

УДК 577.17

АНАЛИЗ АУТОСОМНОГО ДНК-ПОЛИМОРФИЗМА КОРЕННОГО РУССКОГО И УКРАИНСКОГО НАСЕЛЕНИЯ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ**ANALYSIS OF AUTOSOMAL DNA POLYMORPHISMS NATIVE RUSSIAN AND UKRAINIAN POPULATION BELGOROD REGION****Н.А. Рудых, С.С. Сиротина, В.И. Евдокимов, И.В. Батлуцкая, И.Н. Сорокина
N.A. Rudykh, S.S. Sirotina, V.I. Evdokimov, I.V. Batlutskaya, I.N. Sorokina***Белгородский государственный национальный исследовательский университет
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85**Belgorod National Research University Russia, 308015, Belgorod, Pobedy St., 85**E-mail: rudyh@bsu.edu.ru*

Аннотация. В данной статье представлены результаты изучения распределения генотипов, генных частот, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности 5 полиморфных локусов (переносчика дофамина (DAT1), переносчика серотонина (hSERT), минисателлита D1S80, фенилаланингидроксилазы (WNTR – PAH) и аполипопротеина-В (ApoB)). Проведенный нами анализ распределения генных, генотипических частот и гетерозиготности по 44 аллелям 5 аутосомным ДНК-маркерам свидетельствует о значимой вариабельности данных показателей в популяциях Белгородской области. В большинстве случаев эмпирическое распределение фенотипических частот по рассматриваемым системам удовлетворительно соответствует теоретическому их ожиданию при равновесии Харди-Вайнберга.

Resume. This article presents the results of studying the genotype distributions of gene frequencies, observed and expected heterozygosity 5 polymorphic loci (the dopamine transporter (DAT1), serotonin transporter (hSERT), minisatellite D1S80, phenylalanine hydroxylase (WNTR - PAH) and apolipoprotein-B (ApoB)). Our analysis of the distribution of gene, genotype frequencies and heterozygosity of 44 alleles 5 autosomal DNA markers indicates significant variability of these parameters in populations of the Belgorod region. In most cases, the empirical distribution of phenotypic frequencies for the system in question satisfactorily complies with the theoretical expectation of the Hardy-Weinberg equilibrium.

Ключевые слова: полиморфные ДНК маркеры, наблюдаемая гетерозиготность, ожидаемая гетерозиготность, генофонд, Белгородская область.

Keywords: polymorphic DNA markers, observed heterozygosity, expected heterozygosity, gene pool, Belgorod region.

Введение

Исследования, связанные с анализом происхождения и эволюционной истории популяций человека, в настоящее время являются наиболее актуальными в популяционной генетике. Данные о структуре генофондов современных популяций могут отражать основные микроэволюционные процессы в историческом прошлом этих популяций [Алтухов, 2004]. Для решения этих вопросов используются разные маркеры (иммуно-биохимические [Лепендина, 2008, 2010], физиологические, квазигенетические [Сорокина, 2010]. В последние годы все большее число исследователей в области популяционной генетики отдают предпочтение молекулярно-генетическим маркерам [Рудых, 2013]. Это связано с тем, что информационное содержание ДНК значительно выше белкового, поскольку классические маркеры отражают не весь геном, а лишь структурные гены (кодирующие участки). Кроме того ДНК маркеры определяются путем прямого анализа самой ДНК, а не путем анализа результатов функционирования ДНК (в случае использования классических маркеров), а техника исследований маркеров ДНК сводится практически к одному методу – полимеразной цепной реакции. Важное достоинство ДНК маркеров – разнообразие их типов, каждый из которых обладает своими достоинствами, недостатками и значимостью для популяционной генетики [Балановская, 2006].

В связи с этим нами проведено изучение генетической структуры белгородской популяции по 5 аутосомным ДНК локусам (переносчика дофамина (DAT1), переносчика серотонина (hSERT), минисателлита D1S80, фенилаланингидроксилазы (WNTR – PAH) и аполипопротеина-В (ApoB)).



