

OSNOVNA ŠOLA DOB
ŠOLSKA ULICA 7, 1233 DOB

RAZISKOVALNA NALOGA
NOGOMETAŠICA, KAKŠEN JE PA TVOJ GEN ZA HITROST?

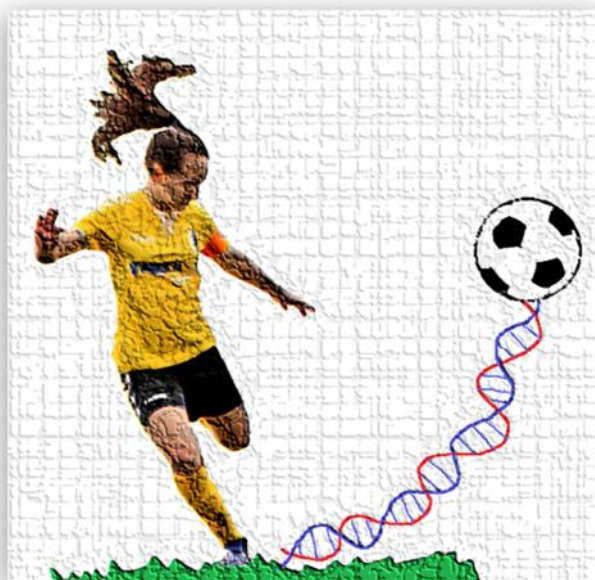
Tematsko področje: BIOLOGIJA

Avtorica: Tisa Podkrajšek, 9. razred

Mentorici:

Sonja Najman Vedenik

doc. dr. Katja Goričar



Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

Dob, 2021

Raziskovalna naloga je bila opravljena v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo
Inštituta za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete v Ljubljani.

Mentorici: Sonja Najman Vedenik

doc. dr. Katja Goričar

Datum predstavitve:

KAZALO VSEBINE

1. POVZETEK	8
2. ABSTRACT	9
3. UVOD	10
4. PREGLED OBJAV	12
4.1 ŠPORTNA GENETIKA	12
4.2 GEN <i>ACTN3</i>	12
4.3 GENETSKA SPREMEMBA p.R577X PRI NOGOMETAŠIH	13
5. MATERIALI IN METODE	14
5.1 ZBIRANJE VZORCEV	14
5.2 IZOLACIJA DNA	16
5.3 MERJENJE KONCENTRACIJA DNA	17
5.4 POMNOŽEVANJE DELA GENA ZA AKTIN 3 Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)	17
5.5 RESTRIKCIJA	18
5.6 AGAROSNA ELEKTROFOREZA	19
6. REZULTATI	20
6.1 ZNAČILNOSTI VKLJUČENE SKUPINE NOGOMETAŠIC	20
6.2 KONCENTRACIJA DNA	22
6.3 DOLOČANJE SPREMEMBE p.R577X GENA <i>ACTN3</i>	22
6.4 PRISOTNOST SPREMEMBE p.R577X gena <i>ACTN3</i>	25
6.5 POGOSTOST POŠKODB PRI NOGOMETAŠICAH Z RAZLIČNIM GENOTIPI	26
6.6 PRISOTNOST SPREMEMBE p.R577X GENA <i>ACTN3</i> GLEDE NA IGRALNI POLOŽAJ	27
7. DISKUSIJA	28
7.1 PRIMERJAVA GENOTIPOV SLOVENSКИH NOGOMETAŠIC S PODATKI ZA SLOŠNO EVROPSKO POPULACIJO	29
7.2 PRIMERJAVA GENOTIPOV SLOVENSКИH NOGOMETAŠIC Z GENOTIPI NOGOMETAŠEV IZ DRUGIH POPULACIJ	30
7.3 PRISOTNOST GENETSKE SPREMEMBE p.R557X PRI POSAMEZNIH SELEKCIJAH SLOVENSКИH NOGOMETAŠIC	32
7.4 POGOSTOST POŠKODB PRI NOGOMETAŠICAH Z RAZLIČNIM GENOTIPI	32
7.5 PRISOTNOST GENOTIPA p.R577X GENA <i>ACTN3</i> GLEDE NA IGRALNI POLOŽAJ	32
8. ZAKLJUČEK	34

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

9. ZAHVALA.....	35
10. SEZNAM LITERATURE	36
11. PRILOGE.....	38

Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

KAZALO SLIK

Slika 1: Pomen označevanja genotipov spremembe p.R577X	13
Slika 2: Postopek določanja prisotnosti spremembe p.R577X	14
Slika 3: Dodajanje reagenta DNA/RNA Shield k vzorcu zbrane sline v Športnem parku Radomlje	15
Slika 4: Centrifugiranje med izolacijo DNA iz vzorcev sline v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani	16
Slika 5: Shema restrikcije z encimom <i>DdeI</i> odseka gena <i>ACTN3</i> za določanje prisotnosti spremembe p.R577X	18
Slika 6: Agarozna elektroforeza	19
Slika 7: Preverjanje uspešnosti PCR reakcije z agarozno elektroforezo	23
Slika 8: Restrikcijska analiza spremembe p.R577X gena <i>ACTN3</i> vzorcev 1 do 10	23
Slika 9: Restrikcijska analiza spremembe p.R577X gena <i>ACTN3</i> vzorcev 11 do 19	24
Slika 10: Restrikcijska analiza spremembe p.R577X gena <i>ACTN3</i> vzorcev 20 do 28	24
Slika 11: Restrikcijska analiza spremembe p.R577X gena <i>ACTN3</i> vzorcev 29 do 39	24
Slika 12: Restrikcijska analiza spremembe a p.R577X gena <i>ACTN3</i> vzorcev 40 do 43	25

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prisotnost spremembe p.R577X gena <i>ACTN3</i> pri nogometašicah, ki so bile vključene v raziskavo	25
Graf 2: Pogostost poškodb pri nogometašicah z različnim genotipom	26
Graf 3: Genotip vključenih nogometašic glede na njihov igralni položaj	27
Graf 4: Primerjava porazdelitve genotipov slovenskih nogometašic s podatki splošne evropske populacije zbirke GnomAD in srbskimi nogometašicami	29
Graf 5: Primerjava genotipa spremembe p.R577X gena <i>ACTN3</i> slovenskih nogometašic z genotipom brazilskih profesionalnih nogometašev glede na starost	30

KAZALO TABEL

Tabela 1: Reakcija za pomnoževanje dela gena <i>ACTN3</i> s PCR.....	17
Tabela 2: Program za pomnoževanje gena <i>ACTN3</i>	17
Tabela 3: Podatki o sodelujočih nogometašicah v raziskavi	21
Tabela 4: Rezultati merjenja koncentracije DNA	22
Tabela 5: Anketa za raziskavo "Gen za hitrost pri slovenskih nogometašicah"	38

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

SEZNAM OKRAJŠAV

ACTN3	protein alfa-aktin 3
<i>ACTN3</i>	gen za protein alfa-aktin 3
bp	bazni par
°C	stopinja Celzija
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
min	minuta
ml	mililiter
ng	nanogram
OŠ	Osnovna šola
μl	mikroliter
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
R	aminokislina arginin
RR	sprememba p.R577X ni prisotna
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RX	sprememba p.R577X prisotna na enem alelu, na drugem je zaporedje normalno
p.R577X	sprememba v genu <i>ACTN3</i> , ki povzroči zamenjavo aminokislina arginin (R), v terminacijski kodon (X)
s	sekunda
UV	ultravijolično
U14	ekipa nogometašev/ic mlajših od 14 let
u15	ekipa nogometašev/ic mlajših od 15 let
u17	ekipa nogometašev/ic mlajših od 17 let
U20	Ekipa nogometašev/ic mlajših od 20 let
ŽNK	Ženski nogometni klub
XX	sprememba p.R577X prisotna na obeh alelih

1. POVZETEK

Gen *ACTN3* je eden najbolj raziskanih genov, povezanih s športno vzdržljivostjo. Sprememba p.R577X v tem genu vpliva na lastnosti mišičnih vlaken in s tem na vzdržljivost, moč in hitrost športnika. Ker so za uspeh nogometiša pomembni vsi ti dejavniki, sem v nalogi preverjala prisotnost te spremembe pri slovenskih nogometišicah. Zato sem v Športnem parku Radomlje zbrala vzorce sline ter na Medicinski fakulteti v Ljubljani iz njih izolirala DNA. Genotip posamezne nogometišice sem določila z restrikcijo.

V raziskavi je sodelovalo 43 nogometišic selekcij u15, u17 in članskih selekcij. Genotip RR je bil prisoten pri 41,9%, genotip XR pri 32,6% in genotip XX pri 25,6% nogometišic. Poškodbe so bile bolj pogoste pri nogometišicah z genotipom XX. Pri osrednjih branilkah in veznih igralkah je v primerjavi z bočnimi branilkami, krilnimi in osrednjimi napadalkami prisotnost spremembe višja. Rezultati so delno primerljivi z rezultati drugih nogometišev, vendar je za natančnejšo primerjavo skupina slovenskih nogometišic premajhna.

Raziskovalna naloga je opredelila nekatere osnovne genetske značilnosti slovenskih nogometišic in je tako lahko osnova nadaljnjim obsežnejšim raziskavam. Za boljše razumevanje pomena genetskega ozadja pri nogometiših bi bilo potrebno analizirati tudi druge gene, povezane s športno vzdržljivostjo. Pomembno pa se je zavedati, da na uspeh nogometiša poleg genetskega ozadja vplivajo še številni drugi dejavniki.

Ključne besede: ženski nogomet, *ACTN3*, p.R577X, genetika v športu

2. ABSTRACT

ACTN3 gene is known to be associated with endurance in sports. Genetic variant p.R577X in *ACTN3* affects the properties of the muscle fibres and thus the endurance, strength, and speed of the athlete. A successful football player needs all of the above. Therefore, I analysed genetic variant p.R577X in Slovenian female football players. Saliva samples were collected at the Radomlje sports park. DNA was isolated from those samples at the Faculty of Medicine in Ljubljana and the genotype of the individual player was determined using *DdeI* restriction.

Forty-three female football players from football teams u15, u17, and adult teams were included in the study. The RR genotype was present in 41.9%, the XR genotype in 32.6%, and the XX genotype in 25.6% of the participants. Injuries were more common in female football players with XX genotype. In central defenders and midfielders, the presence of p.R577X was higher compared to full-backs, wingers, and strikers. The results are partly comparable with the reported results; nevertheless, the analysed group of players is too small for a more accurate comparison.

The study evaluated selected genetic characteristics of Slovenian female football players and the results can thus serve as a basis for more extensive studies. To better understand the importance of the genetic background in football, it would be necessary to analyse additional genes related to athletic endurance. Nevertheless, favourable genetic background is not sufficient for the success of an individual player since it can be influenced by numerous additional environmental factors.

Keywords: woman football, *ACTN3*, p.R577X, genetics in sport

3. UVOD

Nogomet treniram že od osmega leta. Od nekdanj me je zanimalo, zakaj smo soigralke iz moje ekipe različno uspešne pri nogometu, čeprav treniramo po enakem programu in smo enake starosti. Vedno so bile nekatere hitrejše, druge bolj vzdržljive...

