
**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ИННОВАЦИОН РИВОЖЛАНИШ
ВАЗИРЛИГИ**

**ИЛМ-ФАН ВА ИННОВАЦИОН
РИВОЖЛАНИШ**

**НАУКА И ИННОВАЦИОННОЕ
РАЗВИТИЕ**

**SCIENCE AND INNOVATIVE
DEVELOPMENT**

3

2018

Тошкент

УДК: 575.174.015

**ЎЗБЕКИСТОН ПОПУЛЯЦИЯСИДА Y-ХРОМОСОМА МИКРОСАТЕЛЛИТ
ЛОКУСЛАРИНИНГ ҲОЛАТИ ВА АСИМПТОТИК ЎЗГАРУВЧАНЛИКНИ ТЕКШИРИШ**

**МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ Y-ХРОМОСОМЫ И АНАЛИЗ ЕЕ
АСИМПТОТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ УЗБЕКИСТАНА**

**MICROSATELLITE POLYMORPHISM OF Y-CHROMOSOME AND ANALYSIS ITS
ASYMPTOTIC BEHAVIOR IN THE POPULATION OF UZBEKISTAN**

**Курганов Сардарходжа Каримович, Ахмедова Дилобар Шухратовна,
Норматов Асилбек Эрмухаммадович, Тошева Динара Музрафовна,
Саитова Нийёра Собиржановна**

Лаборатория судебно-биологической экспертизы ДНК человека, Республиканский центр судебной экспертизы им. Х. Сулаймоновой при Министерстве юстиции Республики Узбекистан

Аннотация. Ушбу мақолада генетик операторни мутация эҳтимолиги инобатга олинмаган ҳолда 17 та Y-STR локусларда (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 ва DYS448) учрайдиган аллеллар частоталари динамик траекторияси $\omega(x^0) = \{x^0, Vx^0, V^2 x^0, \dots\}$ ўрганилди.

Таянч тушунчалар: Y-хромосома, Y-STR, микросателлар, гаплотип, Ўзбекистон аҳолиси.

Аннотация. В этой работе изучено предельное поведение траекторий $\omega(x^0) = \{x^0, Vx^0, V^2 x^0, \dots\}$ генетического оператора для 17 Y-STR локусов (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 и DYS448) аллелей без расчета возникновение мутаций для популяции.

Ключевые слова: Y-хромосома, Y-STR, микросателлиты, гаплотип, население Узбекистана.

Annotation. In this paper, the limiting behavior of trajectories $\omega(x^0) = \{x^0, Vx^0, V^2 x^0, \dots\}$ of the genetic operator for 17 Y-STR loci (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 and DYS448) alleles without calculating the occurrence of mutations for the population.

Key words: Y chromosome, Y-STR, Microsatellites, Haplotype, Uzbekistan population.

Введение

Вопросы изучения популяции человека, происхождения, родства и исторического развития всегда были в центре внимания популяционных генетиков. Для решения данных вопросов необходимо исследовать большое число полиморфных признаков в популяциях и эндотерриториальных группах. Основной задачей популяционной генетики является изучение особенностей геномного полиморфизма и геномного разнообразия на разных уровнях популяционной системы населения

– отдельных популяций, этносов, эндотерриториальных общностей. Огромное множество полиморфных маркеров, выявленное при расшифровке генома человека, является мощным инструментом для анализа генофонда, его основных характеристик, динамики, истории и географии.

Население Узбекистана представляет исключительный интерес, так как данная популяция обладает достаточно сложной генетической структурой, что связано, по-видимому, со сложной

историей ее формирования, особенностями брачных связей на протяжении длительного отрезка времени, различиями социальной ориентации, хозяйственно-культурного уклада жизни этого народа и другими факторами. В настоящее время в литературе отсутствуют данные о генетической структуре популяций данного региона.

На сегодняшний день стало возможным получение новой информации о генофонде, генетическом происхождении и родстве популяции узбеков, на основе анализа по проведенным исследованиям Y-хромосомы.

До настоящего времени популяции данного региона изучены по ряду биохимических маркеров, однако генетическая структура населения региона в целом остается неохарактеризованной.

Цель работы – изучение структуры генофонда коренного населения Узбекистана по данным полиморфизма 17 Y-STR локусов в Y-хромосоме.