Материалы и методы

Основным объектом исследования явилось население Белгородской области. Выбор Белгородской области в качестве объекта исследования обусловлен тем, что ее территория является исконным ареалом проживания русских, население области формировалось за счет миграционных потоков различных территориальных групп русских. Кроме того, территориально Белгородская область расположена на стыке России и Украины и ее население исторически формировалась в XVI-XVII вв. под значимым влиянием как русского, так и украинского этносов.

В качестве объектов исследования были выбраны Прохоровский, Красненский (изучалось русское население), Грайворонский и Красногвардейский (изучалось украинское население) районы Белгородской области.

Общий объем выборки составил 382 человека. Из которых 298 коренных русских, проживающих в Прохоровском (146 человек) и Красненском районах (152 человека) Белгородской области; 84 коренных украинцев Красногвардейского (42 человека) и Грайворонского (42 человека) районов Белгородской области. Средний возраст изученного населения составил 49.11 лет. Материалом для лабораторного исследования послужила венозная кровь. Общий объем полученного образца составил 8-9 мл. Анализ молекулярно – генетических маркеров проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров [Ахметова, 2000, Галеева и др., 2002, Das et al, 2004, Renges et al, 1992].

Таблица
Table

Праймеры, использованные для анализа полиморфных локусов ДНК
The primers used for the analysis of polymorphic loci of DNA

| Название локуса | Последовательность праймеров |
|-----------------|--|
| DAT1 | F: 5'-TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG-3' R: 5'-CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG-3' |
| hSERT | F: 5'-GTCAGTATCAACAGGCTGCGAG-3' R: 5'-TGTTCCTAGTCTTACGCCAGTG-3' |
| D1S80 | F: 5'-GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG-3' R: 5'-GTCCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTT-3' |
| VNTR-PAH | F: 5'-AGATTTTAAATGTTCTACCCGCC-3' R: 5'-CTTGGAAACTAAGAATCCCATC-3' |
| ApoB | F: 5'-ATGGAAACGGAGAAATTATG-3' R: 5'-CCTTCTCACTTGGCAAATAC-3' |

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA for Windows 6.0» и «Microsoft Excel 2007».

Результаты и обсуждение

Полиморфизм минисателлита в гене переносчика дофамина (DAT1). В целом у населения Белгородской области обнаружено 6 генотипов, из которых наиболее распространены гомозиготы 10/10 (по 10 повторов мотива 40 пн) - 59.3%. Вторым по частоте был гетерозиготный генотип 9/10 (31.6%). Частота гомозигот по аллелю с 9 единицами повтора составляет 6.91%. Гетерозиготный генотип 10/11 выявлен только в Красненском районе, а генотип - 8/10 в Прохоровском районе. В среднем по области их частота составила 1.39% и 1.37%, соответственно. У украинцев Белгородской области частоты генотипов распределяются следующим образом: 10/10 – 64.71%, 9/10 – 25.88%, 9/9 – 4.71%, 10/11 – 3.52%, 9/11 – 1.17%. Различий в распределении генотипов по локусу DAT1 между русским и украинским населением области не обнаружено. Во всех изучаемых районах Белгородской области наблюдаемое распределение генотипов соответствует ожидаемому при равновесии Харди – Вайберга ($\chi^2=0.518 - 3.99, p>0.05$).

При анализе аллельного полиморфизма локуса DAT1 обращает на себя внимание преобладание аллеля с 10 единицами повтора во всех исследованных районных популяциях. Частота данного аллеля в целом по Белгородской области составила 0.761, при вариабельности от 0.734 в Прохоровском районе (русские) до 0.810 среди украинцев Красногвардейского района. Вторым по концентрации был аллель, содержащий 9 единиц повтора. Его частота составила 0.243 у русских и 0.182 у украинцев Белгородской области. Редкий аллель с 11 единицами повтора идентифицирован в Красненском (русские) и Красногвардейском (украинцы) районах (0.007 и 0.048, соответственно). В Прохоровском районе был также выявлен аллель с 8 единицами повтора с частотой 0.003.

