genu *ACTN3* w sportowym judo.

Z kolei zupełnie odmienne informacje prezentują badania naukowców japońskich. Kikuchi i współautorzy (2013) wskazuje na znacznie rzadsze występowanie genotypu XX wśród japońskich zapaśników na poziomie międzynarodowym w porównaniu do grupy kontrolnej.

Badania dotyczące polimorfizmu *ACTN3* R577X w kontekście sportów siłowych przeprowadził również Roth i współautorzy (2008b). Siedemdziesięciu pięciu

przedstawicieli (w tym 4 kobiety) sportów siłowych, takich jak kulturystyka i trójbój siłowy, należących do rasy białej i czarnej zostało poddanych genotypowaniu *ACTN3* R577X. Zauważono znacznie niższą częstotliwość występowania genotypu XX (6.7%) w porównaniu do grupy kontrolnej (16.3%; $P=0.005$). Co ciekawe, nie znaleziono żadnego ciemnoskórego sportowca o genotypie XX.

Sportem, w którym od zawodników również wymaga się nieprzeciętnej siły mięśniowej jest z całą pewnością gimnastyka. Gwałtowna praca mięśni z dużą częstotliwością to cecha charakterystyczna tej dyscypliny. Massidda i współautorzy (2009) potwierdzają wcześniej przytoczone wyniki przez Roth i współautorów (2008). W przebadanej grupie mężczyzn ($n=17$) genotyp XX w ogóle nie występował, a w grupie kobiet ($n=18$) był obecny jedynie u 5,5% badanych. Wskazuje to na predysponujące oddziaływanie allelu R, który być może wpływa istotnie na osiągnięcie lepszych wyników w grupie męskich sportowców.

Rozpatrując rozkłady genotypów oraz alleli w poszczególnych dyscyplinach sportowych okazało się, że rozkład genotypów *ACTN3* R577X w grupie krótkodystansowych kolarzy, również nie różnił się w sposób istotny statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej. Zbliżony udział XX w porównaniu do grupy kontrolnej (14,7% vs 14,6%) oraz niższe występowanie RR w porównaniu do grupy kontrolnej (32,4% vs 40,9%) jest dosyć zaskakujące. Wiadomo bowiem, że allel R może predysponować do wysiłków sprinterskich (Yang i wsp. 2003). Prawdopodobnie zbyt mała liczba przebadanych kolarzy wpłynęła na brak uwidocznienia zależności. Konieczne są dalsze analizy na większej grupie badanych.

Istotne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej pojawiają się jedynie w grupie pływaków krótkodystansowych (SDS, $p=0,0001$) zarówno w rozkładzie genotypów *ACTN3* R577X, jak i alleli. Zanotowano znacznie rzadsze występowanie genotypu XX w porównaniu do grupy kontrolnej (XX 1,9% vs 14,6%). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż genotyp XX występował bardzo rzadko - jedynie u dwóch przebadanych osób. Podobnie niskie wartości uzyskała Druzhevskaya i współautorzy (2008). Przewaga allelu R zaznacza się również w rozkładzie alleli w porównaniu do grupy kontrolnej (81,7% vs 64,9%). Podobne wnioski dotyczące częstości występowania allelu R wyciągnął Yang i współautorzy (2003) badając grupę sportowców z różnych dyscyplin o charakterze sprinterskim (72% vs 56%). Rzadsze

występowanie allelu X – uznanego za wariant wytrzymałościowy, jest uzasadnione z uwagi na charakter wysiłków w pływaniu na sprinterskich dystansach – duża intensywność i krótki czas trwania. Jak wcześniej udowodniono, niska częstotliwość genotypu XX może być charakterystyczna dla wysiłków o charakterze sprinterskim (Niemi i Majamaa, 2005; Papadimitriou i wsp., 2008).

Znaczenie allelu R w osiąganiu wysokich wyników na sprinterskich dystansach w pływaniu dowiedziono w populacji tajwańskiej (Chiu i wsp., 2011). Dodatkowo częstość występowania allelu R odróżnia grupę sprinterek międzynarodowych od startujących na poziomie krajowym (67.6% vs 50.0%), a także od grupy kontrolnej (67,6% vs 53.7%). Również w populacji chińskiej zanotowano pozytywny wpływ allelu R na wyniki w pływaniu na średnim dystansie (≥ 400 m, $\leq 1,500$ m) (Li i wsp., 2017). Allel R znacznie częściej występował u sportowców w porównaniu do grupy kontrolnej (62,5% vs 56,3%), a zależność ta była bardziej widoczna przy przyrównaniu sportowców o poziomie międzynarodowym (71,1% vs 56,3%). W innej pracy z kolei wykazano znacznie częstsze występowanie genotypu RR u pływaków izraelskich, rywalizujących zarówno na długich, jak i krótkich dystansach w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 37,5% i 37,2% do 22,1%) (Ben-Zaken i wsp., 2015). Pojawił się również trend wskazujący na częstsze występowanie genotypu XX u długodystansowców w porównaniu do krótkodystansowców, ale nie osiągnął on poziomu istotności statystycznej (Ben-Zaken i wsp., 2015).

Zupełnie innych wniosków dostarczają prace Wanga i współautorów (2013) oraz Ruiza i współautorów (2013), z których wynika, że polimorfizm genu *ACTN3* R577X nie ma wpływu na wyniki w pływaniu u zawodników rasy białej, w populacji wschodnio-azjatyckiej oraz hiszpańskiej. Z kolei badania Yang’a i współautorów (2007) wskazują na brak związku polimorfizmu *ACTN3* R577X z osiągniętymi szybkościowo-siłowymi w populacji afrykańskiej. Ponadto, Scott i współautorzy (2010) poddaje pod wątpliwość znaczenie polimorfizmu genu *ACTN3* R577X w sprincie u jamajskich i amerykańskich sprinterów.

Badania przeprowadzone na populacji polskiej obejmującej sportowców z różnych dyscyplin opublikowała Holdys i współautorzy (2011). Zależność pomiędzy polimorfizmem genu *ACTN3* R577X a maksymalnym pochłanianiem tlenu nie została wykazana. Zauważono jednak trend predysponujący zawodników o genotypie XX oraz

RX do osiągania większych wartości VO_{2max} oraz dominację genotypu RR w grupie sportowców siłowo-szybkościowych.

Podsumowując należy stwierdzić, iż tylko jedna z trzech przebadanych grup o charakterystyce szybkościowo-siłowej wykazała odmienny rozkład genotypów od grupy kontrolnej. W związku z tym, otrzymane wyniki zaprzeczają wcześniej postawionej hipotezie jakoby genotyp RR genu *ACTN3* występował w sposób statystycznie istotny częściej wśród polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym w stosunku do grupy kontrolnej oraz do polskich sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym.

4.5. Korelacja genotypów *ACE* I/D oraz *ACTN3* R577X u zawodników różnych dyscyplin

Interakcje pomiędzy genami już od dawna uważane są za istotne w kontekście poznania znaczenia genetycznego podłoża poszczególnych procesów metabolicznych (Phillips, 2008). W powyższej pracy przebadano korelację pomiędzy częstością występowania określonych kombinacji genotypów I/D *ACE* oraz R577X *ACTN3* a statusem sportowym polskich zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym oraz zawodników realizujących wysiłki szybkościowo-siłowe. Genotypy *ACE* ID oraz *ACTN3* R577X zostały zestawione we wszystkich możliwych kombinacjach. Porównanie sportowców należących do grupy LD z grupą kontrolną ujawniło istnienie interakcji pomiędzy dwoma badanymi genami przy założeniu modelu kodominującego oraz dominującego (Tabela 7).

Wartość OD estymowana dla sportowców długodystansowych (LD) o układzie genotypów II:XX wynosiła 6,5, co oznacza, że posiadacze układu II:XX mają 6,5 razy większą szansę dla na bycie sportowcem długodystansowym niż nosiciele innych układów genotypowych. Należy jednak wskazać, że wynik ten należy przyjąć z rozważą z powodu szerokiego przedziału ufności (1,95-21,65). Co ważne, układ II:XX został powiązany ze statusem długodystansowych pływaków w badaniach Grendy i współautorów (2014). Odmienne wnioski prezentuje jednak bardziej aktualna praca Papadimitriou i współautorów (2018). W pokaznej grupie 698 sportowców wytrzymałościowych z sześciu krajów nie odnaleziono zależności pomiędzy

genotypami *ACE* II oraz *ACTN3* XX a wynikiem sportowym. Należy dodać, iż analizy nie obejmowały kombinacji dwóch genotypów, w wyniku czego pozytywny wpływ współdziałania dwóch wcześniej wspomnianych genotypów mógł zostać nieujawniony.

Ponad trzy razy większą szansę na bycie sportowcem długodystansowym wykazują również posiadacze układu genotypowego DD:XX. Potwierdziło się to również przy uwzględnieniu analiz z podziałem na poszczególne dyscypliny - w grupie długodystansowych kolarzy (Tabela 4). W badaniach hiszpańskich naukowców (Gómez-Gallego i wsp., 2009) światowej klasy kolarze z genotypem DD:XX posiadali niższy punkt kompensacji oddechowej (RCT, z ang. *respiratory compensation threshold*), w porównaniu do zawodników z genotypem DD:RR/RX, co jest niezgodne z otrzymanymi wynikami. Punkt kompensacji oddechowej to moment, w którym organizm nie jest w stanie buforować nadmiaru kwasu mlekowego znajdującego się we krwi i dochodzi do jej zakwaszenia (Porcari i wsp., 2015). Zatem korzystne jest, aby pojawiał się on przy jak najwyższym tętnie, dzięki czemu zawodnik może kontynuować intensywną pracę nie ulegając gwałtownemu zakwaszeniu. Być może zatem, adaptacja posiadaczy genotypów DD:XX do wysiłków wytrzymałościowych zachodzi w oparciu o inne mechanizmy. Nawiązując do pracy Grendy i współautorów (2014) genotypy ID:RX, ID:XX, II:RX, II:XX mogą być powiązane ze statusem długodystansowego pływaka. Jak widać genotyp DD:XX nie znajduje się w grupie wcześniej wymienionych, lecz obecność allelu D w połączeniu z homozygotą XX może skłaniać do dyskusji.

Co warto zaznaczyć - o ponad 5,5 razy mniejszą szansę na bycie sportowcem długodystansowym mają posiadacze układu ID:RR. Znajduje to potwierdzenie w innych publikacjach, gdzie genotyp *ACTN3* RR i *ACE* allel I jest uznawany za faworyzujący w wysiłkach szybkościowo-siłowych i może być typowy dla sprinterów (Eynon i wsp., 2009). W innych badaniach osoby z wyżej wymienionym genotypem osiągnęły lepszy wynik w testach siłowych (1RM) oraz generowały większą moc (W_{max}) (Erskine i wsp., 2014). Wydaje się, iż allel R pełni w tym przypadku funkcję ograniczającą osiąganie sukcesów na długich dystansach. Jak dowiedziono, allel R predysponuje do wykonywania dynamicznych i szybkich skurczów mięśni (Woods i wsp., 2001), podczas których zużywane są spore zasoby energetyczne. Jest to sprzeczne z naturą wysiłków długodystansowych, na których ekonomia ruchu oraz wykorzystanie energii pochodzącej z procesów tlenowych są kluczowe. Zatem

posiadanie dwóch alleli R może w znaczny sposób ograniczać osiąganie sukcesów w dyscyplinach wytrzymałościowych.

W grupie sportowców szybkościowo-siłowych wyniki uzyskane z porównań przeprowadzonych z wykorzystaniem każdego z modeli (kodominującego, dominującego oraz recesywnego) nie przekroczyły poziomu istotności statystycznej. Na uwagę zasługuje iloraz szans dla układu ID:XX wynoszący 0,40 (CI 0,16-0,99), wskazujący na dyskryminacyjne działanie homozygoty XX w sportach szybkościowo-siłowych z powodu braku białka α -aktyniny, co znajduje uzasadnienie w literaturze (Eynon i wsp., 2009), jednakże z uwagi na brak istotności statystycznej, nie można się do tego wyniku bezpośrednio odnieść.

Ciekawe wnioski można wyciągnąć analizując badaną grupę sportowców z podziałem na poszczególne dyscypliny. W grupie ciężarowców szansa na wystąpienie układu genotypów DD:RX jest ponad pięć razy mniejsza w porównaniu do grupy kontrolnej (OD=0,19; CI 0,05-0,71). Wynik ten jest zaskakujący, gdyż wielu autorów wskazuje na korzystny wpływ genotypu DD na dynamiczne wysiłki, jakim niezaprzeczalnie jest podnoszenie ciężarów (dwubój olimpijski).