Pri brskanju po spletu sem ugotovila, da k uspešnosti športnika pripomore veliko različnih dejavnikov. Najpomembnejša sta genetsko ozadje in okolje, v katerem se posameznik in njegove lastnosti razvijajo. Genetsko ozadje je tisto, ki predstavlja osnovo za posameznikovo lastnost, na primer uspešnost pri določenem športu. Znani so številni geni, ki so povezani z razvojem točno določene genetsko pogojene značilnosti, kot je barva oči, višina, barva las... Posamezniki se v genetskih značilnostih med sabo razlikujejo. Te razlike med posamezniki so genetske spremembe, ki vplivajo na genetsko pogojene lastnosti. Od različnih dejavnikov okolja (način in pogoji treninga, prehrana, spodbudno domače in športno okolje...) pa je odvisno, kako dobro bo posameznik, v tem primeru športnik, genetsko odvisne lastnosti razvijal [1].

Sestava mišičnih vlaken pomembno vpliva na mišično moč in vzdržljivost ter s tem na uspešnost pri določenem športu [2]. Eden najbolj raziskanih genov, povezanih s športno vzdržljivostjo, je gen *ACTN3*, ki ga imenujejo tudi gen za hitrost. Gen nosi informacijo za protein alfa-aktin 3 (*ACTN3*), ki je pomemben sestavni del hitrih mišičnih vlaken [3]. Prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* naj bi vplivala na vzdržljivost, moč in hitrost. Posameznik s prisotno spremembo naj bi bil bolj vzdržljiv, posameznik brez spremembe pa naj bi imel več mišične moči in bil bolj hiter [4]. Znano je, da imajo športniki, ki potrebujejo hitrost in moč (na primer tekači na kratke proge) v primerjavi s splošno populacijo pogosteje prisoten vsaj en normalen alel (genotipa RR in RX), genotip XX pa je pogosteje prisoten pri vzdržljivostnih športnikih [5]. Ta sprememba naj bi bila povezana tudi s pogostostjo poškodb mišic [6].

Nogomet je šport, kjer sta za uspeh športnika pomembna moč in hitrost ter prav tako vzdržljivost. Raziskave, ki so določale prisotnost te spremembe pri nogometiških, so pokazale zelo različne rezultate, raziskav pri nogometiških pa je trenutno zelo malo. V raziskovalni nalogi sem zato želela preveriti, kakšen je delež genetske spremembe p.R577X pri slovenskih nogometiških v primerjavi s splošno evropsko populacijo in drugimi nogometiški. Zanimalo me je tudi, če imajo nogometiške s to spremembo več poškodb. Ker nekateri nogometni igralni položaji zahtevajo več hitrega teka, drugi pa več vzdržljivostnega teka, sem preverjala tudi, če je prisotnost spremembe različna pri igralkah, ki igrajo na različnih igralnih položajih. V nalogo smo želeli vključiti okoli 100 slovenskih nogometiških, ki igrajo v ligah u15, u17 in članski ligi. V ekipi u15 sodelujejo nogometiške, rojene v letih 2007 in 2006, v ekipi u17 nogometiške, rojene v letih 2005 in 2004. Starejše nogometiške so del članske selekcije.

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

Pri raziskovalni nalogi sem preverjala naslednje hipoteze:

1. Pri slovenskih nogometašicah je prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* nižja kot pri splošni evropski populaciji.
2. Delež homozigotih nosilk spremembe (genotip XX) je v članski selekciji manjši kot pri mlajših selekcijah.
3. Nogometašice s prisotno spremembo (genotipa XR in XX) imajo v povprečju več poškodb kot nogometašice brez spremembe.
4. Med osrednjimi branilkami in veznimi igralkami je prisotnost spremembe (genotipa XR in XX) bolj pogosta kot pri bočnih branilkah in krilnih ter osrednjih napadalkah.

4. PREGLED OBJAV

4.1 ŠPORTNA GENETIKA

Genetsko testiranje omogoča določitev genetskih značilnosti posameznika. Namen genetskega testiranja je določiti prisotne genetske spremembe, ki lahko vplivajo na razvoj bolezni ali na razvoj posameznikovih lastnosti [7]. Na podlagi znanega genetskega ozadja posameznika se tako lahko delno napove njegove lastnosti, tudi na področju športa. Poteka veliko raziskav, ki raziskujejo to področje, saj je za takšno genetsko testiranje veliko povpraševanja. Želja veliko ambicioznih staršev je, da bi svojega otroka usmerili v šport oziroma športno panogo, ki bi mu genetsko najbolj ustrezala. Genetske teste želijo uporabljati tudi športni klubi z namenom iskanja talentov [8]. Zadnja leta je predvsem na tujem trgu dostopnih vedno več genetskih testov. Testi, namenjeni športnikom, se uporabljajo za določanje primernosti različnih vrst treningov za posameznika. Popularno je še posebej genetsko testiranje, ki omogoča napovedovanje dovzetnosti za poškodbe, predvsem poškodb mišic. Poškodbe so namreč pomemben del športa, nemalokrat tudi glavni vzrok za končanje kariere. Raziskujejo se tudi genetske značilnosti, ki bi lahko vplivale na potek regeneracije po športni aktivnosti ali poškodbi [9].

Pri genetskih testih, povezanih s športno vzdržljivostjo, sta največkrat analizirana gena *ACE* in *ACTN3*. Za ta gena je vpliv na športno uspešnost že dokazan. Genetski testi otrok z namenom iskanja talentov in individualizacijo treninga se zaradi premalo znanja na tem področju in etičnih pomislekov ne priporočajo [10].

4.2 GEN *ACTN3*

Eden najbolj raziskanih genov, povezanih s športno vzdržljivostjo, je gen *ACTN3*, ki ga imenujejo tudi gen za hitrost. Nosi informacijo za protein alfa-aktin 3 (*ACTN3*), ki je pomemben sestavni del hitrih mišičnih vlaken tipa II [3]. Pogosta sprememba v tem genu, prisotna pri več kot polovici evropske zdrave populacije (56,51%) [11], povzroči spremembo baze na nivoju deoksiribonukleinske kisline (DNA). Posledično se v proteinu *ACTN3* aminokislina arginin, ki jo označimo z R, spremeni v zaključni kodon, ki ga označimo z X. Polno ime te spremembe je NP_001095.2:p.Arg577Ter, v nalogi pa bom uporabljala pogosto uporabljeno poimenovanje p.R577X [12]. Ta sprememba privede do krajše dolžine proteina *ACTN3*, kar vodi v nižji delež hitrih mišičnih vlaken pri posamezniku [3]. S tem vpliva na hitrost in moč posameznika, ki sta pri športni aktivnosti zelo pomembni. Posamezniki brez spremembe imajo večjo mišično moč, posamezniki s spremembo pa večjo mišično vzdržljivost [4].

Kadar je pri posamezniku na obeh alelih (tistem, podedovanem po materi in tistem, podedovanem po očetu) prisotno normalno zaporedje, to označimo kot genotip RR. Kadar je na

Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

enem alelu prisotna sprememba p.R577X, na drugem pa ne, to imenujemo heterozigotno stanje in označimo kot genotip RX. Kadar pa ima posameznik na obeh alelih prisotno spremembo, je to homozigotno stanje, ki ga označimo kot genotip XX. Vse tri možnosti so prikazane na Sliki 1.

- a) **Normalno zaporedje na obeh alelih (RR):** v DNA zaporedju je prisotna baza C, v proteinu je prisotna aminokislina arginin (R).



- b) **Heterozigotno stanje (genetska sprememba prisotna na enem alelu, RX):** v DNA zaporedju je na enem alelu prisotna baza C, na drugem baza T. V proteinu je prisotna aminokislina arginin (R) ali zaključni kodon (X).



- c) **Homozigotno stanje (genetska sprememba prisotna na obeh alelih (XX):** v DNA zaporedju je prisotna baza T, v proteinu je prisoten zaključni kodon (X).



Slika 1: Pomen označevanja genotipov spremembe p.R577X

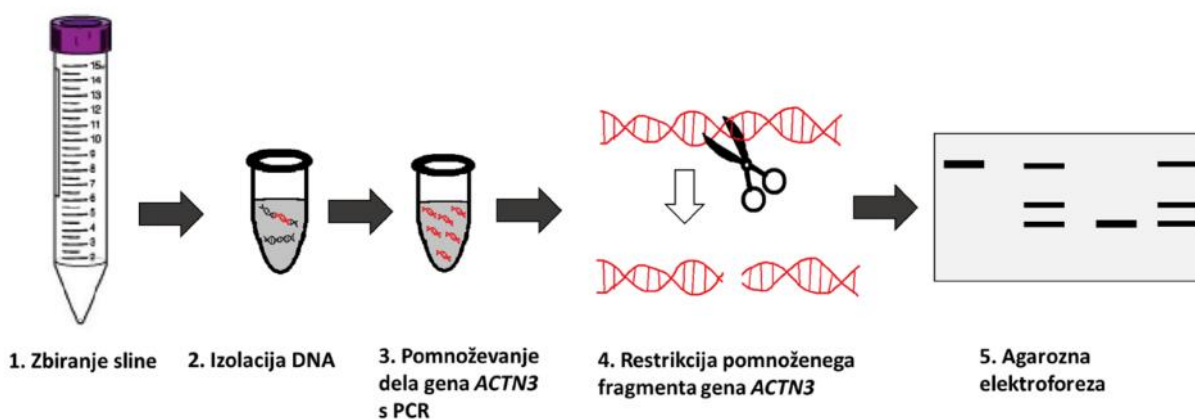
4.3 GENETSKA SPREMEMBA p.R577X PRI NOGOMETIŠIH

Raziskave so potrdile, da imajo športniki, ki potrebujejo več moči in hitrosti (npr. tekači na kratke proge) v primerjavi s splošno populacijo pogosteje prisoten alel R [5]. Genotip XX je pogosteje prisoten pri vzdržljivostnih športnikih [5,13]. Tudi pri brazilskih profesionalnih nogometiših so ugotovili, da je alel R povezan s hitrostjo nogometiša, alel X pa z vzdržljivostjo [14]. Pri avstralskih profesionalnih nogometiših je bil genotip XX redkeje prisoten kot pri zdravi populaciji [15]. Prisotnost alela X se je v članski selekciji v primerjavi z mlajšimi selekcijami zmanjševala [16]. Raziskave, v katerih so sodelovale nogometišice, so zelo redke. Majhna raziskava na 27 mladih srbskih nogometišicah je pokazala, da je pri njih najpogostejši genotip RX. Nogometišice, ki so imele vsaj en alel R, so imele boljše rezultate športnega testiranja (testiranje je vsebovalo na primer skok v daljino) [17]. Sprememba naj bi bila povezana tudi s pogostostjo in resnostjo poškodb profesionalnih nogometišev, to naj bi veljalo predvsem za genotip XX [6]. Razlikovala naj bi se tudi porazdelitev genotipov glede na igralni položaj [18].

5. MATERIALI IN METODE

Koraki, ki smo jih izvedli za namen raziskave, so prikazani na Sliki 2. Vzorce smo zbrali v Športnem parku Radomlje, eksperimentalni del pa je bil izveden v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo Inštituta za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete v Ljubljani pod nadzorom Inge Sotler, strokovne sodelavke laboratorija. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 0120-428/2020/6).