Русское и украинское население Белгородской области по распределению аллелей локуса DAT1 не отличаются.

Концентрация аллеля DAT1*10 у русских Белгородской области (в среднем 0.751) соответствует данным по «среднерусской» популяции (0.760), ($\chi^2=0.052$, $p>0.05$)

Уровень межпопуляционной генной дифференциации по данному локусу среди русского населения области составляет $G_{ST} = 0.0015$.

Полиморфизм минисателлита в гене серотонинового транспортера (hSERT). Изучение распределения VNTR-17 генотипов, показывает, что в Белгородской области наиболее часто встречается гетерозиготный генотип 10/12 (49%). Вторым по распространенности оказался генотип 12/12 - 34.9%. Концентрация генотипа 10/10 составила 13.49%. Редкие генотипы 9/10 и 9/12 встречались с частотой 1.17% и 1.37%, соответственно. В популяциях русских Белгородской области наблюдаемое распределение генотипов соответствует ожидаемому при равновесии Харди – Вайберга ($\chi^2=1.208 - 1.153$ $p>0.05$), тогда как в украинских популяциях наблюдается отклонение от равновесия Харди-Вайнберга за счет увеличения гетерозигот ($\chi^2=8.12$ $p<0.05$, $H_e=0.60$, $H_e=0.46$, $t=2.32$).

При изучении аллельного полиморфизма выявлено три аллеля VNTR-участка 2-го интрона транспортера серотонина, содержащих 9, 10 и 12 копий повторов, соответственно. Самым частым во всех популяциях оказался аллель, содержащий 12 единиц повтора. В целом по области его частота составила 0.60 при вариабельности от 0.576 в Красненском районе до 0.651 в Грайворонском районе. Концентрация данного аллеля у русских (0.588), и украинцев (0.647) Белгородской области достоверно не различалась ($\chi^2=1.006$, $p>0.05$). Вариабельность частоты аллеля с 10 единицами повтора составила от 0.337 в Грайворонском районе до 0.414 в Красненском районе. Редкий аллель с 9 единицами повтора был выявлен во всех изученных популяциях с частотой 0.013 у русских Белгородской области и 0.012 у украинцев.

Следует отметить, что частота аллеля hSERT*12 у русских Белгородской области (0.588) полностью согласуется со «среднерусским» показателем (0.590), ($\chi^2=0.001$, $p>0.05$)

Уровень межпопуляционной генной дифференциации по данному локусу среди русского населения области составляет $G_{ST}=0.0008$.

Полиморфизм минисателлита в гене фенилаланингидроксилазы (VNTR-PAH). При анализе характера распределения VNTR генотипов гена ПАГ в популяциях Белгородской области обнаружено 18 генотипов, среди которых чаще всего выявляются следующие генотипы: 380/530 (24.51%), 380/380 (14.52%), 530/530 (12.25%), 500/530 (10.54%) и 380/500 (8.83%). При сравнении в целом русского и украинского населения области в распределении генотипов локуса VNTR - PAH достоверных отличий не выявлено. Во всех изучаемых районах наблюдаемое распределение генотипов соответствует ожидаемому при равновесии Харди – Вайберга ($\chi^2=4.46 - 12.26$ $p>0.05$).

В целом в Белгородской области обнаружено семь различных аллелей данного полиморфного участка. Выявленные фрагменты включают аллели размером 380, 440, 470, 500, 530, 560 и 650 пн. Среди изученных популяций наиболее часто встречаются аллели 380 и 530. Частота аллеля 380 колеблется от 0.331 в Красненском районе до 0.410 в Грайворонском районе. Вариабельность аллеля 530 следующая: наименьшая его концентрация наблюдается в Красногвардейском районе (0.283), а наибольшая - в Грайворонском районе (0.423). Существенно реже в белгородской популяции выявляются аллели 500 (в целом по области 0.145) и 560 (в целом 0.100). Русское и украинское население области по распределению аллелей данного локуса достоверно не отличается.