Według Follanda i współautorów (2000) polimorfizm *ACE* ID może wpływać na zwiększenie siły u osób poddanych treningowi. Ponadto, genotyp DD genu *ACE* został uznany za wspierający wysiłki szybkościowo-siłowe (Puthucheary i wsp., 2011). Pereira i współautorzy (2013a) wskazują na lepszą odpowiedź na trening mocy (z ang. *high speed power training*) osób z genotypem szybkościowo-siłowym *ACTN3* RR/RX & *ACE* DD w porównaniu do układu *ACTN3* XX & *ACE* II/ID wśród starszych kobiet rasy kaukaskiej. Wspierający wpływ allelu D w wyścigach na krótkich dystansach został zanotowany u elitarnych portugalskich pływaków (Costa i wsp., 2009a). Być może fakt, że na potrzeby powyższej pracy przebadani zostali uczestnicy mistrzostw Polski powoduje, iż wpływ allelu D nie jest widoczny. Tak jak wspomniano w poprzednim podrozdziale pracy – według źródeł, wpływ polimorfizmu jest widoczny u sportowców elitarnych – prezentujących najwyższy poziom sportowy (Costa i wsp., 2009a; Woods i wsp., 2001). Wydaje się zatem, iż poziom mistrzostw Polski nie jest wystarczający do wykazania takich zależności.

Tsianos i współautorzy (2004) wskazał na częstsze występowanie allelu D u pływaków startujących na dystansie 1-10 km. Może to uzasadniać pozytywny wpływ

allelu D na generowanie mocy w wysiłkach o umiarkowanym czasie trwania. Z kolei badania Lucia i współautorów (2005) wskazują na częstsze występowanie genotypu DD w grupie pięćdziesięciu światowej klasy hiszpańskich kolarzy w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grupy biegaczy klasy olimpijskiej. Powyższe badania pokazują, że allel D może wywierać korzystny efekt u jego posiadaczy również w dyscyplinach o umiarkowanym lub długim czasie trwania. Być może trwające zaledwie parę sekund boje ciężarowe o mocno eksplozywnym charakterze są zbyt krótkie w swojej naturze, aby taka zależność się pojawiła.

Wynik analiz jest tożsamy z publikacją Gineviciene i współautorów (2016), gdzie również badano wpływ genowych polimorfizmów na wyniki w sportach o charakterze siłowo-eksplozywnym (Gineviciene i wsp., 2016). Parafrazując autorów tej pracy: polimorfizm *ACNT3* R577X nie wpływa na status sportowca siłowego w dwóch populacjach europejskich, a genotyp *ACE* II jest prawdopodobnie „wspierającym” dla rosyjskich sportowców, zaś genotyp *ACE* ID dla litewskich. Co pokazuje, że dla dyscyplin takich jak dwubój olimpijski, trójbój siłowy czy konkurencje rzutowe to allel I jest allelem predysponującym. Co warto uwagi, naukowcy wskazują na związek polimorfizmu genu *PPARGC1A* (Gly482Ser) z predyspozycjami do sportów siłowo-eksplozywnych. Jak się okazuje, genotyp *PPARGC1A* Ser/Ser jest znacząco częstszy u trójboistów w porównaniu do grupy kontrolnej.

W grupie pływaków krótkodystansowych model recesywny pozwolił na wykazanie, że posiadacze kombinacji genotypowych II:RX oraz ID:RX charakteryzują się odpowiednio ponad 4 i ponad 3,5 razy większym prawdopodobieństwem zostania pływakiem-sprinterem w porównaniu do grupy kontrolnej. Potwierdzenie tych wyników można odnaleźć w pracy Eynona i współautorów (2009), gdzie genotypy *ACE* II oraz *ACTN3* allel R i *ACTN3* RR + *ACE* allel I zostały uznane jako właściwe dla sprinterów. Co ciekawe, prawdopodobieństwo bycia sprinterem dla genotypu *ACE* II + *ACTN3* allel R wyniosło 3,57 (CI 1,78 – 7,15), co jest wynikiem zbliżonym do otrzymanego w badaniach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej dysertacji (OR=4,02, CI 1,43 – 11,34). Ponadto, potwierdzeniem powyższych danych mogą być wnioski Erskine i współautorów (2014), iż posiadacze układu ID:RX osiągalni lepsze wyniki w próbie siłowej oraz generowali większą moc. Jednak nie wszystkie publikacje wskazują na podobne wyniki. Nawiązując do pracy

Grendy i współautorów (2014), oba wymienione układy genotypowe: ID:RX, II:RX były powiązane ze statusem długodystansowego pływaka. Może to wynikać z rozbieżności w klasyfikacji sportowców do dwóch grup: krótkodystansowych oraz długodystansowych. Na potrzeby powyższej dysertacji do grupy pływaków krótkodystansowych zostali zaliczeni sportowcy osiągający najlepsze wyniki na dystansie 50m oraz 100m, a do grupy długodystansowych osiągający najlepsze wyniki w wyścigach na dystansie 200m i więcej. W publikacji Grendy i współautorów (2014) to odpowiednio 50-200m oraz powyżej 500m. Wspomniane różnice utrudniają porównanie otrzymanych wyników i uniemożliwiają wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Należy również wspomnieć o badaniach, które nie wykazały żadnej zależności pomiędzy kombinacją genotypów *ACE* ID oraz *ACTN3* R577X a fenotypem. Korelacja taka nie pojawiła się w grupie hiszpańskich studentów (Rodríguez-Romo i wsp., 2010), a także w dwóch populacjach starszych osób (Bustamante-Ara i wsp., 2010; Garatachea i wsp., 2012). Jak już wcześniej wspomniano, wpływ polimorfizmów określonych genów jest widoczny u sportowców prezentujących najwyższy poziom sportowy, w wyniku czego rzeczona zależność w wyżej wymienionych grupach może nie występować.

Otrzymane dane są częściowo zgodne z wcześniej postawioną hipotezą. Większa częstotliwość występowania kombinacji genotypów *ACE* II oraz *ACTN3* XX występuje wśród sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym (LD) w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast genotypem wspierającym wysiłki szybkościowo-siłowe, takie jak podnoszenie ciężarów, okazał się układ DD:RX. W przypadku pływania na krótkim dystansie korzystne okazały się kombinacje ID:RX, II:RX.

Podsumowując warto zaznaczyć, iż kompleksowa analiza kombinacji genotypów *ACE* ID i *ACTN3* R577X jest najbardziej wartościowym aspektem zrealizowanych badań. W wielu pracach z zakresu genetyki sportowej, podejmujących zagadnienia związane z badaniem zróżnicowania w genach *ACE* i *ACTN3* nie podejmuje się wysiłku zbadania międzygenowych interakcji genotypowych. W prezentowanej dysertacji, dzięki przebadaniu kombinacji genotypowych w układzie *ACE:ACTN3* z wykorzystaniem modelu kodominującego, dominującego i recesywnego

możliwe było ujawnienie efektów związanych z interakcjami genotypów, które w innym przypadku mogłyby pozostać nie wykryte.

4.6. Wartość testu diagnostycznego skonstruowanego z wykorzystaniem układu dwóch polimorfizmów: I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3*

Jak donoszą źródła, polimorfizm R577X genu *ACTN3* oraz I/D genu *ACE* są najczęściej wykorzystywanymi przy konstruowaniu komercyjnych testów genetycznych typu „*direct to consumer*” (Williams i wsp., 2007). W wyniku przeprowadzonych analiz na potrzeby powyższej dysertacji dowiedziono, iż wyżej wymienione polimorfizmy mogą wpływać na wynik sportowy. Jednakże niejednoznaczność otrzymanych wyników powoduje, iż testu skonstruowanego na bazie dwóch powyższych polimorfizmów nie można uznać za rzetelne narzędzie w kontekście uzyskiwania jednoznacznie rozstrzygających wyników w odniesieniu do rozpoznawania tak złożonej właściwości jakim jest „talent sportowy”. Dodatkowo warto podkreślić, że wykorzystanie polimorfizmu jedynie dwóch genów do orzekania nie tylko o talencie sportowym, ale też o jakiegokolwiek innej właściwości organizmu człowieka, to zdecydowanie za mało, aby test osiągnął oczekiwaną moc. W tym miejscu należy zaznaczyć, iż mapa genów mogących mieć wpływ na wyniki sportowy liczy niemalże 250 pozycji i ciągle się rozrasta (Bray i wsp., 2009).

Podsumowując należy stwierdzić, że uzyskane w toku przeprowadzonych badań wyniki nie potwierdzają wcześniej postawionej hipotezy jakoby test diagnostyczny, wspomagający selekcję do sportu, skonstruowany z wykorzystaniem układu dwóch polimorfizmów I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3* był trafnym i rzetelnym rozwiązaniem dla populacji polskiej. Konieczne są dalsze analizy, przeprowadzone na większej populacji zawodników najwyższego szczebla sportowego, z wykorzystaniem większej liczby wariantów polimorficznych zlokalizowanych w różnych genach oraz markerów opisywanych w obszarach pozagenowych, aby stworzenie rzetelnego testu diagnostycznego było możliwe.

Równocześnie na koniec warto zaznaczyć, że sama idea wykorzystania analiz genetycznych jako elementu codziennej praktyki trenerskiej jest realna, a zastosowanie nowoczesnych technik biologii molekularnej ma niewątpliwą przyszłość. Dynamika rozwoju badań z tej dziedziny pozwala stwierdzić, że (po dopracowaniu i odpowiedniej

walidacji) testy genetyczne z pewnością staną się jednym z narzędzi stosowanym na równi z innymi (biochemicznymi, fizjologicznymi czy funkcjonalnymi) w badaniach zawodników w nieodległej przyszłości.

Bibliografia

1. Abbott, A., Button, C., Pepping, G. J., & Collins, D. (2005). Unnatural selection: Talent identification and development in sport. *Nonlinear Dynamics, Psychology, and Life Sciences* 9(1), 61-88.
2. Ahmetov, I. I., Donnikov, A. E., & Trofimov, D. Y. (2014). *ACTN3* genotype is associated with testosterone levels of athletes. *Biology of Sport*, 31(2), 105–108.
3. Ahmetov, I. I., Popov, D. V., Astratenkova, I. V., Druzhevskaya, A. M., Missina, S. S., Vinogradova, O. L., & Rogozkin, V. A. (2008). The use of molecular genetic methods for prognosis of aerobic and anaerobic performance in athletes. *Human Physiology*, 34(3), 338–342.
4. Ahmetov, Ildus I., Druzhevskaya, A. M., Lyubaeva, E. V., Popov, D. V., Vinogradova, O. L., & Williams, A. G. (2011). The dependence of preferred competitive racing distance on muscle fibre type composition and *ACTN3* genotype in speed skaters. *Experimental Physiology*, 96(12), 1302–1310.
5. Ahmetov, Ildus I., & Fedotovskaya, O. N. (2012). Sports genomics: Current state of knowledge and future directions. *Cellular and Molecular Exercise Physiology*, 1(1), 1-24.
6. Alhenc-Gelas, F., Richard, J., Courbon, D., Warnet, J. M., & Corvol, P. (1991). Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117(1), 33–39.
7. Alvarez, R., Terrados, N., Ortolano, R., Iglesias-Cubero, G., Reguero, J. R., Batalla, A., Cortina, A., Fernández-García, B., Rodríguez, C., Braga, S., Alvarez, V., & Coto, E. (2000). Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance. *European Journal of Applied Physiology*, 82(1–2), 117–120.
8. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350–355.
9. Andrade, V. L., Zagatto, A. M., Kalva-Filho, C. A., Mendes, O. C., Gobatto, C. A., Campos, E. Z., & Papoti, M. (2015). Running-based anaerobic sprint test as a procedure

to evaluate anaerobic power. *International Journal of Sports Medicine*, 36(14), 1156–1162.

10. Arca, M., Pannitteri, G., Campagna, F., Candeloro, A., Montali, A., Cantini, R., Seccareccia, F., Campa, P. P., Marino, B., & Ricci, G. (1998). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is not associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction in a sample of Italian patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 28(6), 485–490.

11. Audoly, L. P., Le, T. H., & Coffman, T. M. (2000). What can knockout mice contribute to an understanding of hypertension? *Current Hypertension Reports*, 2(2), 192–197.

12. Azar, S. T., Zalloua, P. A., Medlej, R., & Halabi, G. (2001). The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with diabetic nephropathy in type-1 diabetics. *Endocrine Research*, 27(1–2), 99–108.