Pred začetkom laboratorijskega dela sem se najprej naučila osnovnih laboratorijskih tehnik in posameznih postopkov. To je zame predstavljalo kar velik izziv, saj sem večino laboratorijskih pripomočkov prvič uporabljala. S postopki sem se najprej natančno seznanila, šele nato sem pričela z delom. Pri postopku analize vzorcev smo najprej iz vzorcev sline izolirali DNA in pomnožili odsek gena *ACTN3*, kjer se nahaja sprememba p.R577X. Z restrikcijsko analizo in elektroforezo smo nato določili in prepoznali genotip posamezne nogometašice.



Slika 2: Postopek določanja prisotnosti genetske spremembe p.R577X

5.1 ZBIRANJE VZORCEV

Zbiranje vzorcev sline je potekalo v Športnem parku Radomlje pred ali po tekmah posameznih starostnih selekcij. K sodelovanju smo povabili nogometašice Ženskega nogometnega kluba (ŽNK) Radomlje, kjer treniram, pa tudi nogometašice ostalih slovenskih klubov, ki so v času zbiranja vzorcev, torej med septembrom in oktobrom 2020, gostovali na tekmah v Športnem parku Radomlje. Pri kontaktiranju trenerjev in staršev nogometašic drugih klubov so nam pomagali trenerji in funkcionarji ŽNK Radomlje. V raziskavi so sodelovale nogometašice, ki so starejše od 13 let, in nogomet aktivno trenirajo vsaj 4 leta. Nogometašice ali njihovi starši, v primeru

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

mladoletnosti, so podali tudi soglasje za vključitev v raziskavo in izpolnili anketo, ki je prikazana v prilogi (Tabela 5). Z njo smo pridobili osebne podatke, podatke o aktivnem treniranju nogometa in številu ter tipu športnih poškodb posameznice.

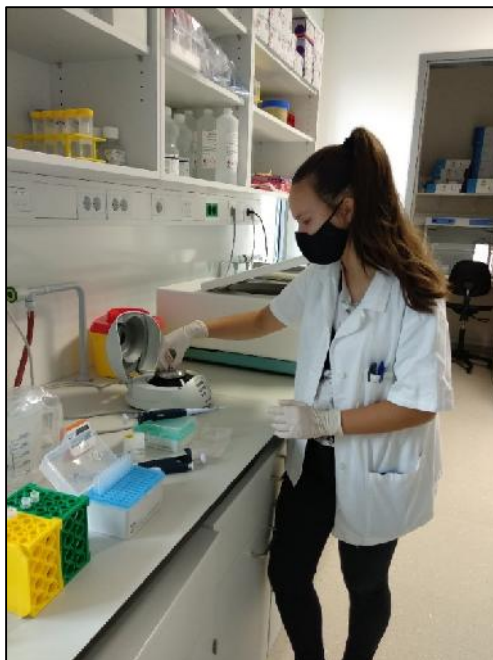
Nogometašice so v epruveto zbrale 1-2 ml sline, ki smo ji dodali enako količino reagenta za stabilizacijo DNA/RNA Shield (Zymoresearch) (Slika 3). Epruvete smo prej označili s številko in začetnima črkama imena ter priimka. Moj vzorec je bil na primer označen z 8TiPo. Vzorce smo med zbiranjem hranili v hladilni skrinji, potem pa v zamrzovalniku na temperaturi -80°C do nadaljnje uporabe.



Slika 3: Dodajanje reagenta DNA/RNA Shield k vzorcu zbrane sline v športnem parku Radomlje

5.2 IZOLACIJA DNA

Najprej smo na sobni temperaturi odtajali vzorce slin. Uporabili smo Quick DNA miniprep plus kit (Zymoresearch), ki je vseboval vse potrebne reagente za izolacijo DNA. V epruveto velikosti 1,5 ml smo s pipeto odpipetirali 400 μ l vzorca in 20 μ l proteinaze. Encim je v vzorcu razgradil proteine. Nastalo mešanico smo mešali 10-15 s in inkubirali na sobni temperaturi 20 min. Potem smo dodali enak volumen oz. 420 μ l pufru za vezavo genomske DNA in ponovno mešali 10-15s. Mešanico smo prenesli na kolono, ki smo jo postavili v zbirno epruveto. Kolono v epruveti smo centrifugirali 1 min na 13000 vrtljajih na minuto, po tem jo prestavili v novo epruveto, staro pa zavrgli. Dodali smo 400 μ l pufru za predsipiranje DNA, centrifugirali 1 min na 13000 vrtljajih na minuto, nato pa zavrgli tekočino v zbirni epruveti. Dodali smo še 700 μ l pufru za spiranje (g-DNA Wash Buffer), centrifugirali 1 min na 13000 vrtljajih na minuto in tekočino v epruveti ponovno zavrgli. Na kolono smo dodali 200 μ l istega pufru za spiranje, centrifugirali 1 min na 13000 vrtljajih na minuto in kolono prenesli v novo epruveto (1,5 ml), tubico pa skupaj s tekočino zavrgli. Na sredino kolone, ki izgleda kot neke vrste filter, smo nanесли 50 μ l pufru za izpiranje, inkubirali 3 min na sobni temperaturi ter centrifugirali 1 min na 14500 vrtljajih na minuto. Rastopino DNA smo prenesli iz epruvete nazaj na kolono, inkubirali (3 min na sobni temperaturi) in centrifugirali (1 min na 14500 vrtljajih na minuto). Vzorce izolirane DNA smo označili z številko in prvima dvema črkama imena ter priimka. Na epruveto smo zapisali še datum izolacije in vzorec shranili na -20°C .



Slika 4: Centrifugiranje med izolacijo DNA iz vzorcev slin v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani

Podkrajšek, T.: Nogometnašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

5.3 MERJENJE KONCENTRACIJA DNA

Izolirani DNA smo pomerili koncentracijo z aparatom Nanodrop One (Thermo Scientific). S tem smo se prepričali, da smo uspešno izolirali DNA. Pri merjenju smo se ravnali po pravilih, ki veljajo za uporabo tega aparata.

5.4 POMNOŽEVANJE DELA GENA ZA AKTIN 3 Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

Pomnoževanje dela gena *ACTN3* smo izvedli z verižno reakcijo s polimerazo (angl. polymerase chain reaction - PCR). PCR omogoča pomnoževanje odseka gena, ki nas zanima, z encimom polimeraza. Ta sintetizira nove odseke DNA, pri tem pa začetni oligonukleotidi določijo odsek, ki ga bo polimeraza pomnožila. Uporabila smo protokol pomnoževanja, ki je že bil v uporabi v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo. V Tabeli 1 je prikazana sestava mešanice za en vzorec in za 6 vzorcev.

Tabela 1: Reakcija za pomnoževanje dela gena *ACTN3* s PCR

	1 reakcija	Mešanica
Pufer Platinum Hot Start PCR Master Mix (2-kratni)	10 µL	70 µL
Smerni začetni aligonukieotid	1µL	7 µL
Protismerni začetni alligonukleotid	1 µL	7 µL
H2O (voda brez nukleaz!)	7 µL	49 µL
DNA	1 µL	

19 µl nastale mešanice smo dodali v vsako epruveto. V prvih 6 epruвет smo dodali še 1 µl izolirane DNA iz sline. V zadnjo epruveto DNA nismo dodali, saj smo jo uporabili kot negativno kontrolo. Če v tem vzorcu ni prišlo do pomnoževanja, smo bili prepričani, da pri delu ni prišlo do onesnaženja vzorcev. Epruvete smo vstavili v aparat za PCR Gene AmpSystem 9700 (Applied Biosystem) in izbrali program za pomnoževanje gena *ACTN3*, ki je naveden v Tabeli 2.

Tabela 2: Program za pomnoževanje gena *ACTN3*

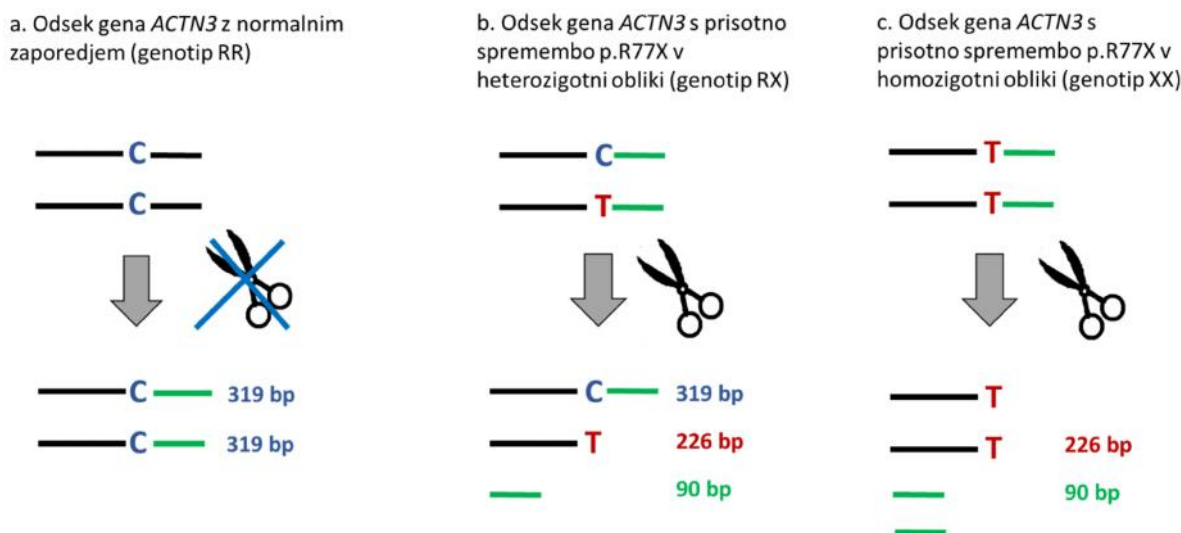
	Temperatura	Čas
Začetna deraturacija	95 °C	2 min
Pomnoževanje	95 °C	30 s
	57 °C	30 s
	72 °C	30 s
Končno podaljševanje	72 °C	7 min
Hlajenje	10 °C	

Podkrajšek, T.: Nogometnašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

Po končani reakciji PCR smo vzorce nanesti na elektroforezo. S tem smo preverili, če je pomnoževanje uspelo. PCR produkte smo shranili v hladilniku na temperaturi 4°C.

5.5 RESTRIKCIJA

Z restrikcijsko analizo smo preverili, ali je genetska sprememba p.R577X pri posamezni nogometnašici prisotna ali ne. Pri restrikciji smo uporabili restrikcijski encim *DdeI*. Encim deluje kot škarje in razreže pomnožen odsek gena *ACTN3* samo, če je prisotna sprememba p.R577X. Tako smo lahko kasneje na agarozni elektroforezi glede na dolžino in število fragmentov DNA prepoznali prisotnost spremembe. Pri vzorcu, kjer je bila prisotna sprememba v heterozigotni obliki (genotip RX), so bili vidni 3 restrikcijski fragmenti. Kjer je bila sprememba prisotna v homozigotni obliki (genotip XX) sta bila vidna 2 kratka restrikcijska fragmenta. Kjer spremembe ni bilo (genotip RR), je bil le 1 dolg fragment. V tem primeru encim fragmenta ni razrezal (vse možnosti so prikazane na Sliki 5). Tako smo z restrikcijo in agarozno elektroforezo ločili vzorce heterozigotov (genotip XR), homozigotov (genotip XX) in normalnega stanja (genotip RR). Pri restrikcijski analizi smo poleg vzorcev nogometnašic vedno analizirali tudi 3 kontrolne vzorce, od tega en vzorec z genotipom RR, en vzorec z genotipom RX in en vzorec z genotipom XX.