Следует отметить, что частоты аллелей гена VNTR – PAH у русских Белгородской области соответствуют аналогичным показателям по «среднерусской» популяции: 380 – 0.363, 530 – 0.360, 500 – 0.134, 560 – 0.101 ($p>0.05$).

Уровень межпопуляционной генной дифференциации по данному локусу среди русского населения области составляет $G_{ST} = 0.0011$.

Полиморфизм минисателлита D1S80. Анализируя характер распределения генотипов минисателлита D1S80 среди населения Белгородской области можно отметить, что всего обнаружено 54 генотипа. Самыми частыми во всех районных популяциях были генотипы 18/18, 18/24 и 24/24. Частота встречаемости гетерозиготного генотипа 18/24 была наибольшей и равняется 18.59% у русских и 23.84% у украинцев при вариабельности от 16.27% в Грайворонском районе до 31.7% в Красногвардейском районе. Вторым по распространенности среди населения был гомозиготный генотип 24/24 (12.19% в целом по области) с вариабельностью от 9.02% в Красненском районе до 23.25% в Грайворонском районе. Гомозиготный генотип 18/18 в целом по области встречается с частотой 9.48% при незначительной вариабельности по районам от 6.97% до 12.1%. (Грайворонский и Красногвардейский район, соответственно). Во всех изучаемых районах Белгородской области наблюдаемое распределение генотипов соответствует ожидаемому при равновесии Харди – Вайберга ($\chi^2=13.89 - 54.65$, $p>0.05$).

Во всех исследованных популяциях в распределении аллелей можно выделить два мажорных аллеля с 18 и 24 единицами повтора. Причем частота аллеля содержащего 24 единицы повтора является наибольшей во всех изученных районах. В целом по области она составляет 0.373, при



изменчивости от 0.340 в Красненском районе до 0.430 в Грайворонском районе. Концентрация аллеля, содержащего 18 единиц повтора колеблется от 0.210 в Грайворонском районе до 0.366 в Красногвардейском районе. В целом по области частота аллеля 18 равняется 0.271. Следующие ранговые места по распространенности занимают аллели, содержащие 28, 31, 22 и 25 единиц повтора. Достоверных отличий в распределении частот аллелей локуса D1S80 между русскими и украинцами Белгородской области не выявлено.

Частоты аллелей D1S80*18 и D1S80*24 у русских Белгородской области (0.267 и 0.357, соответственно) согласуются с данными по «среднерусской» популяции (0.273 и 0.317, соответственно, $p > 0.05$).

У украинцев Белгородской области частота аллеля D1S80*24 (0.423) достоверно выше его распространенности в «среднеукраинской» популяции (0.329) ($\chi^2=12.197$, $p < 0.05$).

Уровень межпопуляционной генной дифференциации по данному локусу среди русского населения области составляет $G_{ST} = 0.0015$.

Полиморфизм минисателлита в гене аполипопротеина В (ApoB). При изучении генотипического разнообразия населения Белгородской области по локусу ApoB выявлено 58 различных генотипов. Генотип 36/36 встречался чаще других (22.28%). Его частота варьировала от 15.38% в Красногвардейском районе до 27.65% в Прохоровском районе. Вторым по распространенности оказался генотип 34/36 (17.82%), частота которого колебалась от 5.12% в Красногвардейском районе до 21.73% в Красненском районе. Далее по распространенности идет гетерозиготный генотип 30/36 (7.52%), частота встречаемости которого варьировала от 5.05% в Красненском районе до 15.38% в Красногвардейском районе. Следующие ранговые места по частоте занимают генотипы 34/34, 32/36, 36/38, концентрация которых составила 7.24%, 5.01% и 3.89%, соответственно. Следует отметить, что частота генотипа 34/34 у русского населения Белгородской области (5.1%) достоверно ниже чем у украинского населения (15%), ($\chi^2=7.79$ $p < 0.05$). Распространенность остальных генотипов не превышала 3.0% и варьировала от 0.27% до 2.5%. Во всех исследованных популяциях наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2=23.63 - 55.40$, $p > 0.05$).