13. Bangsbo, J., Nørregaard, L., & Thorsø, F. (1991). Activity profile of competition soccer. *Canadian Journal of Sport Sciences = Journal Canadien Des Sciences Du Sport*, 16(2), 110–116.

14. Beggs, A. H., Byers, T. J., Knoll, J. H. M., Boyce, F. M., Bruns, G. A. P., & Kunkel, L. M. (1992). Cloning and characterization of two human skeletal muscle α -actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *Journal of Biological Chemistry*, 267(13), 9281–9288.

15. Bell, C. G., Meyre, D., Petretto, E., Levy-Marchal, C., Hercberg, S., Charles, M. A., Boyle, C., Weill, J., Tauber, M., Mein, C. A., Aitman, T. J., Froguel, P., & Walley, A. J. (2007). No contribution of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene variants to severe obesity: a model for comprehensive case/control and quantitative cladistic analysis of ACE in human diseases. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 15(3), 320–327.

16. Belli, T., Crisp, A. H., & Verlengia, R. (2017). Greater muscle damage in athletes with ACTN3 R577X (RS1815739) gene polymorphism after an ultra-endurance race: a pilot study. *Biology of Sport*, 34(2), 105–110.

17. Ben-Zaken, S., Eliakim, A., Nemet, D., Rabinovich, M., Kassem, E., & Meckel, Y.

- (2015). *ACTN3 Polymorphism: Comparison Between Elite Swimmers and Runners. Sports Medicine - Open*, 1(1), 1–8.
18. Berman, Y., & North, K. N. (2010). A gene for speed: the emerging role of alpha-actinin-3 in muscle metabolism. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(4), 250–259.
 19. Bibrowicz, K., Gilligan, K., & Bibrowicz, B. (2015). Rehabilitacja w praktyce. *MCS - Nowoczesne Narzędzie Oceny Funkcjonalnej w Przygotowaniu Motorycznym i Fizjoterapii Sportowej*, 30–34.
 20. Blair, S. N. (1989). Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 262(17), 2395–2401.
 21. Blanchard, A., Ohanian, V., & Critchley, D. (1989). The structure and function of alpha-actinin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 10(4), 280–289.
 22. Bockaert, J., & Marin, P. (2015). mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiological Reviews*, 95(4), 1157–1187.
 23. Bodor, G. S. (2016). Biochemical Markers of Myocardial Damage. *EJIFCC*, 27(2), 95.
 24. Bouchard, C. (1983). Human adaptability may have a genetic basis. Landry, F. (Ed.), *Health Risk Estimation, Risk Reduction and Health Promotion. Proceedings of the 18th Annual Meeting of the Society of Prospective Medicine. Canadian Public Health Association, Ottawa*, 463–476.
 25. Bouchard, C., Malina, R. M., Perusse, L. (1997). *Genetics of fitness and physical performance*. Human Kinetics.
 26. Bouchard, C. (1992). Genetics of human obesity. *Ann Med Interne (Paris)*, 143(7), 463–471.
 27. Bouchard, C. (2012). Genomic predictors of trainability. *Experimental Physiology*, 97(3), 347–352.
 28. Bouchard, C., Lesage, R., Lortie, G., Simoneau, J. A., Hamel, P., Boulay, M. R., Pérusse, L., Thériault, G., & Leblanc, C. (1986). Aerobic performance in brothers,

dizygotic and monozygotic twins. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 18(6), 639–646.

29. Bouchard, C., Pérusse, L. (1992). Genetics, dietary management and nutritional adaptations. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, 255–263.

30. Bouchard, C., Rankinen, T., Timmons, J. A. (2011). Genomics and genetics in the biology of adaptation to exercise. *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1603–1648.

31. Bray, M. S., Hagberg, J. M., Pérusse, L., Rankinen, T., Roth, S. M., Wolfarth, B., & Bouchard, C. (2009). The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: The 2006-2007 update. In *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 41(1).

32. Burgueño, J., Blake, D. J., Benson, M. A., Tinsley, C. L., Esapa, C. T., Canela, E. I., Penela, P., Mallol, J., Mayor, F., Lluís, C., Franco, R., & Ciruela, F. (2003). The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein α -actinin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37545–37552.

33. Bustamante-Ara, N., Santiago, C., Verde, Z., Yvert, T., Gómez-Gallego, F., Rodríguez-Romo, G., González-Gil, P., Serra-Rexach, J. A., Ruiz, J. R., & Lucia, A. (2010). ACE and ACTN3 genes and muscle phenotypes in nonagenarians. *International Journal of Sports Medicine*, 31(4), 221–224.

34. Cam, S., Colakoglu, M., Colakoglu, S., Sekuri, C., & Berdeli, A. (2007). ACE I/D gene polymorphism and aerobic endurance development in response to training in a non-elite female cohort. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 47(2), 234–238.

35. Cambien, F. (1994). The angiotensin-converting enzyme (ACE) genetic polymorphism: its relationship with plasma ACE level and myocardial infarction. *Clinical Genetics*, 46(1), 94–101.

36. Cambien, F., Alhenc-Gelas, F., Herbeth, B., Andre, J. L., Rakotovao, R., Gonzales, M. F., Allegrini, J., & Bloch, C. (1988). Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *American Journal of Human Genetics*, 43(5), 774–780.

37. Cervenka, L., Mitchell, K. D., & Navar, L. G. (1999). Renal function in mice: Effects of volume expansion and angiotensin II. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(12), 2631–2636.
38. Chan, S., Seto, J. T., MacArthur, D. G., Yang, N., North, K. N., & Head, S. I. (2008). A gene for speed: Contractile properties of isolated whole EDL muscle from an α -actinin-3 knockout mouse. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 295(4), C897-904.
39. Chan, Y. M., Tong, H. Q., Beggs, A. H., & Kunkel, L. M. (1998). Human skeletal muscle-specific α -actinin-2 and -3 isoforms form homodimers and heterodimers in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248(1), 134–139.
40. Chiu, L. L., Wu, Y. F., Tang, M. T., Yu, H. C., Hsieh, L. L., & Hsieh, S. S. Y. (2011). *ACTN3* genotype and swimming performance in Taiwan. *International Journal of Sports Medicine*, 32(6), 476–480.
41. Chowrashi, P., Mittal, B., Sanger, J. M., & Sanger, J. W. (2002). Amorphin is phosphorylase; phosphorylase is an α -actinin-binding protein. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 53(2), 125–135.
42. Ciężczyk, P., Krupecki, K., Maciejewska, A., & Sawczuk, M. (2009). The angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in polish rowers. *International Journal of Sports Medicine*, 30(8), 624–627.
43. Ciężczyk, P., Maciejewska, A., & Sawczuk, M. (2008). *Badania genetyczne w sporcie*. International Association of Ontokinesiologists.
44. Ciężczyk, P., Eider, J., Ostanek, M., Arczewska, A., Leońska-Duniec, A., Sawczyn, S., Ficek, K., & Krupecki, K. (2011). Association of the *ACTN3* R577X polymorphism in Polish power-orientated athletes. *Journal of Human Kinetics*, 28(1), 55–61.
45. Ciężczyk, P., Sawczuk, M., Maciejewska-Karłowska, A., & Ficek, K. (2012). *ACTN3* R577X polymorphism in top-level Polish rowers. *Journal of Exercise Science and Fitness*, 10(1), 12–15.
46. Clarkson, P. M., Devaney, J. M., Gordish-Dressman, H., Thompson, P. D., Hubal,

- M. J., Urso, M., Price, T. B., Angelopoulos, T. J., Gordon, P. M., Moyna, N. M., Pescatello, L. S., Visich, P. S., Zoeller, R. F., Seip, R. L., & Hoffman, E. P. (2005a). *ACTN3* genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *Journal of Applied Physiology*, 99(1), 154–163.
47. Clarkson, P. M., Hoffman, E. P., Zambraski, E., Gordish-Dressman, H., Kearns, A., Hubal, M., Harmon, B., & Devaney, J. M. (2005b). *ACTN3* and *MLCK* genotype associations with exertional muscle damage. *Journal of Applied Physiology*, 99(2), 564–569.
48. Coates, D., Isaac, R. E., Cotton, J., Siviter, R., Williams, T. A., Shirras, A., Corvol, P., & Dive, V. (2000). Functional conservation of the active sites of human and *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*, 39(30), 8963–8969.
49. Colakoglu, M., Cam, F. S., Kayitken, B., Cetinoz, F., Colakoglu, S., Turkmen, M., & Sayin, M. (2005). *ACE* genotype may have an effect on single versus multiple set preferences in strength training. *European Journal of Applied Physiology*, 95(1), 20–26.
50. Cook, G., Burton, L., Hoogenboom, B. J., & Voight, M. (2014). Functional movement screening: the use of fundamental movements as an assessment of function - part 1. *International Journal of Sports Physical Therapy*, 9(3), 396–409.
51. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921–923.
52. Coso, J. Del, Moreno, V., Gutiérrez-Hellín, J., Baltazar-Martins, G., Ruíz-Moreno, C., Aguilar-Navarro, M., Lara, B., & Lucía, A. (2019). *ACTN3* R577X genotype and exercise phenotypes in recreational marathon runners. *Genes*, 10(6), 1–15.
53. Costa, A. M., Silva, A. J., Garrido, N. D., Louro, H., de Oliveira, R. J., & Breitenfeld, L. (2009a). Association between *ACE* D allele and elite short distance swimming. *European Journal of Applied Physiology*, 106(6), 785–790.
54. Costa, A. M., Silva, A. J., Garrido, N. D., Louro, H., Marinho, D. A., Marques, M. C., & Breitenfeld, L. (2009b). Angiotensin-converting enzyme genotype affects skeletal muscle strength in elite athletes. *Journal of Sports Science and Medicine*, 8(3), 410–

418.

55. Cukovic, D., Lu, G. W. K., Wible, B., Steele, D. F., & Fedida, D. (2001). A discrete amino terminal domain of Kv1.5 and Kv1.4 potassium channels interacts with the spectrin repeats of α -actinin-2. *FEBS Letters*, 498(1), 87–92.
56. de Lira, C. A. B., Vancini, R., Fachina, R., Montagner, P., Pesquero, J., Andrade, M., & Borin, J. (2014). Genetic aspects of athletic performance: the African runners phenomenon. *Open Access Journal of Sports Medicine*, 2014(5), 123-127.
57. Defoor, J., Vanhees, L., Martens, K., Matthijs, G., Van Vlerken, A., Zielinska, D., Schepers, D., Vlietinck, R., & Fagard, R. (2006). The CAREGENE study: ACE gene I/D polymorphism and effect of physical training on aerobic power in coronary artery disease. *Heart*, 92(4), 527–528.
58. Del Coso, J., Salinero, J. J., Lara, B., Gallo-Salazar, C., Areces, F., Herrero, D., & Puente, C. (2017). Polygenic Profile and Exercise-Induced Muscle Damage by a Competitive Half-Ironman. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 34(5):1400-1408.
59. Delmonico, M. J., Kostek, M. C., Doldo, N. A., Hand, B. D., Walsh, S., Conway, J. M., Carignan, C. R., Roth, S. M., & Hurley, B. F. (2007). Alpha-actinin-3 (ACTN3) R577X polymorphism influences knee extensor peak power response to strength training in older men and women. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(2), 206–212.
60. Denham, J., Marques, F. Z., O'Brien, B. J., & Charchar, F. J. (2014). Exercise: Putting action into our epigenome. In *Sports Medicine*, 44(2), 189–209).
61. Domańska-Senderowska, D., Szmigielska, P., Snochowska, A., Jastrzębski, Z., Jegier, A., Kiszalkiewicz, J., Jastrzębska, J., Pastuszek-Lewandoska, D., Cięszczyk, P., Suchanecka, A., Wilk, M., Brzeziński, M., & Brzezińska-Lasota, E. (2019). Relationships between the expression of the ACTN3 gene and explosive power of soccer players. *Journal of Human Kinetics*, 69(1), 79–87.
62. Dragovic, T., Minshall, R., Jackman, H. L., Wang, L. X., & Erdos, E. G. (1996). Kininase II-type enzymes: Their putative role in muscle energy metabolism. *Diabetes*, 45(1 SUPPL.), 34-7.