Материалы и методы

Сбор образцов

Отобраны образцы крови и слюны 1000 неродственных индивидов представителей узбекской популяции из 13 различных регионов Узбекистана: г. Ташкент (n=100), Сырдарьинская (n=55), Джизакская (n=80), Ферганская (n=75), Андижанская (n=85), Наманганская (n=55), Самаркандская (n=80), Кашкадарьинская (n=75), Сурхандарьинская (n=50), Бухарская (n=100), Навоийская (n=50), Хорезмская (n=97) области и Республика Каракалпакстан (n=98). Забор биологических образцов производили у неродственных индивидов, что позволяло объективно рассматривать выборку популяции. Принадлежность индивида к конкретной популяции определяли методом опроса трех поколений по отцовской линии.

Экстракция ДНК из биоматериалов

Для выделения ДНК из образцов крови и слюны применили метод экстракции органическими реагентами (фенольный метод) [1]. Образцы экстрагировали лизирующим буфером (0,01 М трис-НСl, 0,01 М ЭДТА, 0,1 М NaCl) до полного смачивания ткани. Добавляли SDS до 0,5-1% и протеиназу К до конечной концентрации 250 мкг/мл. Препараты инкубировали при 56 °С в течение 1 ч. После добавления равного объема смеси, содержащей фенол, хлороформ и изоамиловый спирт (25:24:1), содержимое пробирок перемешивали. Водную и органическую фазы разделяли путем центрифугирования при 14000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

Водную фазу переносили в чистые пробирки и повторяли экстрагирование указанной смесью.

Очистка и концентрирование ДНК спиртовым осаждением

Концентрирование образцов с большим содержанием ДНК проводилось методом этанольной преципитации [1]. После депротенинизации растворов ДНК смесью фенол-хлороформ-изоамилового спирта отбирали водный слой, и концентрирование проводили 96%-ным этиловым спиртом, добавляя 2,5 объема. Пробирки выдерживали в течение часа при –20 °С. После центрифугирования 30 минут при 14000 об/мин. Надосадочную фазу сливали и добавляли 70%-ный этиловый спирт. Центрифугировали 15 минут при 14000 об/мин. Надосадочную фазу сливали, и осадок высушивали в вакуумной центрифуге в течение 25 минут. К ДНК в виде сухого осадка добавляли по 50 мкл TE-буфера для растворения.

Определение качества и количества ДНК

Количественный анализ геномной ДНК каждого образца проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Для качественного и количественного анализа геномной ДНК были использованы тест-системы Quantifiler™ Human Male DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) [2].

Проведение ПЦР – амплификации

Типирование образцов ДНК проводили в полилокусном формате с использованием системы энзиматической амплификации Y-filer PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) [5]. Для обеспечения успешной амплификации для каждой реакции мультиплексной амплификации использовали от 0,5 до 1 нг геномной ДНК.

Проведение фрагментного анализа

Далее проводили фрагментный анализ на автоматизированном аппаратно-программном комплексе 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Размеры амплифицированных фрагментов геномной ДНК определяли с использованием внешних стандартов молекулярных масс путем компьютерной интерпретации «Data Collection Software v3.0». С помощью специального программного обеспечения «GeneMapper ID-X» получили спектрограммы (графическое изображение) гаплотипов, состоящие из специфического набора номеров аллелей для каждого объекта в пределах семнадцати локусов.

Статистический анализ

Генетические характеристики микросателлитного разнообразия оценивались по ряду показателей (табл. 1, 2). Генное разнообразие (D) для отдельных локусов рассчитано по формуле: $D = n / ((n-1)(1 - \sum p_i^2))$, где n – размер выборки, p – частота аллеля. Микросателлитная изменчивость оценивалась по двум показателям – гаплотипическому разнообразию и дисперсии микросателлитных

повторов. Дисперсия (s^2) рассчитывалась по каждому локусу, а затем как средняя арифметическая для всех 17 локусов. Гаплотипическое разнообразие (HD) рассчитано по формуле, аналогичной формуле расчета генного разнообразия, где p – частота гаплотипа. Для всех этих расчетов использовалась пакеты программ из базы данных YHRD (Y-STR Haplotype Reference Database) [3, 4]