Самым частым во всех исследованных популяциях Белгородской области был аллель, содержащий 36 единиц повтора (0.439). Его распространенность варьировала от 0.346 в Красногвардейском районе до 0.479 в Прохоровском районе. Частота второго по распространенности аллеля, содержащего 34 единицы повтора, была наименьшей в Прохоровском районе (0.163), а наибольшей в Грайворонском районе (0.379), при среднем значении по Белгородской области 0.226. Следующие ранговые места по распространенности занимают аллели, содержащие 30 и 32 единицы повтора. Аллель с 30 единицами повтора встречался во всех исследованных популяциях с довольно высокой частотой от 0.058 в Красненском районе до 0.167 в Красногвардейском районе, при среднем значении по области 0.078. Вариабельность аллеля, содержащего 32 единицы повтора, составила от 0.024 в Грайворонском районе до 0.077 в Красногвардейском районе (средняя частота аллеля ApoB*32 равнялась 0.055). Достоверных отличий в распределении частот данных аллелей локуса ApoB между русскими и украинцами Белгородской области не выявлено.

Частоты аллелей ApoB 30, 32 и 34 у русских Белгородской области (0.068, 0.057 и 0.203, соответственно) согласуются с их концентрацией в «среднерусской» популяции (0.068, 0.052 и 0.254, соответственно) ($\chi^2=0.0005-1.865$, $p > 0.05$). Наряду с этим установлено, что распространенность аллеля 36 у русских Белгородской области (0.459), достоверно выше аналогичного показателя по «среднерусской» популяции (0.381) ($\chi^2=3.941$ $p < 0.05$). Распределение аллелей ApoB 30, 32, 34 и 36 у украинцев Белгородской области (0.113, 0.050, 0.306 и 0.369, соответственно) согласуется с данными по «среднеукраинской» популяции (0.067, 0.057, 0.267 и 0.373, соответственно) ($\chi^2=0.0005 - 1.274$, $p > 0.05$).

Уровень межпопуляционной генной дифференциации по локусу ApoB у русских жителей области составляет $G_{ST}=0.0037$.

Таким образом, проведенный анализ распределения генных, генотипических частот и гетерозиготности по 44 аллелям 5 аутосомным ДНК-маркерам свидетельствует о значимой вариабельности данных показателей в популяциях Белгородской области.

Установлено, что, во-первых, частоты всех изученных аллелей среди русского и украинского населения области соответствуют изменчивости этих аллелей в восточнославянском генофонде.

Во - вторых, частоты аллеля ApoB* 36 среди русского населения области достоверно выше «среднерусских» показателей, а концентрация аллеля D1S80*24 у украинцев области превышает его распространенность в «среднеукраинской» популяции.

В - третьих, русское и украинское население Белгородской области по частотам 44 аллелей 5 аутосомных ДНК маркеров статистически достоверно не отличаются.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РГНФ № 15-16-31003 «Изучение истории формирования населения Белгородской области».