63. Druzhevskaya, A. M., Ahmetov, I. I., Astratenkova, I. V., & Rogozkin, V. A. (2008). Association of the *ACTN3* R577X polymorphism with power athlete status in Russians. *European Journal of Applied Physiology*, 103(6), 631–634.
64. Dunah, A. W., Wyszynski, M., Martin, D. M., Sheng, M., & Standaert, D. G. (2000). alpha-actinin-2 in rat striatum: localization and interaction with NMDA glutamate receptor subunits. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 79(1–2), 77–87.
65. Dzau, V. J., & Gibbons, G. H. (1988). Cell biology of vascular hypertrophy in systemic hypertension. *The American Journal of Cardiology*, 62(11), 30–35.
66. Ehret, G. B., Munroe, P. B., Rice, K. M., Bochud, M., Johnson, A. D., Chasman, D. I., Smith, A. V., Tobin, M. D., Verwoert, G. C., Hwang, S. J., Pihur, V., Vollenweider, P., O'Reilly, P. F., Amin, N., Bragg-Gresham, J. L., Teumer, A., Glazer, N. L., Launer, L., Zhao, J. H., ... Johnson, T. (2011). Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*, 478(7367), 103–109.
67. Eider, J., Ciężczyk, P., Ficek, K., Leońska-Duniec, A., Sawczuk, M., Maciejewska-Karłowska, A., & Zarebska, A. (2013). The association between D allele of the *ACE* gene and power performance in Polish elite athletes. *Science and Sports*, 28(6), 325–330.
68. Erskine, R. M., Williams, A. G., Jones, D. A., Stewart, C. E., & Degens, H. (2014). The individual and combined influence of *ACE* and *ACTN3* genotypes on muscle phenotypes before and after strength training. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 24(4), 642–648.
69. Eynon, N., Alves, A. J., Yamin, C., Sagiv, M., Duarte, J. A., Oliveira, J., Ayalon, M., Goldhammer, E., Sagiv, M., & Meckel, Y. (2009). Is there an *ACE* ID - *ACTN3* R577X polymorphisms interaction that influences sprint performance? *International Journal of Sports Medicine*, 30(12), 888–891.
70. Eynon, N., Duarte, J. A., Oliveira, J., Sagiv, M., Yamin, C., Meckel, Y., Sagiv, M., & Goldhammer, E. (2009). *ACTN3* R577X polymorphism and israeli top-level athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 30(9), 695–698.
71. Ferrario, C. M. (1998). Angiotension-(1-7) and antihypertensive mechanisms.

Journal of Nephrology, 11(6), 278–283.

72. Ficek, J., Kokot, F., Chudek, J., Adamczak, M., Ficek, R., & Więcek, A. (2002). Influence of antihypertensive treatment with perindopril, pindolol or felodipin on plasma leptin concentration in patients with essential hypertension. *Hormone and Metabolic Research*, 34(11–12), 703–708.

73. Folland, J., Leach, B., Little, T., Hawker, K., Myerson, S., Montgomery, H., & Jones, D. (2000). Angiotensin-converting enzyme genotype affects the response of human skeletal muscle to functional overload. *Experimental Physiology*, 85(5), 575–579.

74. Fridén, J., & Lieber, R. L. (2001). Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171(3), 321–326.

75. Garatachea, N., Fiuza-Luces, C., Torres-Luque, G., Yvert, T., Santiago, C., Gómez-Gallego, F., Ruiz, J. R., & Lucia, A. (2012). Single and combined influence of *ACE* and *ACTN3* genotypes on muscle phenotypes in octogenarians. *European Journal of Applied Physiology*, 112(7), 2409–2420.

76. Gayagay, G., Yu, B., Hambly, B., Boston, T., Hahn, A., Celermajer, D. S., & Trent, R. J. (1998). Elite endurance athletes and the *ACE* I allele - The role of genes in athletic performance. *Human Genetics*, 103(1), 48–50.

77. Giaccaglia, V., Nicklas, B., Kritchevsky, S., Mychalecky, J., Messier, S., Bleecker, E., & Pahor, M. (2008). Interaction between angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype and exercise training on knee extensor strength in older individuals. *International Journal of Sports Medicine*, 29(1), 40–44.

78. Gineviciene, V., Jakaitiene, A., Aksenov, M. O., Aksenova, A. V., Druzhevskaya, A. M., Astratenkova, I. V., Egorova, E. S., Gabdrakhmanova, L. J., Tubelis, L., Kucinskas, V., & Utkus, A. (2016). Association analysis of *ACE*, *ACTN3* and *PPARGC1A* gene polymorphisms in two cohorts of European strength and power athletes. *Biology of Sport*, 33(3), 199–206.

79. Gómez-Gallego, F., Santiago, C., González-Freire, M., Muniesa, C. A., Fernández Del Valle, M., Pérez, M., Foster, C., & Lucia, A. (2009). Endurance performance:

Genes or gene combinations? *International Journal of Sports Medicine*, 30(1), 66–72.

80. Górski, J. (2011). *Fizjologia wysiłku i treningu fizycznego*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.

81. Grenda, A., Leońska-Duniec, A., Kaczmarczyk, M., Ficek, K., Król, P., Ciężczyk, P., & Żmijewski, P. (2014). Interaction between *ACE* I/D and *ACTN3* R557X polymorphisms in polish competitive swimmers. *Journal of Human Kinetics*, 42(1), 127–136.

82. Guth, L. M., & Roth, S. M. (2013). Genetic influence on athletic performance. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(6), 653–658.

83. Ha, S. K., Lee, S. Y., Park, H. S., Shin, J. H., Kim, S. J., Kim, D. H., Kim, K. R., Lee, H. Y., & Han, D. S. (2000). *ACE* DD genotype is more susceptible than *ACE* II and ID genotypes to the antiproteinuric effects of ACE inhibitors in patients with proteinuric non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(10), 1617–1623.

84. Hagberg, J. M., Ferrell, R. E., Mccole, S. D., Wilund, K. R., Moore, G. E., (1998). VO_{2max} is associated with *ACE* genotype in postmenopausal women. *Journal of Applied Physiology*, 85(5), 1842–1846.

85. Haleczko, A., Jezierski, R., Korzewa, L., Misio, E., & Urszula, W. (2010). Formy selekcji i identyfikowania talentów przy doborze dzieci do szkolenia. *Antropomotoryka*, 50, 27–38.

86. Heath, B. H., & Carter, J. E. L. (1967). A modified somatotype method. *American Journal of Physical Anthropology*, 27(1), 57–74.

87. Hernández, D., De La Rosa, A., Barragán, A., Barrios, Y., Salido, E., Torres, A., Martín, B., Laynez, I., Duque, A., De Vera, A., Lorenzo, V., & González, A. (2003). The *ACE*/DD genotype is associated with the extent of exercise-induced left ventricular growth in endurance athletes. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(3), 527–532.

88. Higuchi, R., Dollinger, G., Sean Walsh, P., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*, 10(4), 413–

417.

89. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11(9), 1026–1030.
90. Hitachi, K., & Tsuchida, K. (2014). Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Frontiers in Physiology*, 4(408), 1-7.
91. Holdys, J., Kryściak, J., Stanisławski, D., & Gronek, P. (2011). Polymorphism of the *ACTN3* gene in individuals practising different sports disciplines. *Biology of Sport*, 28(2), 101–106.
92. Holdys, J., Kryściak, J., Stanisławski, D., & Gronek, P. (2011). *ACE* I/D gene polymorphism in athletes of various sports disciplines. *Human Movement*, 12(3), 223–231.
93. Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H., & Hirohashi, S. (1998). Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *Journal of Cell Biology*, 140(6), 1383–1393.
94. Hosoi, M., Nishizawa, Y., Kogawa, K., Kawagishi, T., Konishi, T., Maekawa, K., Emoto, M., Fukumoto, S., Shioi, A., Shoji, T., Inaba, M., Okuno, Y., & Morii, H. (1996). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with carotid arterial wall thickness in non-insulin-dependent diabetic patients. *Circulation*, 94(4), 704–707.
95. Howard, T., Balogh, R., Overbeek, P., & Bernstein, K. E. (1993). Sperm-specific expression of angiotensin-converting enzyme (*ACE*) is mediated by a 91-base-pair promoter containing a CRE-like element. *Molecular and Cellular Biology*, 13(1), 18–27.
96. Hruskovicova, H., Dzurenkova, D., Selingerova, M., Bohus, B., Timkanicova, B., & Kovacs, L. (2006). The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in long distance runners. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 46(3), 509–513.
97. Hubert, C., Houot, A. M., Corvol, P., & Soubrier, F. (1991). Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene: Two alternate promoters correspond to

evolutionary steps of a duplicated gene. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15377–15383.

98. Hübner-Woźniak, E., & Lutosławska, G. (2000). *Podstawy biochemii wysiłku fizycznego*. Warszawa: Centralny Ośrodek Sportu.

99. Hunter, D. J., James, L., Hussey, B., Wadley, A. J., Lindley, M. R., & Mastana, S. S. (2019). Impact of aerobic exercise and fatty acid supplementation on global and gene-specific DNA methylation. *Epigenetics*, 14(3), 294–309.

100. Inbar, O., Medical, S., Module, C., Test, C. E., View, R., & Inbar, O. (2015). Development of anaerobic power and local muscular endurance. *The Encyclopedia of Sports Medicine*, 42–53.

101. Ishigami, T., Iwamoto, T., Tamura, K., Yamaguchi, S., Iwasawa, K., Uchino, K., Umemura, S., & Ishii, M. (1995). Angiotensin I converting enzyme (ACE) gene polymorphism and essential hypertension in Japan. Ethnic difference of ACE genotype. *American Journal of Hypertension*, 8(1), 95–97.

102. Iwai, N., Ohmichi, N., Nakamura, Y., & Kinoshita, M. (1994). DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation*, 90(6), 2622–2628.

103. Jayanthi, N. A., Labella, C. R., Fischer, D., Pasulka, J., Dugas, L. R., (2015). Talent identification and specialization. Sports-specialized Intensive Training and the Risk of Injury in Young Athletes: A Clinical Case-Control Study. *The American Journal of Sports Medicine*, 43(4), 794-801.

104. Jones, A., Montgomery, H. E., & Woods, D. R. (2002). Human performance: a role for the ACE genotype?. *Exercise & Sport Sciences Reviews*, 30(4), 184–190.

105. Karlsson, E. K., Sigurdsson, S., Ivansson, E., Thomas, R., Elvers, I., Wright, J., Howald, C., Tonomura, N., Perloski, M., Swofford, R., Biagi, T., Fryc, S., Anderson, N., Courtay-Cahen, C., Youell, L., Ricketts, S. L., Mandlebaum, S., Rivera, P., von Euler, H., ... Lindblad-Toh, K. (2013). Genome-wide analyses implicate 33 loci in heritable dog osteosarcoma, including regulatory variants near CDKN2A/B. *Genome Biology*, 14(12), R132.

106. Kem, D. C., & Brown, R. D. (1990). Renin $\Leftrightarrow$ from beginning to end. *New England Journal of Medicine* 323(16), 1136–1137.
107. Kikuchi, N., Massidda, M., Miyamae, T., Suzuki, S., Inoue, A., Kobatake, N., Masala, D., Calo', C. M., & Nakazato, K. (2018). Association Between *ACTN3* R577X Polymorphism And Weight-lifting Performance In Japanese And Italian Athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 50(May), 348.
108. Kikuchi, N., & Nakazato, K. (2015). Effective utilization of genetic information for athletes and coaches: focus on *ACTN3* R577X polymorphism. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 19(3), 157–164.
109. Kikuchi, N., Ueda, D., Min, S. K., Nakazato, K., & Igawa, S. (2013). The *ACTN3* XX genotype's underrepresentation in japanese elite wrestlers. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 8(1), 57–61.
110. Kim, H., Song, K.-H., & Kim, C.-H. (2014). The *ACTN3* R577X variant in sprint and strength performance. *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry*, 18(4), 347–353.
111. Kim, J. H., Jung, E. S., Kim, C.-H., Youn, H., & Kim, H. R. (2014). Genetic associations of body composition, flexibility and injury risk with *ACE*, *ACTN3* and *COL5A1* polymorphisms in Korean ballerinas. *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry*, 18(2), 205–214.
112. Klahr, S., & Morrissey, J. J. (2000). The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney International. Supplement*, 75, 7-14.
113. Komi, P. V., Klissouras, V., & Karvinen, E. (1973). Genetic variation in neuromuscular performance. *Internationale Zeitschrift Für Angewandte Physiologie Einschliesslich Arbeitsphysiologie*, 31(4), 289–304.
114. Korochkin, L. I. (2006). What is epigenetics. *Genetika*, 42(9), 1156–1164.
115. Kregge, J. H., John, S. W. M., Langenbach, L. L., Hodgins, J. B., Hagaman, J. R., Bachman, E. S., Jennette, J. C., O'Brien, D. A., & Smithies, O. (1995). Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375(6527),

146–148.