Таблица 1

Наблюдаемые частоты аллелей/генотипов локусов 8 Y-STR (DYS439, DYS635, DYS392, Y_GATA_H4, DYS437, DYS438, DYS448 и DYS385) в узбекской популяции

Локус/аллели	DYS439	DYS635	DYS392	Y_GATA_H4	DYS437	DYS438	DYS448	DYS385
8						0,0106		0,016
9	0,0047		0,0035	0,0059		0,1312		0,0095
10	0,2931		0,0366	0,0473		0,3913		0,0142
11	0,3345		0,6123	0,4149	0,0012	0,4149		0,1803
12	0,266		0,078	0,4232		0,0461		0,1005
13	0,0839		0,104	0,0993	0,0142	0,0059		0,1206
14	0,0154		0,1359	0,0095	0,6537			0,1147
15	0,0024		0,0201		0,2447			0,1123
16			0,0071		0,0863			0,0987
17			0,0024				0,0035	0,0827
18							0,0721	0,0632
19		0,0047					0,331	0,0449
20		0,0839					0,4232	0,026
21		0,2967					0,0981	0,0124
22		0,169					0,0662	0,0041
23		0,2943					0,0059	
24		0,117						
25		0,0319						
26		0,0024						
Разнообразие генов (D)	0,725	0,7759	0,5886	0,6373	0,5058	0,6561	0,693	0,8936

Таблица 2

Наблюдаемые частоты аллелей/генотипов локусов 8 Y-STR
(DYS456, *DYS389I*, *DYS390*, *DYS389II*, *DYS458*, *DYS19*, *DYS393* и *DYS391*)
в узбекской популяции

Локус/аллели	DYS456	<i>DYS389I</i>	<i>DYS390</i>	<i>DYS389II</i>	<i>DYS458</i>	<i>DYS19</i>	<i>DYS393</i>	<i>DYS391</i>
8								
9								0,0567
10								0,6537
11		0,0035				0,0024	0,0189	0,2766
12		0,1312					0,3002	0,013
13	0,0165	0,6111			0,0012	0,0757	0,5437	
14	0,091	0,2423			0,0284	0,331	0,117	
15	0,5508	0,0118			0,2021	0,318	0,0201	
16	0,2411				0,2825	0,2128		
17	0,0839				0,2695	0,0579		
18	0,0165				0,1241			
19			0,0177		0,0638	0,0024		
20					0,0248			
21			0,0177		0,0024			
22			0,0969		0,0012			
23			0,2766					
24			0,2813					
25			0,2884					
26			0,0201					
27			0,0012	0,0177				
28				0,0851				
29				0,3475				
30				0,3121				
31				0,1773				
32				0,0567				
33				0,0012				
34				0,0024				
35								
Разнообразие генов (D)	0,6233	0,5511	0,7516	0,7405	0,7867	0,7359	0,6005	0,4934

Моделирование

Проведено моделирование картины вариабельности коренной популяции Узбекистана. Проанализированы результаты исследования популяции с целью установления её смешанного характера. В ходе исследования была использована модель бесполой генетических операторов, основанная на

теории квадратичных стохастических операторов, сформулированной С.Н. Бернштейном (Bernstein, 1924) [6], которые можно использовать для прогнозирования состояния вариабельности популяции. Моделирование картины рассчитано по формуле:

$$x'_k = \alpha_k x_k \quad \text{где коэффициент } \alpha_k \text{ находится в следующем виде } \alpha_k = \left[1 - \sum_{i=1}^n (x_i - x_k)x_i \right], \quad k = 1, \dots, n,$$

где n – размер выборки, x изучаемый ген, i – частота аллеля. По модели поведения проведенных траекторий: $\omega(x^0) = \{x^0, Vx^0, V^2x^0, \dots\}$ для каждой локуса аллелей.

Для наглядности приведем полученные дан-

ные изменения частоты только лишь для наиболее встречаемого и редкого для узбекской популяции локуса DYS456, а для остальных локусов приведем лишь результат (табл. 3).