Sika 5: Shema restrikcije z encimom *DdeI* odseka gena *ACTN3* za določanje prisotnosti genetske spremembe p.R577X.

Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

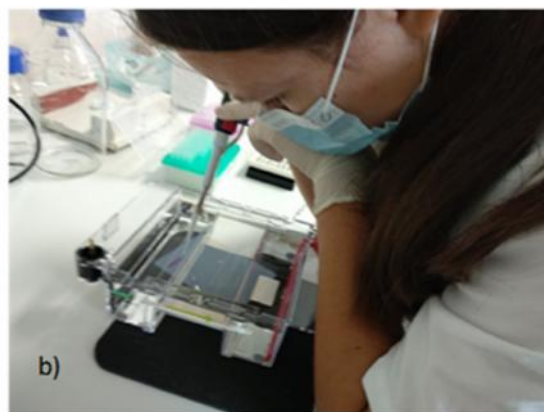
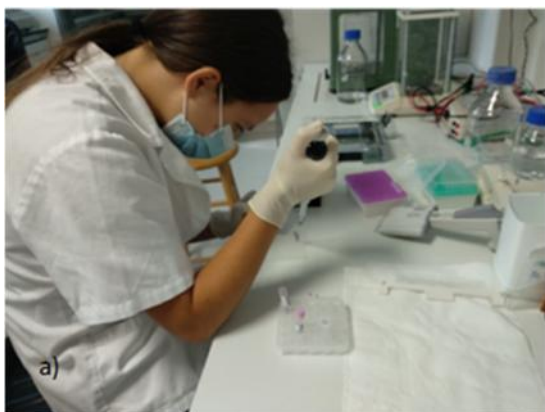
Na Sliki 5 je v primeru a prikazan odsek gena *ACTN3* z normalnim zaporedjem, ki ga encim ni razrezal, torej dolžine 319 baznih parov (bp). V primeru b z genotipom RX so prisotni trije fragmenti dolžin 319 bp, 226 bp in 90 bp. V tem primeru je encim razrezal odsek, ki vsebuje spremembo (baza T), ne pa normalnega odseka. V primeru c z genotipom XX je prišlo do rezanja in nastanka dveh krajših fragmentov dolžine 226 bp in 90 bp.

Restrikcijo smo izvedli tako, da smo dali v epruveto 2 μ L pufra 10X CUTSMART, 1 μ L restriktivskega encima *DdeI* (New England Biolabs), 7 μ L vode in 10 μ L PCR produkta. Pogoji restrikcije:

- 37 °C- 15 min
- 65 °C- 20 min
- 10°C- ∞

5.6 AGARozNA ELEKTROFOREZA

Agarozna elektroforeza omogoča ločevanje fragmentov DNA po velikosti. Barvilo, ki smo ga dodali gelu pa omogoča, da te fragmente vidimo pod UV svetlobo. Z agarozno elektroforezo smo najprej ugotovili, če je reakcija PCR uspela. Če smo na gelu videli liso DNA, je bila reakcija uspešna. Agarozno elektroforezo smo uporabili tudi za določanje dolžine restriktivskih fragmentov. Najprej smo pripravili agarozni gel iz 16 g agaroze, 80 ml 1x pufra TBE in 8 μ L barvila Sybergreen. Mešanico smo segreli v mikrovalovni pečici, dokler se gel ni zgostil. Ko se je mešanica nekoliko ohladila, smo v kalup pripravili glavničke in pozorno vlili gel. V luknjice, ki so nastale zaradi glavničkov, smo nanесли vzorec PCR produkta ali vzorec po restrikciji. Pred nanosom smo vzorec zmešali z nanašalnim pufrom. Fragmenti so zaradi električnega toka potovali in se ločili po velikosti, po končani elektroforezi pa smo jih opazovali pod UV svetlobo.



Slika 6: Agarozna elektroforeza: a) priprava mešanice za nanos na agarozno elektroforezo in b) nanos vzorcev pomešanih z vijoličnim nanašalnim pufrom v luknjice v agaroznem gelu.

Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

6. REZULTATI

6.1 ZNAČILNOSTI VKLJUČENE SKUPINE NOGOMETIŠIC

V raziskavo smo vključili 43 nogometišic. Nogomet so trenirale od 4 do 18 let (povprečno 7,4 let) in bile stare od 13 do 28 let, povprečna starost je bila 14,7 let. V zadnjih štirih letih so imele od 0 do 8 poškodb. Med njimi je bilo 19 nogometišic, ki igrajo v članski ekipi, 10 igralk selekcije u17 in 14 igralk selekcije u15. Podatki o starosti, številu in tipu poškodb, igralnem položaju in genotipu igralk so zbrani v Tabeli 3. Pri dveh vzorcih (23 in 43) podatkov o poškodbah nismo dobili.

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

Tabela 3: Podatki o sodelujočih nogometašicah v raziskavi

Številka vzorca	Leto rojstva	Zvini	Zlomi	Poškodbe mišic	Ostale poškodbe	Poškodbe skupaj	Igralni položaj	Genotip	Selekcija
1	2004	0	0	0	3	3	osrednja branilka	XR	u17
2	2004	0	0	0	0	0	osrednja branilka, bočna branilka	XR	u17
3	2005	0	0	1	0	1	vezna igralka	XR	u17
4	2004	1	0	1	0	2	osrednja branilka	RR	u17
5	2005	1	0	0	0	1	vratarica	RR	u17
6	2005	0	0	3	0	3	krilna napadalka	XR	u17
7	2005	2	0	0	0	2	osrednja branilka	RR	u17
8	2006	0	2	4	0	6	bočna branilka, vezna igralka	XX	u15
9	2007	0	0	0	0	0	osrednja branilka	XR	u15
10	2007	0	0	0	0	0	vezna igralka	RR	u15
11	2006	0	0	0	0	0	bočna branilka, krilna napadalka	XR	u15
12	2007	0	0	0	0	0	krilna napadalka	RR	u15
13	2006	0	0	0	0	0	osrednja napadalka	RR	u15
14	2006	0	0	1	0	1	vezna igralka	XR	u15
15	2006	0	0	1	1	2	osrednja napadalka	XX	u15
16	2007	0	0	0	0	0	bočna branilka	XX	u15
17	2007	0	0	0	0	0	vratarica	RR	u15
18	2004	0	0	0	0	0	bočna branilka	XX	u17
19	2006	1	0	0	0	1	vezna igralka, osrednja napadalka	XX	u15
20	2006	0	0	0	0	0	vezna igralka	XR	u15
21	2006	0	0	0	0	0	vratarica	XR	u15
22	2004	0	0	0	1	1	vezna igralka, osrednja napadalka	XR	u17
23	2006	/	/	/	/	/	bočna branilka	RR	u15
24	1996	0	0	1	0	1	osrednja napadalka	RR	članice
25	2003	0	0	0	0	0	krilna napadalka	RR	članice
26	2003	0	0	0	0	0	vezna igralka	XR	članice
27	1998	0	0	2	0	2	krilna napadalka	XX	članice
28	1999	0	2	0	0	2	krilna napadalka	XX	članice
29	1995	0	0	1	1	2	osrednja branilka	XX	članice
30	2002	0	0	0	0	0	vezna igralka	RR	članice
31	2002	0	0	0	0	0	bočna branilka	XR	članice
32	2003	0	0	6	2	8	vezna igralka	RR	članice
33	1999	0	0	2	0	2	bočna branilka	RR	članice
34	2003	2	0	0	0	2	osrednja napadalka	XR	članice
35	1996	1	0	0	0	1	bočna branilka	RR	članice
36	1999	0	0	1	3	4	osrednja branilka	XX	članice
37	1992	0	0	0	0	0	vezna igralka	RR	članice
38	1999	2	0	7	0	9	branilka	XX	članice
39	2000	1	0	0	0	1	bočna branilka, vezna igralka	XX	članice
40	2004	0	0	0	0	0	krilna napadalka	XR	u17
41	1994	0	0	0	0	0	osrednja branilka, vezna igralka	RR	članice
42	1993	0	0	0	0	0	osrednja napadalka	RR	članice
43	2003	/	/	/	/	/	krilna napadalka, osrednja napadalka	RR	članice

6.2 KONCENTRACIJA DNA

Glede na rezultate koncentracij izoliranih vzorcev DNA, ki so zbrani v Tabeli 4, smo lahko potrdili, da smo uspešno izolirali DNA iz vzorcev sline. Koncentracija DNA je bila pri posameznih igralkah zelo različna, vendar povsod zadostna za nadaljnje analize.

Tabela 4: Rezultati merjenja koncentracije DNA

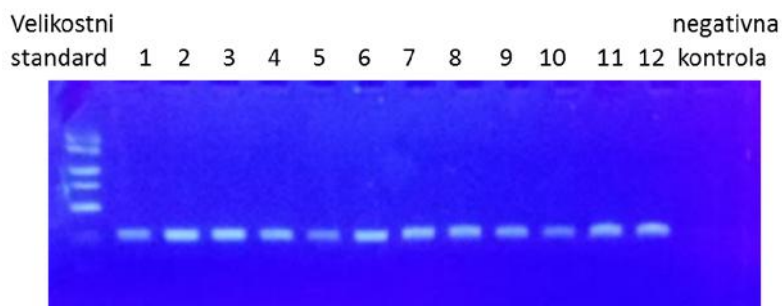
Številka vzorca	Koncentracija DNA (ng/ μ L)	Številka vzorca	Koncentracija DNA (ng/ μ L)
1	42,5	23	201,7
2	80,7	24	207,1
3	111,7	25	21,1
4	42,2	26	21,7
5	26,2	27	150,7
6	82	28	76,4
7	15,5	29	95,8
8	122,6	30	103,8
9	74,7	31	32,2
10	38,8	32	169,5
11	59,9	33	126,4
12	27,6	34	53,9
13	27,8	35	75,3
14	9,1	36	177,9
15	22,9	37	49,5
16	75,8	38	48,2
17	32,5	39	138,4
18	132,2	40	96,6
19	61,6	41	118,8
20	36,6	42	57,3
21	57,1	43	10

6.3 DOLOČANJE SPREMEMBE p.R577X GENA *ACTN3*

Prisotnost spremembe p.R577X smo določali s pomnoževanjem odseka gena *ACTN3* s PCR. Uspešnost pomnoževanja smo preverjali z elektroforezo, kar je za vzorce 1-12 prikazano na Sliki 7. Fragmente smo ocenjevali pod UV svetlobo. Če je bil pri vzorcih prisoten en odsek z dolžino 319 bp, je bilo pomnoževanje uspešno. Pri negativni kontroli ni smelo biti prisotnega odseka, kar je

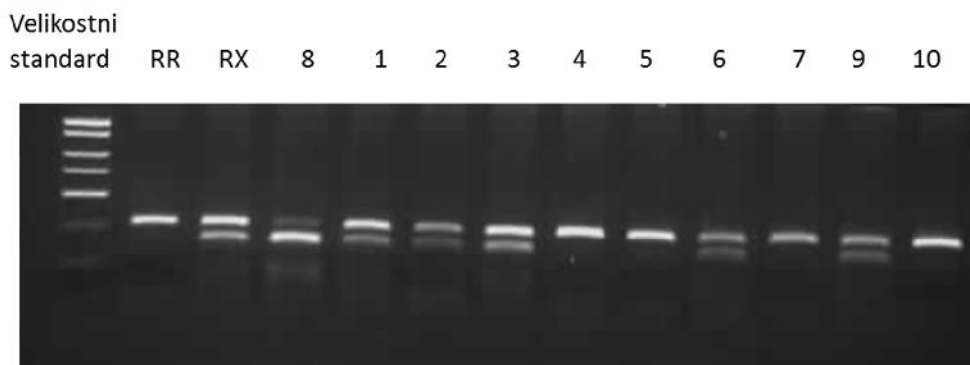
Podkrajšek, T.: Nogometnašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

pomenilo, da je bilo delo natančno in ni prišlo do nenamerne vnosa druge DNA. Pri takšnih reakcijah PCR smo nadaljevali z restrikcijsko analizo.