116. Kremer, A. E., & Weisshaar, E. (2016). Endocrine diseases. *Pruritus: Second Edition*, 267-270.

117. Larsen, H. B. (2003). Kenyan dominance in distance running. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 136(1), 161–170.

118. Lek, M., Quinlan, K. G. R., & North, K. N. (2010). The evolution of skeletal muscle performance: Gene duplication and divergence of human sarcomeric α -actinins. *BioEssays*, 32(1), 17–25.

119. Levine, B. D. (2008). $\dot{V}O_2$: What do we know, and what do we still need to know? *Journal of Physiology*, 586(1), 25–34.

120. Li, Y., Wang, L. Q., Yi, L., Liu, J., Hu, Y., Lu, Y., & Wang, M. (2017). *ACTN3* R577X genotype and performance of elite middle-long distance swimmers in China. *Biology of Sport*, 34(1), 39–43.

121. Little, J., Higgins, J. P. T., Ioannidis, J. P. A., Moher, D., Gagnon, F., Von Elm, E., Khoury, M. J., Cohen, B., Davey-Smith, G., Grimshaw, J., Scheet, P., Gwinn, M., Williamson, R. E., Zou, G. Y., Hutchings, K., Johnson, C. Y., Tait, V., Wiens, M., Golding, J., ... Birkett, N. (2009). STrengthening the REporting of genetic association studies (STREGA) - An extension of the STROBE statement. *Genetic Epidemiology*, 33(7), 581–598.

122. Lucía, A., Gómez-Gallego, F., Chicharro, J. L., Hoyos, J., Celaya, K., Córdova, A., Villa, C., Alonso, J. M., Barriopedro, M., Pérez, M., & Earnest, C. P. (2005). Is there an association between *ACE* and *CKMM* polymorphisms and cycling performance status during 3-week races? *International Journal of Sports Medicine*, 26(6), 442–447.

123. Lucia, A., Hoyos, J., & Chicharro, J. L. (2001). Physiology of professional road cycling. *Sports Medicine* 31(5), 325–337.

124. Lucia, A., Gómez-Gallego, F., Santiago, C., Bandrés, F., Earnest, C., Rabadán, M., Alonso, J. M., Hoyos, J., Córdova, A., Villa, C., & Foster, C. (2006). *ACTN3* genotype in professional endurance cyclists. *International Journal of Sports Medicine*, 27(11),

880–884.

125. MacArthur, D. G., & North, K. N. (2004). A gene for speed? The evolution and function of α -actinin-3. *BioEssays*, 26(7), 786–795.

126. MacArthur, D. G., & North, K. N. (2007). *ACTN3*: A genetic influence on muscle function and athletic performance. In *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 35(1), 30–34.

127. MacArthur, D. G., Seto, J. T., Raftery, J. M., Quinlan, K. G., Huttley, G. A., Hook, J. W., Lemckert, F. A., Kee, A. J., Edwards, M. R., Berman, Y., Hardeman, E. C., Gunning, P. W., Easteal, S., Yang, N., & North, K. N. (2007). Loss of *ACTN3* gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nature Genetics*, 39(10), 1261–1265.

128. MacDougall, J. D., Wenger, H. A. (Howard A., Green, H. J., & Canadian Association of Sports Sciences. (1991). *Physiological testing of the high-performance athlete*. Human Kinetics.

129. Maier-Lenz, D., Rauramaa, R., Rivera, M. A., Boulay, M. R., Keul, J., Bouchard, C., Chagnon, Y. C., Pe, L., & Miguel, A. (2000). No association between the angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and elite endurance athlete status. *Journal of Applied Physiology*, 1, 1571–1575.

130. Maitikuerban, B., Sun, X., Li, Y., Chen, Y., Zhang, J., Simayi, Z., Xu, X., & Zhang, X. (2019). Deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with left ventricular hypertrophy in uighur hypertension-obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS) patients. *Medical Science Monitor*, 25, 3390–3396.

131. Malik, F. S., Lavie, C. J., Mehra, M. R., Milani, R. V., & Re, R. N. (1997). Renin-angiotensin system: Genes to bedside. *American Heart Journal*, 134(3), 514–526.

132. Mann, T. N., Lamberts, R. P., & Lambert, M. I. (2014). High responders and low responders: Factors associated with individual variation in response to standardized training. *Sports Medicine*, 44(8), 1113–1124.

133. Margolis, L. M., Lessard, S. J., Ezzyat, Y., Fielding, R. A., & Rivas, D. A. (2017).

Circulating MicroRNA Are Predictive of Aging and Acute Adaptive Response to Resistance Exercise in Men. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 72(10), 1319–1326.

134. Maron, B. J., Pelliccia, A. (2006). The heart of trained athletes: Cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation*, 114(15), 1633–1644.

135. Massidda, M., Bachis, V., Corrias, L., Piras, F., Scorcu, M., Culigioni, C., Masala, D., & Calò, C. M. (2015). *ACTN3* R577X polymorphism is not associated with team sport athletic status in Italians. *Sports Medicine - Open*, 1(1), 3–7.

136. Massidda, M., Vona, G., & Calò, C. M. (2009). Association between the *ACTN3* R577X polymorphism and artistic gymnastic performance in Italy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(3), 377–380.

137. Masters, C. (1984). Interactions between glycolytic enzymes and components of the cytomatrix. *Journal of Cell Biology*, 99(1), 222–225.

138. Mattei M.G., Hubert C., Alhenc-Gelas. F. i wsp. (1989). Angiotensin-I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytoge- Net. Cell. Genet.*, 51, 1041.

139. Mayer, S. W., Queen, R. M., Taylor, D., Moorman, C. T., Toth, A. P., Garrett, W. E., & Butler, R. J. (2015). Functional testing differences in anterior cruciate ligament reconstruction patients released versus not released to return to sport. *American Journal of Sports Medicine*, 43(7), 1648–1655.

140. Mayne, I. (2006). Examination of the *ACE* and *ACTN3* Genes in UTC Varsity Athletes and Sedentary Students. *Honors paper-University of Tennessee at Chattanooga, Biological and Environmental Sciences*.

141. Mills, M. (2001). Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Human Molecular Genetics*, 10(13), 1335–1346.

142. Min, S. K., Takahashi, K., Ishigami, H., Hiranuma, K., Mizuno, M., Ishii, T., Kim, C. S., & Nakazato, K. (2009). Is there a gender difference between *ACE* gene and race distance? *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 34(5), 926–932.

143. Minahan, C., Chia, M., & Inbar, O. (2007). Does power indicate capacity? 30-S wingate anaerobic test vs. maximal accumulated O₂ deficit. *International Journal of Sports Medicine*, 28(10), 836–843.
144. Montgomery, H. (1997). Should the contribution of *ACE* gene polymorphism to left ventricular hypertrophy be reconsidered? *Heart*, 77(6), 489–490.
145. Montgomery, H. E., Clarkson, P., Dollery, C. M., Prasad, K., Losi, M. A., Hemingway, H., Statters, D., Jubb, M., Girvain, M., Varnava, A., World, M., Deanfield, J., Talmud, P., McEwan, J. R., McKenna, W. J., & Humphries, S. (1997). Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation*, 96(3), 741–747.
146. Montgomery, H. E., Holliman, D. E., & Rayson, M. (1998). Human gene for physical performance. *Nature*, 393(6682), 221–222.
147. Muniesa, C. A., González-Freire, M., Santiago, C., Lao, J. I., Buxens, A., Rubio, J. C., Martín, M. A., Arenas, J., Gomez-Gallego, F., & Lucia, A. (2010). World-class performance in lightweight rowing: Is it genetically influenced? A comparison with cyclists, runners and non-athletes. *British Journal of Sports Medicine*, 44(12), 898–901.
148. Myerson, S., Hemingway, H., Budget, R., Martin, J., Humphries, S., & Montgomery, H. (1999). Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. *Journal of Applied Physiology*, 87(4), 1313–1316.
149. Narain, Y., Furlong, R. A., Robinsztein, D. C., Yip, A., Murphy, T., Brayne, C., Easton, D., Evans, J. G., Xuereb, J., Cairns, N., & Esiri, M. M. (2000). The *ACE* gene and Alzheimer's disease susceptibility. *Journal of Medical Genetics*, 37(9), 695–697.
150. Navis, G., Van Der Kleij, F. G. H., De Zeeuw, D., & De Jong, P. E. (1999). Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. *Journal of Molecular Medicine*, 77(11), 781–791.
151. Nawarycz, T., Jankowski, J., Baszczyński, J., Nawarycz-Ostrowska, L., & Kajdos, Z. (1996). Analiza porównawcza niektórych metod oznaczania zawartości tkanki tłuszczowej. *Przegląd Antropologiczny*, 59, 101-106.
152. Nazarov, I. B., Woods, D. R., Montgomery, H. E., Shneider, O. V., Kazakov, V. I.,

- Tomilin, N. V., & Rogozkin, V. A. (2001). The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. *European Journal of Human Genetics*, 9(10), 797–801.
153. Nedeljkovic, A., Mirkov, D. M., Pazin, N., & Jaric, S. (2007). Evaluation of Margaria staircase test: The effect of body size. *European Journal of Applied Physiology*, 100(1), 115–120.
154. Niemi, A. K., & Majamaa, K. (2005). Mitochondrial DNA and *ACTN3* genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *European Journal of Human Genetics*, 13(8), 965–969.
155. Norman, B., Esbjörnsson, M., Rundqvist, H., Österlund, T., Glenmark, B., & Jansson, E. (2014). *ACTN3* genotype and modulation of skeletal muscle response to exercise in human subjects. *Journal of Applied Physiology*, 116(9), 1197–1203.
156. North, K. (2008). Why is α -actinin-3 deficiency so common in the general population? The evolution of athletic performance. *Twin Research and Human Genetics*, 11(4), 384–394.
157. Nybo, L., Dalsgaard, M. K., Steensberg, A., Møller, K., & Secher, N. H. (2005). Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *Journal of Physiology*, 563(1), 285–290.
158. Ohsawa, I., Konno, R., Masuzawa, R., & Kawano, F. (2018). Amount of daily exercise is an essential stimulation to alter the epigenome of skeletal muscle in rats. *Journal of Applied Physiology*, 125(4), 1097–1104.
159. Orysiak, J., Busko, K., Michalski, R., Mazur-Rózycka, J., Gajewski, J., Malczewska-Lenczowska, J., Sitkowski, D., & Pokrywka, A. (2014). Relationship between *ACTN3* R577x polymorphism and maximal power output in elite polish athletes. *Medicina (Lithuania)*, 50(5), 303–308.
160. Osiński, W. (2003). *Antropomotoryka*. Poznań: Wydawnictwo AWF.
161. Pac-Pomaracki, A. (2008). Talent sportowy - definicja, selekcja, szkolenie. *Sport Wyczynowy*, 4-5–6, 111–159.
162. Papadimitriou, I. D., Papadopoulos, C., Kouvatsi, A., & Triantaphyllidis, C.

(2008). The *ACTN3* gene in elite greek track and field athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 29(4), 352–355.

163. Papadimitriou, I. D., Lockey, S. J., Voisin, S., Herbert, A. J., Garton, F., Houweling, P. J., Cieszczyk, P., Maciejewska-Skrendo, A., Sawczuk, M., Massidda, M., Calò, C. M., Astratenkova, I. V., Kouvatsi, A., Druzhevskaya, A. M., Jacques, M., Ahmetov, I. I., Stebbings, G. K., Heffernan, S., Day, S. H., ... Eynon, N. (2018). No association between *ACTN3* R577X and *ACE* I/D polymorphisms and endurance running times in 698 Caucasian athletes. *BMC Genomics*, 19(1), 1–9.

164. Papadimitriou, I. D., Lucia, A., Pitsiladis, Y. P., Pushkarev, V. P., Dyatlov, D. A., Orekhov, E. F., Artioli, G. G., Guilherme, J. P. L. F., Lancha, A. H., Ginevičiene, V., Cieszczyk, P., Maciejewska-Karlowska, A., Sawczuk, M., Muniesa, C. A., Kouvatsi, A., Massidda, M., Calò, C. M., Garton, F., Houweling, P. J., ... Eynon, N. (2016). *ACTN3* R577X and *ACE* I/D gene variants influence performance in elite sprinters: A multi-cohort study. *BMC Genomics*, 17(1), 1–8.