Таблица 3

Изменение частоты аллелей DYS456 локуса

Аллель	F0	F1	F2	F3	F4
13	0,0165	0,010545515	0,005711	0,002287	0,000508
14	0,091	0,064938259	0,0387	0,016775	0,003968
15	0,5508	0,646262056	0,760757	0,878957	0,965591
16	0,2411	0,208232578	0,15393	0,084456	0,025694
17	0,0839	0,059276077	0,03499	0,015037	0,003531
18	0,0165	0,010545515	0,005711	0,002287	0,000508

Как видно из таблиц, в локусе DYS456 выявляемость аллели 15 с течением времени повышается, т.е. его доля в популяции возрастает, а в локусе DYS389I с течением времени также повышается частота распространения аллели 13 и остальных 5 локусов (DYS393, DYS391, DYS392, DYS437, DYS448) также подчиняются тем же принципам.

В локусе DYS389II распространенность двух аллелей 29, 30 повышена над остальными и они почти равномерно распределены. Остальные 4 локуса (DYS19, DYS635, Y_GATA_H4, DYS438) также подчиняются тем же принципам.

Также было выявлено повышение распространенности и практически равномерное распределение трех аллелей 23, 24, 25 по сравнению с другими аллелями в локусе DYS390. Для остальных 3 локусов (DYS458, DYS439, DYS385) было установлено, что они также подчиняются тем же принципам.

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ генетической изменчивости рассмотренных 17 STR локусов Y-хромосомы среди узбекского населения продемонстрировал 1000 гаплотипов, из которых 946 были уникальными (Ташкент – 100, Фергана – 73, Андижан – 84, Наманган – 36, Сырдарья – 54, Джизак – 77, Самарканд – 77, Кашкадарья – 71, Сурхандарья – 46, Бухара – 97, Навои – 48, Хорезм – 90 и Республика Каракалпакстан – 93). В 17 исследованных локусах выявлено 116 аллелей – от 4 до 15 на локус (табл.

1, 2). Разнообразие гаплотипов, рассчитанное по 17 локусам Y-STR, составляло 0,9967, а мощность дискриминации составляла 0,8990. Самый большой показатель генного разнообразия характерен для локуса DYS385 и равнялся 0,8936. По локусам DYS437, DYS389I, DYS391, DYS392 наблюдается низкий уровень изменчивости: уровень генного разнообразия по этим локусам равнялся 0,49–0,55. Также, по расчету модели бесполой генетической операторов было установлено, что в генофонде узбекской национальности наблюдается смешение видов: в локусах DYS19, DYS635, Y_GATA_H4, DYS438, DYS389II, DYS390, DYS458, DYS439 и DYS385.

Выводы

Исследования вариабельности 17 Y-STR локусов в Y-хромосоме узбекской популяции продемонстрировали высокий уровень разнообразия генофонда коренного населения Узбекистана.

Результаты, полученные по локусам DYS19, DYS635, Y_GATA_H4, DYS438, DYS389II, DYS390, DYS458, DYS439 и DYS385, показали смешанный характер популяции. Для популяционных исследований эти данные будут иметь большой интерес в изучении человеческой популяционной генетики и филогенетического анализа. Также эти результаты будут использованы в качестве опорных параметров для стандартных вероятностных расчетов при оценке результатов судебных молекулярно-генетических экспертиз.

Источники и литература

1. Altayari W. DNA Extraction: Organic and Solid-Phase. In: Goodwin W. (eds) *Forensic DNA Typing Protocols. Methods in Molecular Biology*, 2016, vol 1420. Humana Press, New York, NY.
2. Applied Biosystems. Quantifiler® Human DNA Quantification Kit and Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit User's Manual, 2012.
3. Coble M.D., Hill C. R. & Butler J. M. Haplotype data for 23 Y-chromosome markers in four US population groups. *Forensic SciInt Genet.* 2013, 7, e66-e68.
4. <https://yhrd.org/pages/tools/validator>
5. Roewer L., Geppert M. Interpretation Guidelines of a Standard Y-chromosome STR 17-plex PCR-CE Assay for Crime Casework. In: Alonso A. (eds) *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2012, vol 830. Humana Press.
6. Kurganov S.K. Evolutionary Operator for Calculating the Frequency of Occurrences of Alleles of STR Loci of the Following Generations, Taking into Account Mutations., *Modeling of Artificial Intelligence*, 2018, 5(1): 29-37.

Рецензент:

Ассесерова Ю.Ю., к.б.н., с.н.с., грантового проекта НИИ Ги ПК МЗ РУз.