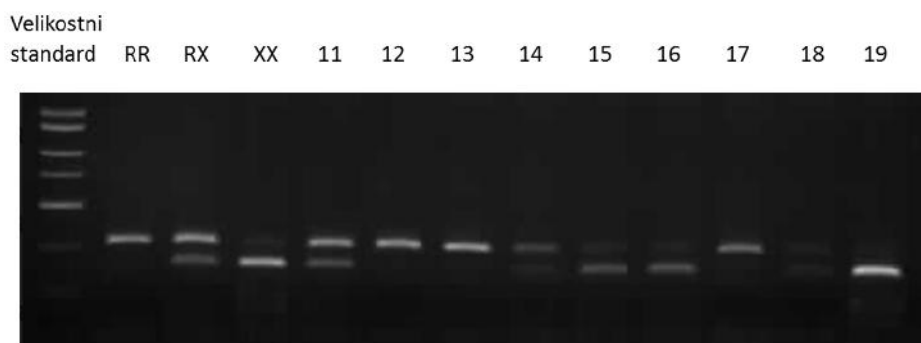
Slika 7: Preverjanje uspešnosti PCR reakcije z agarozno elektroforezo (v prvi luknjici gela je velikostni standard, potem sledijo vzorci 1 do 12, na koncu je negativna kontrola).

Na Slikah 8 do 12 so prikazani rezultati restrikcijske analize pomnoženih odsekov pri vseh vzorcih. Kjer je viden en dolg fragment, ima vzorec genotip RR, pri vidnih treh restrikcijskih fragmentih ima vzorec genotip RX in pri dveh kratkih fragmentih ima genotip XX. Krajši fragmenti na sliki gela žal niso povsod dobro vidni.

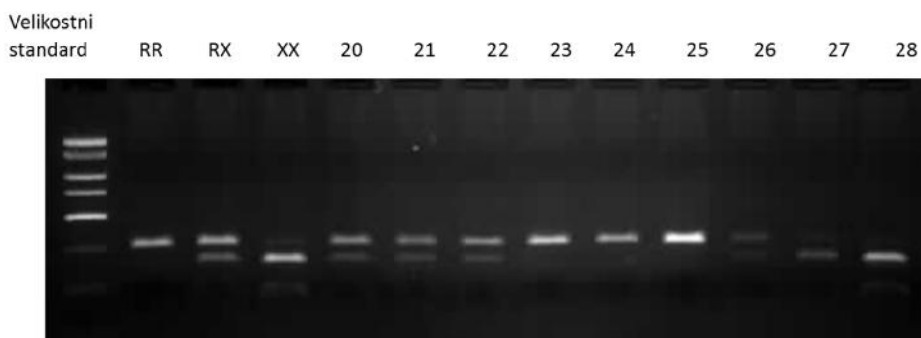


Slika 8: Restrikcijska analiza spremembe p.R577X gena *ACTN3* vzorcev 1-10 (v prvi luknjici gela je velikostni standard, sledita kontrolna vzorca z genotipom RR in RX ter vzorci 1 do 10).

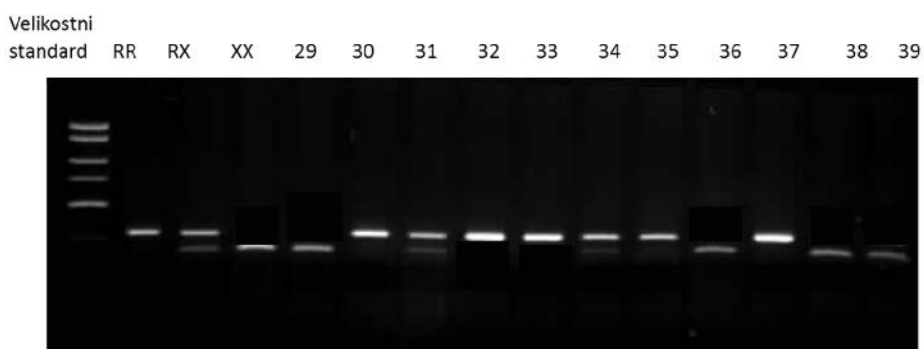
Podkrajšek, T.: Nogometnašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021



Slika 9: Restriksijska analiza spremembe p.R577X gena *ACTN3* vzorcev 11 do 19 (v prvi luknjici gela je velikostni standard, potem kontrolni vzorci z genotipi RR, RX in XX ter vzorci 11 do 19).

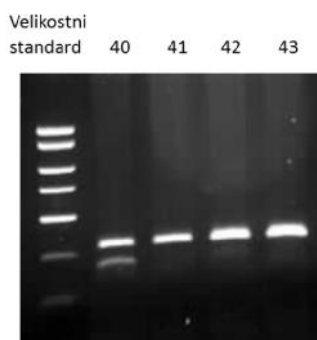


Slika 10: Restriksijska analiza spremembe p.R577X gena *ACTN3* vzorcev 20 do 28 (v prvi luknjici gela je velikostni standard, sledijo kontrolni vzorci z genotipom RR, RX in XX ter vzorci 20 do 28).



Slika 11: Restriksijska analiza spremembe p.R577X gena *ACTN3* vzorcev 29 do 39 (v prvi luknjici gela je velikostni standard, sledijo kontrolni vzorci z genotipom RR RX in XX ter vzorci 29 do 39).

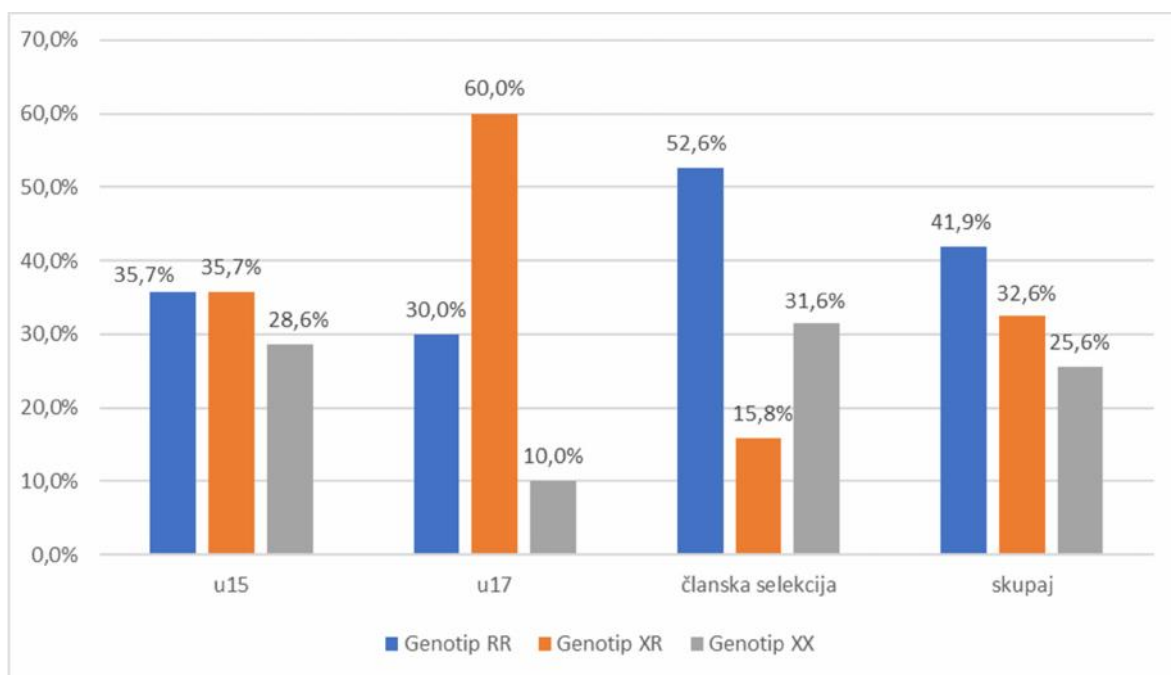
Podkrajšek, T.: Nogometišča, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021



Slika 12: Restriksijska analiza spremembe p.R577X gena *ACTN3* (v prvi luknjici gela je velikostni standard, sledijo vzorci 40 do 43).

6.4 PRISOTNOST SPREMEMBE p.R577X gena *ACTN3*

Na Grafu 1 je prikazana prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* pri posameznih starostih selekcijah in pri vseh selekcijah skupaj. Z modro barvo je označen delež nogometišč brez spremembe, z oranžno delež heterozigotov in s sivo barvo delež homozigotov.



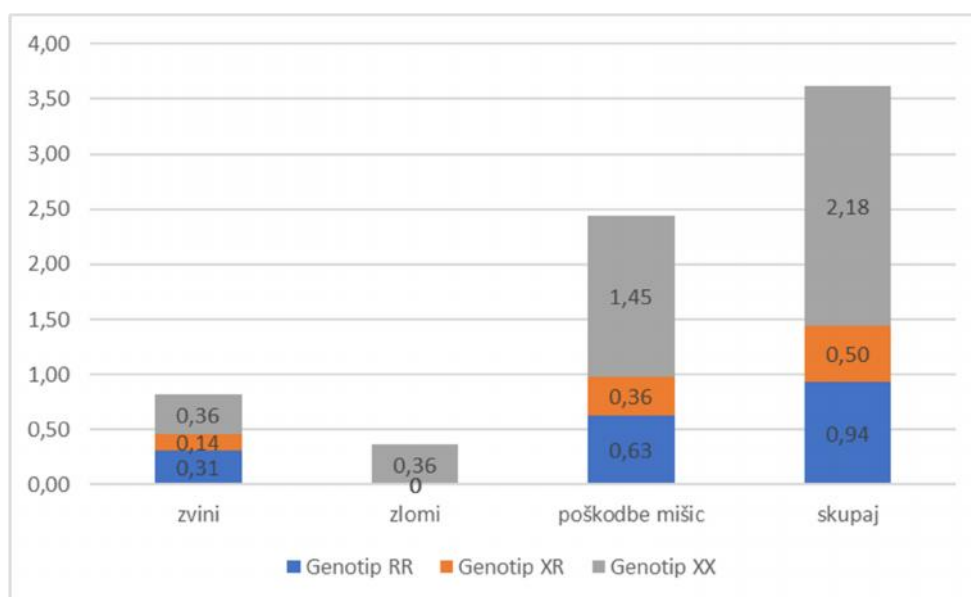
Graf 1: Prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* pri nogometiščah, ki so bile vključene v raziskavo.

Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

Iz Grafa 1 lahko razberemo, da je pri vseh nogometišicah skupaj delež heterozigotov (genotip RX) 32,6% in delež oseb brez spremembe (genotip RR) 41,9%. Homozigotnih nosilk (genotip XX) je 25,6%. V članski selekciji je najvišji delež nogometišic z genotipom RR (52,6%), delež heterozigotnih nosilk je 15,8%, delež homozigotnih nosilk pa 31,6%. V selekciji nogometišic mlajših od 17 let je delež heterozigotnih nosilk kar 60%. Brez spremembe je 30% igralk, homozigotnih nosilk je le 10%. V selekciji u15 je delež oseb z normalnim stanjem in heterozigotnih nosilk enak in sicer 35,7%, homozigotnih nosilk je 28,6%.

6.5 POGOSTOST POŠKODB PRI NOGOMETIŠICAH Z RAZLIČNIM GENOTIPOM

Ker nekatere raziskave dokazujejo, da je prisotnost spremembe p.R577X povezana z občutljivostjo mišic na poškodbe, smo opredelili pogostost in tip poškodb pri igralkah posameznega genotipa (Graf 3). Upoštevali smo povprečno število poškodb nogometišic v zadnjih 4 letih. Poškodbe so razdeljene v tri skupine: zlome, zvini in poškodbe mišic. Poškodbe, ki ne spadajo v nobeno od teh kategorij oziroma o natančnem tipu poškodbe nismo prejeli podatka, so vključene samo v skupino, kjer so prikazane vse poškodbe skupaj.



Graf 2: Pogostost poškodb pri nogometišicah z različnim genotipom spremembe p.R577X.

Skupno so bile poškodbe najpogosteje prisotne pri nogometišicah z genotipom XX. Te nogometišice so imele povprečno v zadnjih 4 letih 2,18 poškodbe, nogometišice z genotipom RX

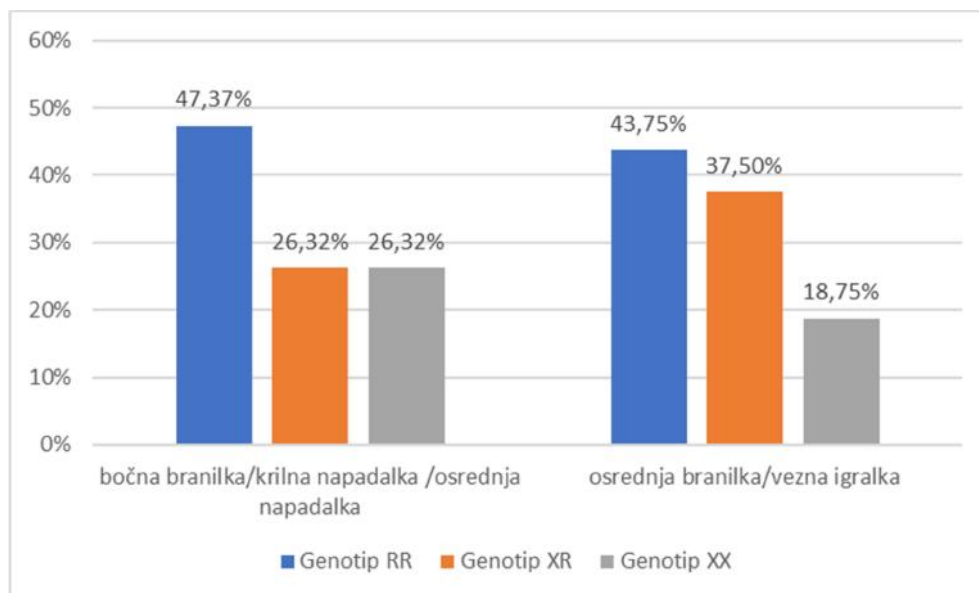
Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

0,5 poškodbe in igralka z normalnim genotipom 0,94. Pri vseh igralkah so prevladovala poškodba mišic. Nogometašice z genotipom XX so imele povprečno 1,45 poškodb mišic, nogometašice z genotipom RX 0,36 in normalnim genotipom 0,63 poškodb mišic. Zlomi so bili prisotni le pri igralkah z genotipom XX (s povprečjem 0,36). Igralke z genotipom XX so imele povprečno 0,36 zvina, z genotipom RX 0,14 zvina in igralka z normalnim genotipom 0,31 zvina.

6.6 PRISOTNOST SPREMEMBE p.R577X GENA ACTN3 GLEDE NA IGRALNI POLOŽAJ

Da bi preverili, če se zastopanost genotipov glede na različne igralne položaje spreminja, smo igralne položaje razdelili v dve skupini. V prvo skupino smo razporedili bočne branilke, krilne in osrednje napadalke. Na teh položajih naj bi bila za športni uspeh bolj pomembna hitrost. V drugo skupino pa smo vključili osrednje branilke in vezne igralka, za katere smo ocenili, da je zanje pomembnejša vzdržljivost. Vratark nismo vključili v nobeno skupino. Tudi igralk, ki igrajo na različnih igralnih položajih, ki ne sodijo v isto skupino, v analizo nismo vključili. Takih igralk je bilo 5, 2 z genotipom XR in 3 z genotipom XX.

Pogostost posameznih genotipov glede na igralni položaj je prikazana na Grafu 3. Osrednje branilke in bočne igralka imajo v povprečju pogosteje prisoten genotip XR, bočne branilke, krilne in osrednje napadalke pa genotip RR in XX. Prisotnost spremembe je tako pri osrednjih branilkah in veznih igralkah večja.



Graf 3: Genotipi vključenih nogometašic glede na njihov igralni položaj

7. DISKUSIJA

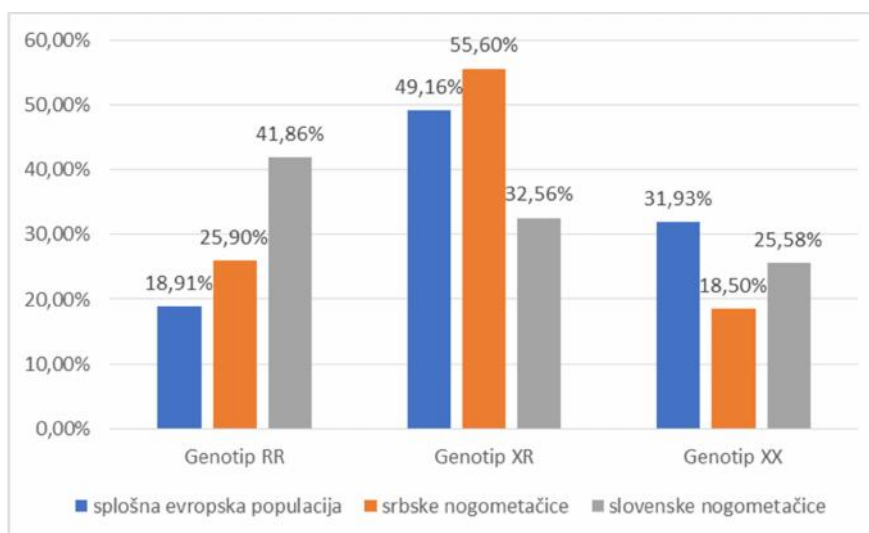
Ko sem se odločila, da bom izdelala raziskovalno nalogo, me je najbolj veselilo prav delo v laboratoriju. Kakršenkoli laboratorij sem pred raziskovalnim delom le nekajkrat videla, moje laboratorijske izkušnje pa so bile povezane le z enostavnimi poskusi pri pouku v šoli. Tako sem pipeto prvič prijela v roke večer pred začetkom laboratorijskega dela. Mami mi je domov prinesla staro pipeto in mi pokazala, kako jo uporabljati, potem pa sem cel večer pipetirala vodo iz enega v drug kozarec. Ob zaključku mojega dela v laboratoriju mi je potek pipetiranja, tako kot vsi ostali postopki, postal čisto samoumeven. Po večkratni vaji sem pod nadzorom tudi čisto sama izolirala vzorec DNA, pripravila reakcijo za pomnoževanje s PCR in izvedla druge postopke. Največji izziv mi je predstavljalo nanašanje vzorcev v luknjice pri agarozni elektroforezi. Za to, da sem vzorec res nanese v majhno luknjico v gelu in da se vzorec ni pomešal s sosednjim vzorcem, je bila potrebna natančna in mirna roka, kar mi je predvsem na začetku predstavljalo kar nekaj težav.

V raziskovalno nalogo smo vključili 43 slovenskih nogometišic. Zaradi pandemije covid-19 smo morali zbiranje vzorcev na žalost zaustaviti. Če bi, kot načrtovano, zbrali okoli 100 vzorcev, bi bili rezultati veliko bolj realni in bi bolj verjetno veljali za splošno populacijo slovenskih nogometišic. Pri selekciji u17 smo na primer zbrali le 10 vzorcev, zato ne moremo trditi, da ta rezultat velja tudi za ostale nogometišice iste starosti. Ne področju pomena spremembe p.R577X gena *ACTN3* in na področju športne genetike na splošno je še veliko neznanega. Čeprav so raziskave v tujini tudi pri nogometiših pogoste in obsežnejše, kar sem sama opazila pri pregledovanju objav (primer je lahko raziskava na 200 brazilskih nogometiših [16]), v Sloveniji kakršnekoli raziskave na temo *ACTN3* nisem zasledila. Rezultati moje raziskave bi bili tako lahko osnova nadaljnjim obširnejšim raziskavam.

Prva hipoteza, ki sem jo zastavila na začetku raziskovalnega dela, se glasi, da je prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* pri slovenskih nogometišicah nižja kot pri splošni evropski populaciji. Hipotezo smo potrdili, saj je delež prisotnosti genotipov s prisotno spremembo (genotipa XX in XR) pri slovenskih nogometišicah za okoli 7% nižji. Druge hipoteze nismo potrdili, saj je delež genotipa XX v članski selekciji najvišji in s starostjo selekcij ne pada. Tudi tretje hipoteze, ki pravi, da imajo nogometišice s prisotno spremembo v povprečju več poškodb kot nogometišice brez spremembe, ne moremo potrditi. Trditev velja le za nogometišice z genotipom XX. Četrto hipotezo smo potrdili. Pri skupini osrednjih branilk in veznih igralk je prisotnost spremembe p.R577X višja kot pri bočnih branilkah, krilnih ter osrednjih napadalkah.

7.1 PRIMERJAVA GENOTIPOV SLOVENSКИH NOGOMETIŠIČ S PODATKI ZA SLOŠNO EVROPSKO POPULACIJO

Pri splošni evropski populaciji je po podatkih zbirke podatkov GnomAD delež heterozigotnih nosilcev 49,16%, delež homozigotnih nosilcev 31,93% in delež oseb brez spremembe 18,91% [11]. Te podatke smo primerjali s podatki, ki smo jih dobili za vse nogometišice, ki so sodelovale v raziskavi, kar je prikazano na Grafu 4. Tako smo preverili hipotezo 1, ki pravi, da je prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* pri slovenskih nogometišicah nižja kot pri splošni evropski populaciji. To smo pričakovali zato, ker je genotip XX pri moških nogometiših redkejši kot v splošni populaciji [15].