165. Papadimitriou, I.D., Papadopoulos, C., Kouvatsi, A., & Triantaphyllidis, C. (2009). The *ACE* I/D polymorphism in elite Greek track and field athletes. *J Ports Med Phys Fitness*, 49, 459–463.

166. Patel, S., Woods, D. R., Macleod, N. J., Brown, A., Patel, K. R., Montgomery, H. E., & Peacock, A. J. (2003). Angiotensin-converting enzyme genotype and the ventilatory response to exertional hypoxia. *European Respiratory Journal*, 22(5), 755–760.

167. Pereira, A., Costa, A. M., Izquierdo, M., Silva, A. J., Bastos, E., & Marques, M. C. (2013a). *ACE* I/D and *ACTN3* R/X polymorphisms as potential factors in modulating exercise-related phenotypes in older women in response to a muscle power training stimuli. *Age*, 35(5), 1949–1959.

168. Pereira, A., Costa, A. M., Izquierdo, M., Silva, A. J., Bastos, E., & Marques, M. C. (2013b). *ACE* I/D and *ACTN3* R/X polymorphisms as potential factors in modulating exercise-related phenotypes in older women in response to a muscle power training stimuli. *Age*, 35(5), 1949–1959.

169. Pescatello, L. S., Kostek, M. A., Gordish-Dressman, H., Thompson, P. D., Seip, R.

- L., Price, T. B., Angelopoulos, T. J., Clarkson, P. M., Gordon, P. M., Moyna, N. M., Visich, P. S., Zoeller, R. F., Devaney, J. M., & Hoffman, E. P. (2006). ACE ID genotype and the muscle strength and size response to unilateral resistance training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 38(6), 1074–1081.
170. Phillips, P. C. (2008). Epistasis - The essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics*, 9(11), 855–867.
171. Pickering, C., & Kiely, J. (2017a). Can the ability to adapt to exercise be considered a talent—and if so, can we test for it? *Sports Medicine - Open*, 3(1).
172. Pickering, C., & Kiely, J. (2017b). Understanding Personalized Training Responses: Can Genetic Assessment Help? *The Open Sports Sciences Journal*, 10(1), 191–213.
173. Pietrobelli, A., & Heymsfield, S. B. (2002). Establishing body composition in obesity. *Journal of Endocrinological Investigation*, 25(10), 884–892.
174. Pimenta, E. M., Coelho, D. B., Cruz, I. R., Morandi, R. F., Veneroso, C. E., De Azambuja Pussieldi, G., Carvalho, M. R. S., Silami-Garcia, E., & De Paz Fernández, J. A. (2012). The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. *European Journal of Applied Physiology*, 112(4), 1495–1503.
175. Pitsiladis, Y. P., Tanaka, M., Eynon, N., Bouchard, C., North, K. N., Williams, A. G., Collins, M., Moran, C. N., Britton, S. L., Fuku, N., Ashley, E. A., Klissouras, V., Lucia, A., Ahmetov, I. I., De Geus, E., Alsayrafi, M., Webborn, N., Wang, G., Bishop, D. J., ... Pushkarev, V. P. (2016). Athlome project consortium: A concerted effort to discover genomic and other “omic” markers of athletic performance. *Physiological Genomics*, 48(3), 183–190.
176. Porcari, J. P., Bryant, C. X., & Comana, F. (2015). *Exercise physiology*. American Council on Exercise
177. Poy, M. N., Spranger, M., & Stoffel, M. (2007). microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9(2), 67–73.
178. Puthuchery, Z., Skipworth, J. R. A., Rawal, J., Loosemore, M., Van Someren, K., & Montgomery, H. E. (2011). The ACE gene and human performance: 12 Years on.

Sports Medicine, 41(6), 433–448.

179. Qi, B., Liu, J. Q., & Liu, G. L. (2016). Genetic association between *ACTN3* polymorphism and risk of non-acute ankle sprain. *Genetics and Molecular Research*, 15(4).

180. Rakus, D., Mamczur, P., Gizak, A., Dus, D., & Dzugaj, A. (2003). Colocalization of muscle FBPase and muscle aldolase on both sides of the Z-line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(2), 294–299.

181. Ramos, A. E., Lo, C., Estephan, L. E., Tai, Y. Y., Tang, Y., Zhao, J., Sugahara, M., Gorcsan, J., Brown, M. G., Lieberman, D. E., Chan, S. Y., & Baggish, A. L. (2018). Specific circulating microRNAs display dose-dependent responses to variable intensity and duration of endurance exercise. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 315(2), 273–283.

182. Rankinen, T., Fuku, N., Wolfarth, B., Wang, G., Sarzyński, M. A., Alexeev, D. G., Ahmetov, I. I., Boulay, M. R., Cięszczyk, P., Eynon, N., Filipenko, M. L., Garton, F. C., Generozov, E. V., Govorun, V. M., Houweling, P. J., Kawahara, T., Kostryukova, E. S., Kulemin, N. A., Larin, A. K., ... Bouchard, C. (2016). No evidence of a common DNA variant profile specific to world class endurance athletes. *PLoS ONE*, 11(1), 1–24.

183. Rankinen, T., Pérusse, L., Gagnon, J., Chagnon, Y. C., Leon, A. S., Skinner, J. S., Wilmore, J. H., Rao, D. C., & Bouchard, C. (2000a). Angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and fitness phenotypes in the HERITAGE family study. *Journal of Applied Physiology*, 88(3), 1029–1035.

184. Rankinen, T., Wolfarth, B., Simoneau, J. aimé, Maier-Lenz, D., Rauramaa, R., Rivera, M. A., Boulay, M. R., Chagnon, Y. C., Pérusse, L., Keul, J., & Bouchard, C. (2000b). No association between the angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and elite endurance athlete status. *Journal of Applied Physiology*, 88(5), 1571–1575.

185. Ranković, G., Mutavdžić, V., Toskić, D., Preljević, A., Kocić, M., Nedin-Ranković, G., & Damjanović, N. (2010). Aerobic capacity as an indicator in different kinds of sports. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 10(1), 44–48.

186. Rattigan, S., Dora, K. A., Tong, A. C. Y., & Clark, M. G. (1996). Perfused skeletal muscle contraction and metabolism improved by angiotensin II-mediated

vasoconstriction. *American Journal of Physiology*, 271(1 PART 1).

187. Raynolds, M. V, & Perryman, M. B. (1995). The role of genetic variants in angiotensin I converting enzyme, angiotensinogen and the angiotensin II type-1 receptor in the pathophysiology of heart muscle disease. *European Heart Journal*, 16 Suppl K, 23–30.

188. Rella, M., Elliot, J. L., Revett, T. J., Lanfear, J., Phelan, A., Jackson, R. M., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2007). Identification and characterisation of the angiotensin converting enzyme-3 (*ACE3*) gene: A novel mammalian homologue of *ACE*. *BMC Genomics*, 8(194).

189. Rezapour, S., Shiravand, M., & Mardani, M. (2018). Epigenetic changes due to physical activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(6), 761-767.

190. Rieder, M. J., Taylor, S. L., Clark, A. G., & Nickerson, D. A. (1999). Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nature Genetics*, 22(1), 59–62.

191. Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., & Soubrier, F. (1990). An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation*, 86(4), 1343–1346.

192. Rodríguez-Romo, G., Ruiz, J. R., Santiago, C., Fiuza-Luces, C., González-Freire, M., Gómez-Gallego, F., Morán, M., & Lucia, A. (2010). Does the *ACE* I/D polymorphism, alone or in combination with the *ACTN3* R577X polymorphism, influence muscle power phenotypes in young, non-athletic adults? *European Journal of Applied Physiology*, 110(6), 1099–1106.

193. Rodríguez-Romo, G., Yvert, T., De Diego, A., Santiago, C., Díaz De Durana, A. L., Carratalá, V., Garatachea, N., & Lucia, A. (2013). No association between *ACTN3* R577X polymorphism and elite judo athletic status. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 8(5), 579–581.

194. Ronikier, A. (2001). *Fizjologia Sportu*. Warszawa: Centralny Ośrodek Sportu.

195. Roth, S. M. (2007). *Genetics primer for exercise science and health*. Human Kinetics.

196. Roth, S. M., Walsh, S., Liu, D., Metter, E. J., Ferrucci, L., & Hurley, B. F. (2008a). The *ACTN3* R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *European Journal of Human Genetics*, 16(3), 391–394.
197. Roth, S. M., Walsh, S., Liu, D., Metter, E. J., Ferrucci, L., & Hurley, B. F. (2008b). The *ACTN3* R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *European Journal of Human Genetics*, 16(3), 391–394.
198. Ruiz, J. R., Santiago, C., Yvert, T., Muniesa, C., Díaz-Ureña, G., Bekendam, N., Fiuza-Luces, C., Gómez-Gallego, F., Femia, P., & Lucia, A. (2013). *ACTN3* genotype in Spanish elite swimmers: No “heterozygous advantage.” *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 23(3), 1–6.
199. Ruiz, J. R., Sui, X., Lobelo, F., Morrow, J. R., Jackson, A. W., Sjöström, M., & Blair, S. N. (2008). Association between muscular strength and mortality in men: Prospective cohort study. *BMJ*, 337(7661), 92–95.
200. Saczuk, J., Popławska, H., & Zieniewicz, A. (2001). Zależności pomiędzy wybranymi cechami morfologicznymi a sprawnością fizyczną dziewcząt. *Wychowanie Fizyczne i Zdrowotne*, 1, 17–21.
201. Sadeghi, A., Doyle, A. D., & Johnson, B. D. (2002). Regulation of the cardiac L-type Ca^{2+} channel by the actin-binding proteins α -actinin and dystrophin. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 282(6 51-6).
202. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.
203. Santiago, C., González-Freire, M., Serratos, L., Morate, F. J., Meyer, T., Gómez-Gallego, F., & Lucia, A. (2008). *ACTN3* genotype in professional soccer players. *British Journal of Sports Medicine*, 42(1), 71–73.
204. Saunders, C. J., September, A. V., Xenophontos, S. L., Cariolou, M. A., Anastassiades, L. C., Noakes, T. D., & Collins, M. (2007). No association of the *ACTN3* gene R577X polymorphism with endurance performance in Ironman Triathlons. *Annals of Human Genetics*, 71(6), 777–781.

205. Savulescu, J., & Foddy, B. (2005). Comment: genetic test available for sports performance. *British Journal of Sports Medicine*, 39(8), 472.
206. Sayed-Tabatabaei, F. A., Oostra, B. A., Isaacs, A., Van Duijn, C. M., & Witteman, J. C. M. (2006). ACE polymorphisms. *Circulation Research*, 98(9), 1123–1133.
207. Schnermann, J., & Briggs, J. P. (1999). The macula densa is worth its salt. *Journal of Clinical Investigation*, 104(8), 1007–1009.
208. Scott, R. A., Irving, R., Irwin, L., Morrison, E., Charlton, V., Austin, K., Tladi, D., Deason, M., Headley, S. A., Kolkhorst, F. W., Yang, N., North, K., & Pitsiladis, Y. P. (2010). ACTN3 and ACE genotypes in elite Jamaican and US sprinters. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 42(1), 107–112.
209. Scott, R. A., Moran, C., Wilson, R. H., Onywera, V., Boit, M. K., Goodwin, W. H., Gohlke, P., Payne, J., Montgomery, H., & Pitsiladis, Y. P. (2005). No association between Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene variation and endurance athlete status in Kenyans. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 141(2), 169–175.
210. Seto, J. T., Lek, M., Quinlan, K. G. R., Houweling, P. J., Zheng, X. F., Garton, F., MacArthur, D. G., Raftery, J. M., Garvey, S. M., Hauser, M. A., Yang, N., Head, S. I., & North, K. N. (2011). Deficiency of α -actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. *Human Molecular Genetics*, 20(15), 2914–2927.
211. Shahmoradi, S., Salehi, M., & Ahmadelipour, A. (2014). Evaluation of ACE gene I/D polymorphism in Iranian elite athletes. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 207.
212. Shang, X., Li, Z., Cao, X., Xie, C., Gu, M., Chen, P., Yang, X., & Cai, J. (2015). The association between the ACTN3 R577X polymorphism and noncontact acute ankle sprains. *Journal of Sports Sciences*, 33(17), 1775–1779.
213. Sharples, A. P., Stewart, C. E., & Seaborne, R. A. (2016). Does skeletal muscle have an ‘epi’-memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise. *Aging Cell*, 15(4), 603–616.
214. Shield, A. J., & Bourne, M. N. (2018). Hamstring Injury Prevention Practices in

Elite Sport: Evidence for Eccentric Strength vs. Lumbo-Pelvic Training. *Sports Medicine*, 48(3), 513–524.