Список литературы References

- Алтухов Ю.П. 2004. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М., Наука, 619.
- Altuhov Ju.P. 2004. Dinamika populjacionnyh genofondov pri antropogennyh vozdeystvijah [Dynamics of population gene pools at anthropogenous influences]. М., Nauka, 619. (in Russian)
- Ахметова М.В., Викторова Т.В., Э.К. Хуснутдинова Э.К. 2000. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма VNTR аллелей фенилаланингидроксилазы у народов Волго-Уральского региона. Генетика.36 (8): 1161-1165.
- Ahmetova M.V., Viktorova T.V., Je.K. Husnutdinova Je.K. 2000. Molekuljarno-geneticheskij analiz polimorfizma VNTR allelej fenilalaningidroksilazy u narodov Volgo-Ural'skogo regiona [The molecular and genetic analysis of polymorphism of VNTR of alleles of a fenilalaningidroksilaza at the people of the Volga-Ural region]. Genetika.36 (8): 1161-1165. (in Russian)
- Балановская Е.В. 2006. Русский генофонд. Взгляд в прошлое. М., Луч. 415.
- Balanovskaja E.V. 2006. Russkij genofond. Vzglyad v proshloe [Russian gene pool. Flashback]. М., Luch. 415. (in Russian)
- Галеева А.Р., Гареева А.Э., Юрьев Е.Б., 2002. Оценка VNTR-полиморфизма в генах переносчиков серотонина и дофамина у мужчин с опийной наркоманией. Молекулярная биология. 36 (4): 593-598
- Galeeva A.R., Gareeva A.Je., Jur'ev E.B., 2002. Ocenka VNTR-polimorfizma v genah perenoschikov serotoina i dofamina u muzhchin s opijnoj narkomaniej [VNTR polymorphism assessment in genes of carriers of serotonin and dopamine at men with opium drug addiction]. Molekuljarnaja biologija. 36 (4): 593-598(in Russian)
- Лепендина И.Н., Балановская Е.В., Чурносков М.И. 2008. Генофонд населения Белгородской области. Распределение иммунобиохимических маркеров. Генетика. 44 (4): 543 – 557.
- Lependina I.N., Balanovskaja E.V., Churnosov M.I. 2008. Genofond naselenija Belgorodskoj oblasti. Raspredelenie immunobiohimicheskikh markerov [Gene pool of the population of the Belgorod region. Distribution of immunobiochemical markers]. Genetika. 44 (4): 543 – 557. (in Russian)
- Лепендина И.Н., Чурносков М.И., Артаментова Л.А., Ищук М.А., Тегакко О.В., Рудых Н.А. 2010. Аутосомный ДНК-полиморфизм населения Центрального Черноземья России. Медицинский академический журнал. 10 (5): 62-63.
- Lependina I.N., Churnosov M.I, Artamentova L.A., Ishhuk M.A., Tegako O.V., Rudyh N.A. 2010. Autosomnyj DNK-polimorfizm naselenija Central'nogo Chernozem'ja [Autosomal DNA polymorphism of the population of the Central Black Earth of Russia]. Rossi Meditsinskij akademicheskij zhurnal. 10 (5): 62-63. (in Russian)
- Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. 2002. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы. М. Наука. 261.
- Limborskaja S.A., Husnutdinova Je.K., Balanovskaja E.V. 2002. Jetnogenomika i genogeografiya narodov Vostochnoj Evropy [Ethnogenomics and genogeografiya of the people of Eastern Europe]. М. Nauka. 261. (in Russian)
- Сорокина И.Н., Лепендина И.Н., Рудых Н.А., Верзилина А.В., Чурносков М.И. 2010. Фамилии как квазигенетические маркеры при популяционно-генетических исследованиях. Научные ведомости БелГУ. Серия медицина. Фармация. 22 (93) (12): 72-79.
- Sorokina I.N., Lependina I.N., Rudyh N.A., Verzilina A.V., Churnosov M.I. 2010. Familii kak kvazigeneticheskie markery pri populjacionno-geneticheskikh issledovanijah [Surnames as quasigenetic markers at population and genetic researches]. Nauchnye vedomosti BelGU. Serija medicina. Farmacija. 22 (93) (12): 72-79. (in Russian)
- Рудых Н.А., Евдокимов В.И. 2013. Применение аутосомных ДНК маркеров для описания структуры генофонда популяций человека. Научные ведомости БелГУ. Серия медицина. Фармация. 11 (154) (22): 172-178.
- Rudyh N.A., Evdokimov V.I. 2013. Primenenie autosomnyh DNK markerov dlja opisanija struktury genofonda populjacij cheloveka [Application the autosomnykh of DNA of markers for the description of structure of a gene pool of human populations]. Nauchnye vedomosti BelGU. Serija medicina. Farmacija. 11 (154) (22): 172-178. (in Russian)
- Renges H.H., Peacock R., Dunning A.M. 1992. Genetic relationship between the 3'-VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphisms: Haplotype analysis in individuals of European and South Asian origin. Ann. Hum. Genet. 56: 11-31.
- Das B., Seshadri M. 2004. Genetic variability at the D1S80 minisatellite: predominance of allele 18 among some Indian populations. Ann. Hum. Biol. 31 (5): 541-553.