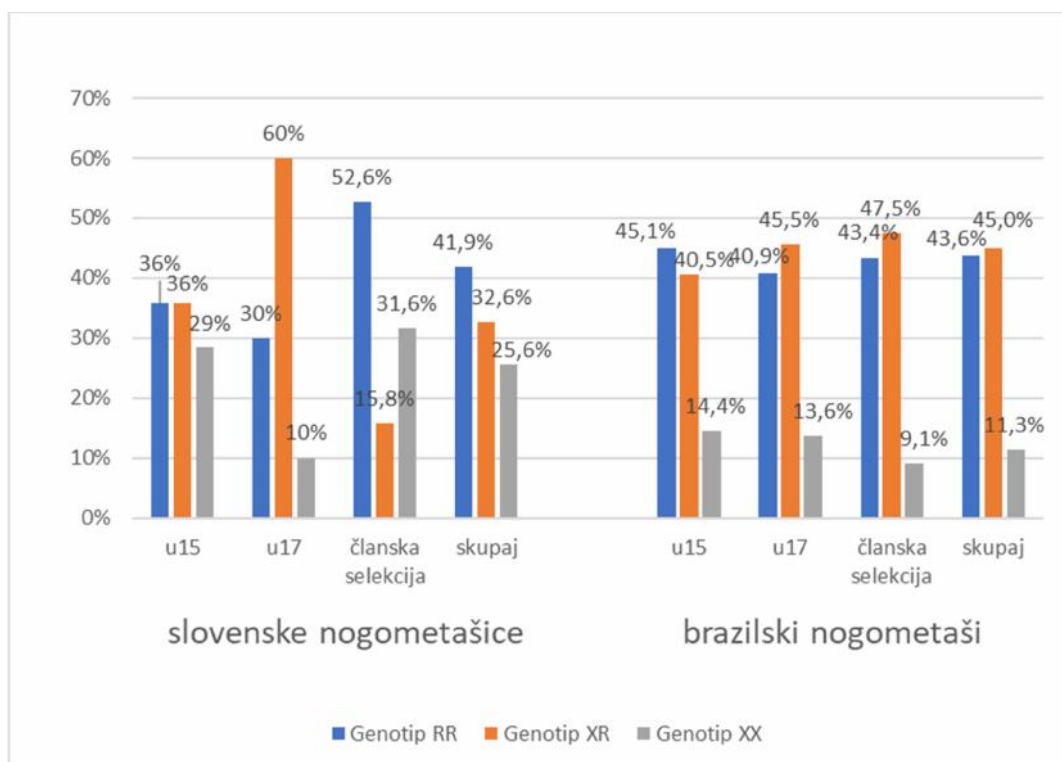


Graf 4: Primerjava porazdelitve genotipov slovenskih nogometišic s podatki splošne evropske populacije zbirke GnomAD [11] in srbskimi nogometišicami [17].

Pri primerjavi slovenskih nogometišic s splošno evropsko populacijo je razlika velika pri genotipu RR in XR. Delež prvega je pri slovenskih nogometišicah veliko višji kot pri splošni evropski populaciji, delež drugega pa veliko manjši. Pri genotipu XX je razlika manjša, nekaj odstotkov v korist splošne populacije. Če primerjamo delež prisotnosti spremembe v katerikoli obliki (genotipa XR in XX), je ta pri splošni populaciji veliko višji. Hipotezo 1 smo tako potrdili, saj je normalno stanje te spremembe (genotip RR) pri slovenskih nogometišicah pogostejše.

7.2 PRIMERJAVA GENOTIPOV SLOVENSКИH NOGOMETAIŠIC Z GENOTIPI NOGOMETAIŠEV IZ DRUGIH POPULACIJ

Rezultate nogometašic, ki so sodelovale v moji raziskavi, sem primerjala z rezultati obširne raziskave o brazilskih nogometaših [16]. V raziskavo je bilo vključenih 43 nogometašev selekcije u14, 68 nogometašev selekcije u15, 44 nogometašev selekcije u17, 115 nogometašev selekcije u20 in 83 nogometašev članske selekcije. Ker so v tej raziskavi podani podatki za selekcije, v katerih slovenske nogometašice ne tekmujejo, sem za primerjavo delež nogometašev izračunala tako, da sem selekcijo u14 vključila k selekciji u15 in selekcijo u20 k članski selekciji. Nogometašice, ki po starosti še spadajo v te dve selekciji, v Sloveniji tekmujejo že v sklopu selekcije u15 oziroma članske selekcije. Na Grafu 5 je primerjava prisotnosti genotipov pri brazilskih nogometaših [16] in slovenskih nogometašicah, ki sem jih določila v svoji raziskavi.



Graf 5: Primerjava genotipa spremembe p.R577X gena *ACTN3* slovenskih nogometašic z genotipom brazilskih profesionalnih nogometašev glede na starost [16]

Razporeditev genotipov pri posameznih selekcijah je pri brazilskih nogometaših ne glede na starost dokaj podobna. Za te rezultate bi lahko dejali, da veljajo za splošno populacijo brazilskih nogometašev. Tega pri rezultatih moje raziskave naloge nismo opazili. Pri slovenskih nogometašicah trend ni opazen pri nobenem genotipu, rezultati pa so zelo razgibani. Vzrok za to najverjetneje tiči v majhnem številu predstavnic v posamezni selekciji. V selekciji u15 je bilo nogometašic 14, v selekciji u17 10 in v članski selekciji 19.

Pri brazilskih nogometaših se prisotnost genotipa XX znižuje, prisotnosti genotipov RR in XR pa sta v vseh selekcijah okoli 45%, z medsebojno razliko nekaj odstotkov. Pogostost genotipa RR je tako pri skupini slovenskih nogometašic in skupini brazilskih nogometašev podoben. Pri slovenskih nogometašicah je delež genotipa XX višji za skoraj 15%, za podobni delež pa je manjši genotip XR. Skupna prisotnost spremembe (genotip XR ali genotip XX) je zelo podobna, malo nižja pri brazilskih nogometaših.

Ob razmišljanju o pomenu teh rezultatov se je potrebno zavedati, da je moški nogomet v primerjavi z ženskim po vsem svetu bolje razvit in da Brazilija velja za nogometno velesilo. Za nastop v prvi brazilski ligi, kjer nastopajo vsi nogometaši vključeni v omenjeno raziskavo [16], so mladi nogometaši podvrženi strogemu izboru. Tega v slovenskem ženskem nogometu ni. Obstaja le ena liga, nogometašice v veliki večini nimajo profesionalnih pogodb. Del ekipe, predvsem v mlajših selekcijah, je lahko kdorkoli, ki obiskuje treninge, ne glede na nadarjenost in športni potencial. Razlika v prisotnosti genotipov je lahko tudi posledica razvoja nogometa in popularnosti nogometa v posamezni državi. Pomembno pa je tudi dejstvo, da je v populaciji Latinskih Američanov sprememba prisotna pri 33,6% populacije, kar je redkeje kot v splošni evropski populaciji, kjer je ta delež kar 56,5% [11]. Bolj natančna bi bila primerjava nogometašev oziroma nogometašic iste rase. Tako bi vedeli, da so rezultati specifični zaradi igranja nogometa in niso posledica genetskih značilnosti pri posamezni rasi.

Edina raziskava pri nogometašicah je potekala na skupini 27 mladih srbskih nogometašic [17]. Primerjava porazdelitve genotipov spremembe p.R577X s slovenskimi nogometašicami je prikazana na Grafu 4, skupaj s primerjavo s splošno evropsko populacijo. Pri srbskih nogometašicah lahko opazimo, da več kot polovico vseh genotipov predstavlja genotip XR. Pri slovenskih nogometašicah je ta delež manjši, višja pa sta deleža genotipa RR in XX. Velike razlike med prisotnosti genotipov v skupinah ne znam pojasniti. V obeh raziskavah je preiskovalna skupina precej majhna, kar lahko vpliva na dobljene rezultate. Ti tako lahko slabo predstavljajo celotno populacijo.

Zanimivo bi bilo primerjati rezultate slovenskih nogometašic z rezultati nogometašic v drugih državah, kjer je nogomet bolj razvit. Tam bi bili rezultati lahko bolj podobni rezultatom brazilskih nogometašev, pričakovana bi bila torej manjša prisotnost genotipa XX. Ker se ženski nogomet v Sloveniji v zadnjih letih zelo razvija, bi bili lahko rezultati v prihodnosti precej drugačni.

7.3 PRISOTNOST GENETSKE SPREMEMBE p.R557X PRI POSAMEZNIH SELEKCIJAH SLOVENSКИH NOGOMETIŠIC

Kot je prikazano v poglavju Rezultati na Grafu 1 in v primerjalnem Grafu 5, se v različnih selekcijah slovenskih nogometišic delež prisotnosti različnih genotipov precej razlikuje, verjetno zopet zaradi majhnega števila predstavnic v posamezni selekciji. To je še posebej verjetno pri selekciji u17, saj bi razlika v genotipu pri le eni igralki na rezultate močno vplivala (1 vzorec predstavlja 10%). Če se delež prisotnosti spremembe p.R577X v starejših selekcijah res znižuje, je iz rezultatov zaradi nihanj pri posamezni selekciji, težko oceniti. Je pa delež nogometišic z genotipom RR najvišji v članski selekciji. V selekcijah u15 in u17 je delež genotipa RR podoben, podoben je tudi delež genotipa XX v selekcijah u15 in članski selekciji.

Na podlagi rezultatov ne moremo potrditi hipoteze 2, da je delež homozigotih nosilk spremembe (genotip XX) v članski selekciji nižji kot pri mlajših selekcijah. Edini trend, ki je delno opazen, je zviševanje genotipa RR s starostjo selekcij. Vendar to ni zanesljivo, saj je v selekciji u17 delež nižji kot v selekciji u15. V raziskavi z brazilskimi nogometiši so zaradi zviševanja genotipa RR v višjih selekcijah sklepali, da je bolj verjetno, da bo mladi nogometiš napredoval do članske selekcije, če je nosilec normalnega alela [16].

7.4 POGOSTOST POŠKODB PRI NOGOMETIŠICAH Z RAZLIČNIM GENOTIPOM

Pogostost poškodb pri nogometišicah glede na različen genotip je prikazan na Grafu 2. Največ poškodb imajo zanesljivo igralki s prisotno spremembo na obeh alelih (XX). Pri igralkah vseh genotipov prevladujejo poškodbe mišic. Zlomi so prisotni le pri igralkah z genotipom XX, ostale poškodbe so glede na skupno število poškodb zastopane v nekakšnem sorazmerju. To, da imajo z velikim naskokom največ poškodb igralki z genotipom XX, sem pričakovala. Znano je namreč, da je sprememba povezana s pogostostjo in resnostjo poškodb pri nogometišicah [6]. Presenetljiv je rezultat, da so pri genotipu brez spremembe (RR) poškodbe skoraj še enkrat bolj pogoste kot pri genotipu z prisotno spremembo na enem alelu (XR). To je glede na število poškodb pri genotipu XX ogromna razlika. Hipoteza 3 pravi, da je pogostost poškodb večja pri nogometišicah, ki imajo prisotno spremembo, kot pri nogometišicah, ki je nimajo. Te hipoteze ne moremo potrditi. Trditev sicer velja za skupino nogometišic z genotipom XX, a ne za igralki z genotipom XR. Tak rezultat je zelo presenetljiv in hkrati z moje strani nepričakovan.