215. Silva, M. S. M., Bolani, W., Alves, C. R., Biagi, D. G., Lemos, J. R., Da Silva, J. L., De Oliveira, P. A., Alves, G. B., De Oliveira, E. M., Negrão, C. E., Krieger, J. E., Dias, R. G., & Pereira, A. C. (2015). Elimination of Influences of the ACTN3 R577X Variant on Oxygen Uptake by endurance training in healthy individuals. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 10(5), 636–641.

216. Sitkowski, P. D., Sozański, H., & Alos, C. (2011). Identyfikacja talentów. *Forum Trenera*, 2(9), 18-47.

217. Skotarczak, B., & Adamska, M. A. (2006). *Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.

218. Sleegers, K., Den Heijer, T., Van Dijk, E. J., Hofman, A., Bertoli-Avella, A. M., Koudstaal, P. J., Breteler, M. M. B., & Van Duijn, C. M. (2005). ACE gene is associated with Alzheimer's disease and atrophy of hippocampus and amygdala. *Neurobiology of Aging*, 26(8), 1153–1159.

219. Słomski, R. (2004). *Przykłady analiz DNA*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.

220. Sokołowska-Pituchowa, J., Krechowicki, A., & Sylwanowicz, W. (2008). *Anatomia człowieka : podręcznik dla studentów medycyny*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.

221. Sonna, L. A., Sharp, M. A., Knapik, J. J., Cullivan, M., Angel, K. C., Patton, J. F., & Lilly, C. M. (2001). Angiotensin-converting enzyme genotype and physical performance during US Army basic training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(3), 1355–1363.

222. Sozański, H., Gajewski, A., Kielak, D., Kosmol, A., Kuder, A., Perkowski, K., Poliszczuk, D., & Śledziwski, D. (1999). *Podstawy teorii treningu sportowego*. Warszawa: Centralny Ośrodek Sportu.

223. Sozański, H., & Zaporozhanow, W. (1993). *Kierowanie jako czynnik optymalizacji treningu*. Resortowe Centrum Medyczno-Szkoleniowe Kultury Fizycznej i Sportu.

224. Spólnicka, M., Pośpiech, E., Adamczyk, J. G., Freire-Aradas, A., Pepłońska, B., Zbieć-Piekarska, R., Makowska, Z., Pieta, A., Lareu, M. V., Phillips, C., Płoski, R., Zekanowski, C., & Branicki, W. (2018). Modified aging of elite athletes revealed by analysis of epigenetic age markers. *Aging*, 10(2), 241–252.
225. Spurway, N., Wackerhage, H. (2006). *Genetics and Molecular Biology of Muscle Adaptation*. Churchill Livingstone.
226. Tang, R., Noh, H. J., Wang, D., Sigurdsson, S., Swofford, R., Perloski, M., Duxbury, M., Patterson, E. E., Albright, J., Castelhana, M., Auton, A., Boyko, A. R., Feng, G., Lindblad-Toh, K., & Karlsson, E. K. (2014). Candidate genes and functional noncoding variants identified in a canine model of obsessive-compulsive disorder. *Genome Biology*, 15(3).
227. Taniwaki, H., Ishimura, E., Matsumoto, N., Emoto, M., Inaba, M., & Nishizawa, Y. (2001). Relations between *ACE* gene and *ecNOS* gene polymorphisms and resistive index in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care*, 24(9), 1653–1660.
228. Tanriverdi, H., Evrengul, H., Tanriverdi, S., Turgut, S., Akdağ, B., Kaftan, H. A., & Semiz, E. (2005). Improved endothelium dependent vasodilation in endurance athletes and its relation with *ACE* I/D polymorphism. *Circulation Journal*, 69(9), 1105–1110.
229. Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., & Turner, A. J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33238–33243.
230. Tsianos, G., Sanders, J., Dhamrait, S., Humphries, S., Grant, S., & Montgomery, H. (2004). The *ACE* gene insertion/deletion polymorphism and elite endurance swimming. *European Journal of Applied Physiology*, 92(3), 360–362.
231. Venckunas, T., Skurvydas, A., Brazaitis, M., Kamandulis, S., Snieckus, A., & Moran, C. N. (2012). Human alpha-actinin-3 genotype association with exercise-induced muscle damage and the repeated-bout effect. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 37(6), 1038–1046.
232. Venkata, R. K. (2019). Possibilities of gene assisted regulations in elite athlete's

landscape of injury prevention and performances. *MOJ Sports Medicine*, 3(1), 6–8.

233. Vincent, B., De Bock, K., Ramaekers, M., Van Den Eede, E., Van Leemputte, M., Hespel, P., & Thomis, M. A. (2007). *ACTN3* (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiological Genomics*, 32(1), 58–63.

234. Vincent, B., Windelinckx, A., Nielens, H., Ramaekers, M., Van Leemputte, M., Hespel, P., & Thomis, M. A. (2010). Protective role of α -actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. *Journal of Applied Physiology*, 109(2), 564–573.

235. Vlahovich, N., Fricker, P. A., Brown, M. A., & Hughes, D. (2017a). Ethics of genetic testing and research in sport: A position statement from the Australian Institute of Sport. *British Journal of Sports Medicine*, 51(1), 5–11.

236. Vlahovich, N., Hughes, D. C., Griffiths, L. R., Wang, G., Pitsiladis, Y. P., Pigozzi, F., Bachl, N., & Eynon, N. (2017b). Genetic testing for exercise prescription and injury prevention: AIS-Athlome consortium-FIMS joint statement. *BMC Genomics*, 18(Suppl 8), 5–13.

237. Wackerhage, H., Miah, A., Harris, R. C., Montgomery, H. E., & Williams, A. G. (2009). Genetic research and testing in sport and exercise science: A review of the issues. *Journal of Sports Sciences*, 27(11), 1109–1116.

238. Wang, G., Mikami, E., Chiu, L. L., De Perini, A., Deason, M., Fuku, N., Miyachi, M., Kaneoka, K., Murakami, H., Tanaka, M., Hsieh, L. L., Hsieh, S. S., Caporossi, D., Pigozzi, F., Hilley, A., Lee, R., Galloway, S. D. R., Gulbin, J., Rogozkin, V. A., ... Pitsiladis, Y. P. (2013). Association analysis of *ACE* and *ACTN3* in Elite Caucasian and East Asian Swimmers. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 45(5), 892–900.

239. Wang, G., Tanaka, M., Eynon, N., North, K. N., Williams, A. G., Collins, M., Moran, C. N., Britton, S. L., Fuku, N., Ashley, E. A., Klissouras, V., Lucia, A., Ahmetov, I. I., De Geus, E., Alsayrafi, M., & Pitsiladis, Y. P. (2016). The Future of Genomic Research in Athletic Performance and Adaptation to Training. *Medicine and Sport Science*, 61, 55–67.

240. Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Developmental*

Cell, 15(2), 261–271.

241. Webborn, N., Williams, A., McNamee, M., Bouchard, C., Pitsiladis, Y., Ahmetov, I., Ashley, E., Byrne, N., Camporesi, S., Collins, M., Dijkstra, P., Eynon, N., Fuku, N., Garton, F. C., Hoppe, N., Holm, S., Kaye, J., Klissouras, V., Lucia, A., ... Wang, G. (2015). Direct-to-consumer genetic testing for predicting sports performance and talent identification: Consensus statement. *British Journal of Sports Medicine*, 49(23), 1486–1491.

242. Wilber, R. L., & Pitsiladis, Y. P. (2012). Kenyan and Ethiopian distance runners: What makes them so good? *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 7(2), 92–102.

243. Williams, A. G., Wackerhage, H., Miah, A., Harris, R. C., & Montgomery, H. E. (2007). Genetic Research and Testing in Sport and Exercise Science. Position Stand. *British Association of Sport and Exercise Sciences*.

244. Williams, A. G., Rayson, M. P., Jubb, M., World, M., Woods, D. R., Hayward, M., Martin, J., Humphries, S. E., & Montgomery, H. E. (2000). The *ACE* gene and muscle performance. *Nature*, 403(6770), 614.

245. Williams, A. G., Wackerhage, H., & Day, S. H. (2016). Genetic Testing for Sports Performance, Responses to Training and Injury Risk: Practical and Ethical Considerations. *Medicine and Sport Science*, 61, 105–119.

246. Williams, J. F. (1989). Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 7(7), 762–769.

247. Woods, D., Hickman, M., Jamshidi, Y., Brull, D., Vassiliou, V., Jones, A., Humphries, S., & Montgomery, H. (2001). Elite swimmers and the D allele of the *ACE* I/D polymorphism. *Human Genetics*, 108(3), 230–232.

248. Yang, N., Garton, F., & North, K. (2009). *α -Actinin-3 and Performance*. 54, 88–101.

249. Yang, N., MacArthur, D. G., Gulbin, J. P., Hahn, A. G., Beggs, A. H., Easteal, S., & North, K. (2003). *ACTN3* genotype is associated with human elite athletic performance. *American Journal of Human Genetics*, 73(3), 627–631.

250. Yang, N., Macarthur, D. G., Wolde, B., Onywera, V. O., Boit, M. K., Lau, S. Y. M. A., Wilson, R. H., Scott, R. A., Pitsiladis, Y. P., & North, K. (2007). The ACTN3 R577X polymorphism in east and west African athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(11), 1985–1988.
251. Zając, A., Chmura, J. (2016). *Współczesny system szkolenia w zespołowych grach sportowych*. Wydawnictwo Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki.
252. Zatoń, M., Jastrzębska, A. D., & Albiński, P. (2010). *Testy fizjologiczne w ocenie wydolności fizycznej*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
253. Zhang, B., Tanaka, H., Shono, N., Miura, S., Kiyonaga, A., Shindo, M., & Saku, K. (2003). The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow-twitch type I fibers in human skeletal muscle. *Clinical Genetics*, 63(2), 139–144.
254. Zhang, X., Wang, C., Dai, H., Lin, Y., & Zhang, J. (2008). Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and exercise performance in patients with COPD. *Respirology*, 13(5), 683–688.

Streszczenie

We współczesnej rywalizacji do uprawiania sportu na najwyższym światowym poziomie dochodzą jednostki najbardziej ku temu predysponowane. Ich wyselekcjonowanie z populacji jest możliwe w szczególności dzięki opracowaniu wszelkiego rodzaju testów diagnostycznych. Dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej sprawił, że na rynku zaczęły pojawiać się komercyjne testy genetyczne mające wykrywać talent sportowy. W skład większości dostępnych testów genetycznych wchodzi zwykle dwa markery: polimorfizm insercyjno-delecyjny I/D (rs4646994) w genie *ACE* oraz polimorfizm pojedynczego nukleotydu typu SNP R577X (rs1815739) genu *ACTN3*. Niniejsza praca jest próbą odpowiedzenia na pytanie, czy test genetyczny oparty na dwóch najczęściej badanych polimorfizmach genetycznych w genach *ACE* oraz *ACTN3*, jest bezpieczny i rzetelny oraz czy taki test może znaleźć zastosowanie w badaniach polskich sportowców.

Celami poznawczymi przeprowadzonych badań było:

1. Określenie korelacji pomiędzy częstością występowania genotypów i alleli opisywanych w wybranych punktach polimorficznych I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3* a statusem sportowym polskich zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym oraz zawodników realizujących wysiłki szybkościowo-siłowe.
2. Określenie korelacji pomiędzy częstością występowania określonych kombinacji genotypów I/D *ACE* oraz R577X *ACTN3* a statusem sportowym polskich zawodników realizujących wysiłki startowe o charakterze wytrzymałościowym oraz zawodników realizujących wysiłki szybkościowo-siłowe.

Postawionym celem aplikacyjnym było:

3. Zastosowanie danych genetycznych uzyskanych na podstawie badań miejsc polimorficznych I/D genu *ACE* oraz R577X genu *ACTN3* przeprowadzonych u polskich sportowców do konstrukcji testów diagnostycznych mogących mieć zastosowanie w procesie doboru do sportu.

Badaniami objętych zostało łącznie 359 sportowców reprezentujących trzy dyscypliny sportowe, tj. kolarstwo, pływanie oraz podnoszenie ciężarów. Rekrutowani do badań zawodnicy to uczestnicy Mistrzostw Polski w kategoriach juniorskich lub seniorskich z minimum pięcioletnim stażem zawodniczym. Grupę kontrolną stanowiło 281 zdrowych ochotników, którzy nigdy nie uprawiali wyczynowo żadnej

dyscypliny sportowej i byli rekrutowani spośród studentów różnych wydziałów Uniwersytetu Szczecińskiego. Detekcja ustalonych polimorfizmów w badanych genach markerowych przeprowadzona została za pomocą reakcji PCR w przypadku polimorfizmu I/D genu *ACE* oraz Real-Time PCR dla polimorfizmu R577X genu *ACTN3*.

W toku przeprowadzonych analiz stwierdzono istotne statystycznie różnice w rozkładzie genotypów i na tej podstawie udało się wyciągnąć następujące wnioski. W grupie pływaków długodystansowych zanotowano zwiększoną częstość występowania genotypu II oraz allelu I genu *ACE* w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast wśród kolarzy długodystansowych to genotyp DD oraz allel D występował częściej w porównaniu do grupy kontrolnej. Pozwala to stwierdzić, że otrzymane wyniki są tylko w połowie zgodne z wcześniej postawioną hipotezą. Zwiększona częstość występowania genotypu XX opisywanego dla genu *ACTN3* w grupie długodystansowych sportowców w porównaniu do grupy kontrolnej potwierdza wcześniej postawioną hipotezę. W grupie sportowców szybkościowo-siłowych jedynie rozkład genotypów w grupie krótkodystansowych kolarzy w porównaniu do grupy kontrolnej okazał się statystycznie istotny. W związku z tym należy stwierdzić, że na podstawie otrzymanych danych nie można jednoznacznie potwierdzić postawionej wcześniej hipotezy, jakoby genotyp DD genu *ACE* występował w sposób statystycznie istotny częściej wśród sportowców realizujących wysiłki startowe o charakterze szybkościowo-siłowym w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie sportowców szybkościowo-siłowych, należących do trzech dyscyplin zaznaczyło się istotne statystycznie częstsze występowanie allelu R w porównaniu do grupy kontrolnej. Efekt częstszego występowania genotypu RR w porównaniu do kontroli dał się zauważyć w grupie krótkodystansowych pływaków. Biorąc pod uwagę kombinacje genotypów genów *ACE* oraz *ACTN3* należy stwierdzić, iż posiadacze układu II:XX mają 6,5 razy większą szansę dla na bycie sportowcem długodystansowym niż nosiciele innych układów genotypowych. Ponad trzy razy większą szansę na bycie sportowcem długodystansowym wykazują również posiadacze układu genotypowego DD:XX. Co warto zaznaczyć - o ponad 5,5 razy mniejszą szansę na bycie sportowcem długodystansowym mają posiadacze genotypu ID:RR. W grupie ciężarowców szansa na wystąpienie układu genotypów DD:RX jest ponad pięć razy mniejsza w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie pływaków krótkodystansowych model recesywny pozwolił na wykazanie, że posiadacze kombinacji genotypowych II:RX oraz ID:RX

charakteryzują się odpowiednio ponad 4 i ponad 3,5 razy większym prawdopodobieństwem zostania pływakiem-sprinterem w porównaniu do grupy kontrolnej.

Otrzymane wyniki nie pozwalają jednoznacznie orzec o przydatności wykorzystania testów opartych na polimorfizmie I/D *ACE* oraz R577X *ACTN3* do poszukiwania talentów sportowych. Tym niemniej, badania tych markerów mogą mieć istotne zastosowanie praktyczne: tego typu analizy z pewnością będą przydatne w celu przygotowania programów prewencyjnych czy indywidualizacji treningu. Jednakże wykorzystywanie testu genetycznego opartego jedynie o dwa analizowane markery do kategoriernego orzekania o talencie sportowym jawi się na obecnym poziomie wiedzy jako nierzetelne i nieetyczne.

Streszczenie w języku angielskim

In modern international competition, only the individuals most predisposed can achieve the highest level. Their selection from the population is possible thanks to the significant development of science. In particular owing to the development of various diagnostic tests. The dynamic development of molecular biology techniques has caused that commercial genetic tests appeared on the market. Genetic test which can detect sport's talent are still popular. Most genetic tests available on the Internet usually have two markers: I/D insertion-deletion polymorphism (rs4646994) in the *ACE* gene and single nucleotide polymorphism R577X (rs1815739) of the *ACTN3* gene. This dissertation is an attempt to answer the question "Whether the genetic test based on the two most-studied genetic polymorphisms in the *ACE* and *ACTN3* genes is safe and reliable, and whether such a test can be used in the research of Polish athletes?"

The cognitive objectives of the research are:

1. Determining the correlation between the frequency of occurrence of genotypes and alleles described at selected polymorphic points of the I/D *ACE* gene and R577X of the *ACTN3* gene, and the sport status of Polish athletes performing endurance efforts and athletes performing power efforts.
2. Determining the correlation between the frequency of occurrence of specific combinations of *ACE* I/D genotypes and R577X *ACTN3* and the sport status of Polish athletes performing endurance efforts and athletes performing power efforts.

The application goal is:

3. The use of genetic data based on the polymorphic sites of the I/D *ACE* gene and R577X of the *ACTN3* gene carried out in Polish athletes for the construction of diagnostic tests that may be used in the selection process for sport.

Research covered a limited number of 359 athletes representing three sports: cycling, swimming and weightlifting. Athletes recruited to research was participants of the Polish Championships in junior or senior category with a minimum five years of training experience. The control group consisted of 281 healthy volunteers, who were never practiced competitive sport and were recruited from students of various faculties of the University of Szczecin.

Detection of mentioned polymorphisms in the studied marker genes was carried out by PCR for the I/D *ACE* polymorphism and Real-Time PCR for the R577X polymorphism of the *ACTN3* gene.

In the course of conducted analyzes, statistically significant differences in the distribution of genotypes were found and on this basis the following conclusions were drawn. In the group of long distance swimmers, an increased frequency of genotype II and allele I of the *ACE* gene was noted compared to the control group. However, among long-distance cyclists it was the DD genotype and the D allele that was more frequent compared to the control group. The results obtained are only half compatible with the previously made hypothesis. The increased frequency of genotype XX *ACTN3* gene in the group of long-distance athletes compared to the control group confirms the previously made hypothesis. In the group of power athletes, only the distribution of genotypes in the group of short-distance cyclists compared to the control group turned out to be statistically significant. Basing on the data obtained, it cannot be unequivocally confirmed the hypothesis that the DD *ACE* genotype occurs statistically significantly more often among power athletes compared to the control group. In the group of power athletes practiced all three disciplines compared to the control group, a statistically significant more frequent occurrence was noted for the R allele. More frequent occurrence of the RR genotype compared to the control was seen in the group of short-distance swimmers. Considering the combinations of *ACE* and *ACTN3* genotypes, it should be taken into account that owners of the II:XX genotype have 6.5 times bigger possibility to succeed in long distance event than carriers of other genotype combinations. Over three times greater chance to succeed in long distance event also owns holders of the DD:XX pattern. Worth pointing out, ID:RR genotype holders have more than 5.5 times less chance of being a long distance athlete. In the weightlifting group, the chance to appear the DD:RX genotype is more than five times limited comparing to the control group. In the group of short-distance swimmers, the recessive model shows that holders of genotypes II:RX and ID:RX are respectively over 4 and more than 3.5 times more likely to become a sprinter comparing to the control group.

The obtained results do not allow to predicate about the usefulness of tests based on the *ACE* I/D and R577X *ACTN3* polymorphisms to search for sports talents. Nevertheless, testing of these markers can have important practical applications: this type of analysis will certainly be useful in the preparation of injury prevention programs

or individualisation of training programs. However, using a genetic test based only on the two analyzed markers to positively determine sporting talent appears to be unreliable and unethical at the current level of knowledge.

Spis rysunków

Rysunek 1. Siedem prób testu FMS (źródło: Mayer i wsp., 2015, zmodyfikowano)	11
Rysunek 2. Lokalizacja genu <i>ACE</i> na chromosomie 17 (locus w pozycji 17q23.2) (źródło: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ACE#location)	28
Rysunek 3. Gen <i>ACE</i> . Polimorfizm insercyjno-delecyjny (I/D) w intronie 16 (źródło: Bell i wsp., 2007)	29
Rysunek 4. Model molekularny angiotensyny II (źródło: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ed/Angiotensins_I_and_II_comparison.png , zmodyfikowano)	31
Rysunek 5. Rola enzymu ACE w układzie Renina-Angiotensyna (źródło: Mayne, 2006, zmodyfikowano)	33
Rysunek 6. Lokalizacja genu <i>ACTN3</i> na chromosomie 11 (locus w pozycji 11q13.2) (źródło: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ACTN3)	39
Rysunek 7. Chromosom 11 oraz polimorfizm genu <i>ACTN3</i> typu SNP R577X w egzonie 16 (źródło: Mayne, 2006)	40
Rysunek 8. Lokalizacja i struktura sarkomerowej α -aktyniny (źródło: MacArthur i North, 2004, zmodyfikowano)	42
Rysunek 9. Rola genu <i>ACTN3</i> w mięśniach szkieletowych (źródło: Mayne, 2006, zmodyfikowano)	44
Rysunek 10. Etapy izolacji DNA z zastosowaniem Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (źródło: www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/genelute-mammalian-genomic-dna-miniprep-kit.html , zmodyfikowano)	57
Rysunek 11. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR oraz uproszczony schemat przebiegu (źródło: www.primogenomic.com/nucleic_acid_test.html , zmodyfikowano)	61
Rysunek 12. Schemat przebiegu reakcji PCR (By Enzoklop - Ownwork, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32003643 , zmodyfikowano)	62
Rysunek 13. Schemat reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Metoda hydrolityczna z sondą podwójnie znakowaną (TaqMan). Na obrazku R oznacza reporter , Q oznacza wygaszac. (źródło: http://www.e-biotechnologia.pl/obrazki/sondy_taqman_real_time_pcr.jpg , zmodyfikowano)	65
Rysunek 14. Przykładowy wynik genotypowania przeprowadzony w punkcie polimorficznym rs1815739 w genie <i>ACTN3</i> . Od lewej: krzywa fluorescencji obserwowana dla próby o genotypie homozygoty typu RR (sygnał na kanale żółtym), krzywa fluorescencji obserwowana dla próby o genotypie homozygoty typu XX (sygnał na kanale zielonym), krzywa fluorescencji obserwowana dla próby o genotypie heterozygoty RX (sygnał na kanale zielonym i żółtym). .	70

Spis zdjęć

Zdjęcie 1. Test Y-balance (źródło: Mayer i wsp., 2015).....	12
Zdjęcie 2. Trzy próby testu MCS (źródło: Bibrowicz i wsp., 2015).....	12
Zdjęcie 3. Zdjęcie żelu agarozowego po wykonaniu elektroforezy. Jeden produkt o długości 490 pz – genotyp II, jeden produkt o długości 190 pz – genotyp DD, dwa produkty (490 pz oraz 190 pz) – genotyp ID.	68

Spis tabel

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej dla genu <i>ACE</i> (w przeliczeniu na jedną próbę)	67
Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej na genu <i>ACTN3</i> (w przeliczeniu na jedną próbę)	69
Tabela 3. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów <i>ACE</i> u sportowców i w grupie kontrolnej	73
Tabela 4. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów <i>ACTN3</i> u sportowców i w grupie kontrolnej	74
Tabela 5. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów <i>ACE</i> u sportowców i w grupie kontrolnej z uwzględnieniem dyscyplin sportowych	76
Tabela 6. Częstości genotypów i alleli polimorfizmów <i>ACTN3</i> u sportowców i w grupie kontrolnej z uwzględnieniem dyscyplin sportowych.....	77
Tabela 7. Interakcja pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i>	80
Tabela 8. Interakcja pomiędzy <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> z uwzględnieniem poszczególnych dyscyplin....	84

Spis wykresów

Wykres 1. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LD w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego.....	79
Wykres 2. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LD w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego.....	81
Wykres 3. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LD w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego.....	81
Wykres 4. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego	82
Wykres 5. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego	82
Wykres 6. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego.....	83

Wykres 7. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LDC w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego.....	83
Wykres 8. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LDC w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego.....	85
Wykres 9. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy SD+LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego.....	85
Wykres 10. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego.....	86
Wykres 11. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego.....	86
Wykres 12. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy LIFT w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego.....	86
Wykres 13. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy SDS w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu kodominującego.....	87
Wykres 14. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy SDS w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu dominującego.....	87
Wykres 15. Analiza interakcji pomiędzy genotypami <i>ACE</i> i <i>ACTN3</i> u sportowców z grupy SDS w porównaniu do grupy kontrolnej przy zastosowaniu modelu recesywnego.....	87