7.5 PRISOTNOST GENOTIPA p.R577X GENA *ACTN3* GLEDE NA IGRALNI POLOŽAJ

Razlika v porazdelitvi genotipov glede na igralni položaj je bila dokazana v majhni skupini profesionalnih nogometišev [18]. Za slovenske igralki v prvi skupini (bočne branilke, krilne napadalke, osrednje napadalke) smo zaradi potrebe po več hitrih in eksplozivnih tekih pričakovali

Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

manjšo zastopanost genotipa XX. Zato smo pri osrednjih branilkah in veznih igralkah v drugi skupini, pričakovali večjo zastopanost genotipa XX in večji delež prisotnosti spremembe. Rezultati so prikazani na Grafu 3 in se z našimi pričakovanji niso povsem skladali. Genotip RR je bil resda pogosteje prisoten v prvi skupini, a je bil tu pogostejši tudi genotip XX in sicer za 7,6% nogometišic. Pri drugi skupini je genotip XX prisoten pri 7,6% manj nogometišic kot pri prvi skupini. Skupna prisotnost spremembe je pri prvi skupini 52,6% in pri drugi skupini 56,3%. Hipoteza 4, ki pravi, da je pogostost alela X pri osrednjih branilkah in veznih igralkah višja, je zato pravilna, a je v nasprotju s pričakovanji večji delež genotipa XX v prvi skupini.

8. ZAKLJUČEK

Med izdelovanjem raziskovalne naloge sem dobila veliko teoretičnega znanja, izkušenj v laboratoriju, naučila sem se kritično vrednotiti rezultate. Kot največjo slabost raziskovalne naloge bi ocenila premajhno število vključenih nogometišic. Če bi raziskava zajela večje število nogometišic, bi rezultate bolj zanesljivo primerjali z drugimi populacijami. V nekaterih primerih je bil rezultat po agarozni elektroforezi slabo viden. To je verjetno posledica premajhne količine zbrane slin in zato nizke koncentracije izolirane DNA iz teh vzorcev. V teh primerih so rezultate v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo potrdili z drugimi genetskimi metodami. Prav tako so za namen pisanja članka naredili statistično analizo in ocenili verjetnost vpliva spremembe p.R577X na pogostost poškodb, igralni položaj... Sama teh metod v raziskovalno delo nisem vključila, saj so za moje znanje prezahtevne.

Od 43 nogometišic, ki so sodelovale v raziskavi, smo genotip RR dokazali pri 41,9%, genotip XR pri 32,6% in genotip XX pri 25,6% vseh nogometišic. Pričakovano je delež prisotnosti spremembe pri nogometišicah manjši kot v splošni evropski populaciji. Delež genotipa RR je najvišji v članski selekciji, genotip XX se spreminja brez očitnega trenda. Poškodbe so najbolj pogoste pri nogometišicah z genotipom XX, prevladujejo poškodbe mišic. Pri osrednjih branilkah in veznih igralkah je v primerjavi z bočnimi branilkami, krilnimi in osrednjimi napadalkami prisotnost spremembe p.R577X višja.

Za uspeh posameznega športnika, v našem primeru nogometišice, je pomembnih veliko stvari, le ena izmed teh je genetsko ozadje. Tudi če ima nogometišica genetske lastnosti, ki naj bi bile ugodne za igranje nogometa, je za uspeh pomembna disciplina, okolje, dobri pogoji za razvoj... Vseeno bo nogometišici, ki je sodelovala v teh raziskavi, poznavanje genotipa p.R577X lahko v pomoč pri načrtovanju treninga. Nogometišica z genotipom RR bo na primer lahko zaradi večjega deleža hitrih mišičnih vlaken večjo pozornost na treningu posvetila vzdržljivosti. Nogometišica z genotipom XX pa bo lahko več pozornosti posvetila treningom za hitrost in eksplozivnost, hkrati pa bo zelo skrbela za regeneracijo po treningu, kar je pomembno za preprečevanje poškodb.

Moja raziskovalna naloga je odkrila nekatere osnovne genetske značilnosti slovenskih nogometišic in je tako lahko osnova obširnejšim raziskavam, ki bi uporabljale zahtevnejše metode in preiskovale večje število nogometišic. Zanimivo bi bilo primerjati rezultate slovenskih nogometišic s slovenskimi nogometiši, saj je moški nogomet v Sloveniji izrazito bolj razvit. Za boljše razumevanje pomena genetskega ozadja pri nogometišicah bi bilo potrebno po mojem mnenju analizirati še druge gene, ki vplivajo na športno uspešnost. Eden takih je na primer gen *ACE*, ki vpliva na športno vzdržljivost. Rezultate pa bi lažje ovrednotiti, če bi bili znani tudi podatki za splošno slovensko populacijo.

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

9. ZAHVALA

Iskreno bi se rada zahvalila mentoricama, Sonji Najman Vedenik in doc. dr. Katji Goričar, za vso pomoč, nasvete in podporo pri izdelovanju naloge. Velika zahvala gre tudi Inštitutu za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete, kjer so mi omogočili izvedbo eksperimentalnega dela v enem izmed njihovih laboratorijev, in Inge Sotlar za potrpežljivo vodenje skozi delo in veliko uporabnih nasvetov. Zahvaljujem se tudi Ženskem nogometnem klubu Radomlje za pomoč pri zbiranju vzorcev in vsem nogometašicam, ki so v moji raziskovalni nalogi sodelovale. Hvala tudi moji družini za vse spodbudne besede in kritike med izdelavo naloge.

10. SEZNAM LITERATURE

1. Kenig S. Genetsko testiranje v športu. Šport. 2017;1–2:81–6.
2. Klakočar T, Zorman T, Žvikart M. Mišičje. In: Klakočar T, editor. Osnove gibanja in mišične aktivnosti. 6. izdaja. Višja strokovna šola za gostinstvo in turizem Maribor; 2019. 16–20.
3. Vincent B, De Bock K, Ramaekers M, Van Den Eede E, Van Leemputte M, Hespel P, et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Genomics*. 2007;32(1):58–6.
4. Niemi AK, Majamaa K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur J Hum Genet*. 2005;3(8):965–9.
5. Gineviciene V, Jakaitiene A, Aksenov MO, Aksenova A V., Druzhevskaya AM, Astratenkova I V., et al. Association analysis of ACE, ACTN3 and PPARGC1A gene polymorphisms in two cohorts of European strength and power athletes. *Biol Sport*. 2016;3(3):199–206.
6. Massidda M, Voisin S, Culigioni C, Piras F, Cugia C, Yan X, et al. ACTN3 R577X Polymorphism Is Associated with the Incidence and Severity of Injuries in Professional Football Players. *Clin J Sport Med*. 2019;29(1):57–61.
7. Slavec L, Geršak K, Karas Kuželički N, Trebušak Podkrajšek K. Humane genetske spremembe in njihovo določanje: trenutno stanje in obeti za prihodnost. *Slov Pediatr Rev pediatrov Slov Spec šolske ter Visok Med Slov*. 2020;27:163–71.
8. Lippi G, Longo UG, Maffulli N. Genetics and sports. *Br Med Bull*. 2010;Genetics a(93):27–47.
9. Wang G, Tanaka M, Eynon N, North KN, Williams AG, Collins M, et al. The Future of Genomic Research in Athletic Performance and Adaptation to Training. *Med Sport Sci*. 2016;61:55–67.
10. Vlahovich N, Fricker PA, Brown MA, Hughes D. Ethics of genetic testing and research in sport: A position statement from the Australian Institute of Sport. *Br J Sports Med*. 2017;51(1):5–11.
11. The Genome Aggregation Database [Internet]. Dostopno na: <http://gnomad.broadinstitute.org/>
12. North KN, Yang N, Wattanasirichaigoon D, Mills M, Eastal S, Beggs AH. A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population. *Nat Genet*. 1999;21(4):353–4.
13. Ma F, Yang Y, Li X, Zhou F, Gao C, Li M, et al. The Association of Sport Performance with ACE and ACTN3 Genetic Polymorphisms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS*

Podkrajšek, T.: Nogometišica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

One. 2013;8(1):e54685.

14. Pimenta EM, Coelho DB, Veneroso CE, Coelho EJB, Cruz IR, Morandi RF, et al. Effect of ACTN3 Gene on Strength and Endurance in Soccer Players. *J Strength Cond Res.* 2013;27(12):3286–92.
15. Jacob Y, Hart NH, Cochrane JL, Spiteri T, Laws SM, Jones A, et al. ACTN3 (R577X) Genotype Is Associated With Australian Football League Players. *J Strength Cond Res.* 2020;9(2):22.
16. Coelho DB, Pimenta EM, Rosse IC, De Castro BM, Becker LK, De Oliveira EC, et al. Evidence for a Role of ACTN3 R577X Polymorphism in Football Player's Career Progression. *Int J Sports Med.* 2018;39(14):1088–93.
17. Jeremic D, Zivanovic Macuzic I, Vulovic M, Stevanovic J, Radovanovic D, Varjadic V, et al. ACE/ACTN3 genetic polymorphisms and athletic performance of female soccer players`. *Rev Bras Med do Esporte [Internet].* 2019;25(1).
18. Clos E, Pruna R, Lundblad M, Artells R, Maffulli N. ACTN3's R577x Single Nucleotide Polymorphism Allele Distribution Differs Significantly in Professional Football Players According to their Field Position. *Med Princ Pract.* 2020;30(1):92–7.

Podkrajšek, T.: Nogometašica, kakšen je pa tvoj gen za hitrost?
Raziskovalna naloga, OŠ Dob, 2021

11. PRILOGE

Tabela 5: Anketa za raziskavo "Gen za hitrost pri slovenskih nogometašicah"

OSEBNI PODATKI	
Ime in priimek sodelujoče igralkе v raziskavi	
Datum rojstva	
Elektronski naslov za pošiljanje rezultatov	
Telesna višina (cm)	
Telesna teža (kg)	
Kronične bolezni	
Znana kronična bolezen mišic v družini (navedite vrsto bolezni in bližnjega sorodnika, kjer je bolezen odkrita)	
PODATKI GLEDE AKTIVNEGA TRENIRANJA NOGOMETA	
Naziv nogometnega kluba, kjer sem članica	
Trajanje aktivnega treniranja nogometa	
Igralni položaj pri nogometu	
Pogostost športnih poškodb (navedite število poškodb na leto in vrsto poškodbe)	
Leto 2020	
Leto 2019	
Leto 2018	
Leto 2017	
Rezultat zadnjega testiranja nogometnih motoričnih sposobnosti*	
Leto testiranja:	
Šprint 20 m (S20M)	
Skok v daljino z mesta (SDM)	
Trajajoči sem – tja tek – (Beep test) (TST)	

* v primeru, da podatkov ne vem, se strinjam, da jih posreduje trener kluba, pri katerem treniram.

Datum: _____ Podpis preiskovanke/starša ali skrbnika: _____