Введение

В настоящее время анализ митохондриальной ДНК лежит в основе современных методов изучения эволюционных процессов. На основе данных полученных из митохондриальной ДНК было изучено генетическое разнообразие и структура популяций, реконструированы маршруты миграций, а также проанализированы связи различных коренных народов России друг с другом. Тем не менее, происхождение и расселение малых коренных народов Дальнего Востока с учетом их сложной этнической истории требует дальнейшего изучения.

Нивхи представляют собой первичный антропологический изолят, а значит и богатый источник генетической информации для реконструкции эволюционных событий на острове Сахалин, в Приморье и Приамурье. На сегодняшний день в литературе почти не освещен вопрос о происхождении, маршрутах миграции нивхов и контакты с другим народами, вопреки их глубокой истории и богатейшему культурному наследию. Актуальность данной работы определяется и тем, что нивхи непрерывно теряют свою генетическую идентичность и подвержены ускоренной ассимиляции, утрачивая свое культурное наследие.

Объектом исследования является популяция нивхов острова Сахалин. Предмет исследования – генетическое разнообразие нивхов острова Сахалин.

Цель настоящей работы – исследовать изменчивость митохондриальной ДНК у нивхов Сахалина для выяснения генетической истории коренных обитателей Дальнего Востока.

Были сформулированы следующие задачи:

1. Выяснить состав и происхождение материнских филетических линий данной популяций;
2. Определить время коалесценции для материнских линиджей;
3. Оценить вклад других малых коренных народов в генетическую историю нивхов

По итогам работы получены новые данные, касающиеся генетического разнообразия коренных жителей Дальнего Востока, определено время дивергенции основных характерных для нивхов мтДНК-гаплогрупп, а также зафиксирована генетическая связь нивхов с древними образцами представителей охоткой культуры. Полученные результаты могут найти широкое применение в популяционной биологии, антропологии и гуманитарных дисциплинах, направленных на изучение коренных народов Дальнего Востока.

Для написания данной работы сотрудниками лаборатории было проведено две экспедиции (в 1991 и 2016 г.) для сбора образцов крови нивхов о. Сахалина. Пробоподготовка ДНК для секвенирования, частичный филогенетический анализ был самостоятельно произведен студентом.

**Обзор литературы**

**1. Преимущества использования митохондриальной ДНК для анализа эволюции**

К настоящему моменту самым надежным способом определения генетического разнообразия является определение нуклеотидной последовательности ДНК. В генетической генеалогии помимо анализа полногеномных данных разработаны методы анализа двух основных видов генетических маркеров (маркеры ДНК Y-хромосомы и мтДНК).  Y-хромосома наследуется исключительно по отцовской линии (от отца сыновьям), а мтДНК — по материнской линии (от матери всем детям).

Митохондриальная ДНК человека – кольцевая, двухцепочечная молекула, скорость мутирования которой превышает скорость мутирования ядерной ДНК в 10-20 раз (Wallace et al., 1987). Скорость накопления мутации обуславливается отсутствием защитных гистонов у мтДНК, неэффективной системой репарации и присутствием свободных радикалов, образующихся в процессе окислительного фосфорилирования (Ingman et al, 2000). Таким образом, разнообразие мтДНК позволяет получить большее количество информации о недавних эволюционных событиях, чем ядерная ДНК такой же длинны. В мтДНК высокая скорость мутации может давать и селективное преимущество одних гаплотипов перед другими. Так, наличие консервативных замен в мтДНК людей высоких широт дают основания полагать, что эти варианты гаплогрупп позволили адаптироваться к холодовому стрессу, что дало толчок для распространения определённых мтДНК-линий (Wallace, 2015)

Малый размер молекулы, наследование лишь по материнской линии без рекомбинации и наличие гипервариабельных регионов делает митохондриальную ДНК широко распространенным инструментом для анализа эволюционных процессов. Еще один плюс анализа мтДНК –поддержание потомками одного варианта мтДНК (1/4 эффективной популяции от аутосомного). Именно за счет этого малые народы и племена частично или полностью изолированные от своих соседей, сохранили свой митохондриальный генофонд с момента первоначального расселения человека по всему Земному шару.

Тем не менее, возникают и трудности анализа, заключающиеся в высокой вероятности возникновения гомоплазии, которые препятствуют достоверной реконструкции эволюционных событий. Материнское наследование мтДНК считается неоспоримым, тем, не менее в ряде патологий наблюдается сбой механизмов узнавания родительских ДНК (Stoneking et al., 1996; Сummins et al., 1980).

**2. Номенклатура митохондриальной ДНК**

Существует устоявшаяся классификация последовательностей мтДНК (van Oven and Kayser, 2008; van Oven, 2010). Группы митохондриальных ДНК, имеющих общее происхождение, характеризуются общим набором мутаций и называются гаплогруппой. На сегодняшний день номенклатура гаплогрупп и субгаплогрупп представляет собой иерархическую систему. С накоплением новых последовательностей ДНК и увеличении степени их вариации, филогенетические деревья становятся все сложнее и сложнее. Так, исследуя мутации в мтДНК (Rebecca, 1987), выстроили дерево, в котором последовательности, отличающиеся одним нуклеотидом стоят рядом друг с другом, а с ростом количества мутаций расходятся на всё большее расстояние друг от друга. Все образцы ДНК сошлись к одному африканскому корню, а предполагаемая прародительница, несущая мтДНК с рассчитанной начальной последовательностью, получила название митохондриальной Евы (Cann et al., 1987). Отходящие от нее гаплогруппы обозначаются буквами латинского алфавита. Субгаплогруппы включают не только заглавные буквы латинского алфавита, а также цифры и буквы, показывающие близость образца к корню дерева.

Придерживаясь стандартной модели эволюции мтДНК человека, большинство мутаций в митохондриальном геноме зародышевых линей нейтральны (Kimura, 1968). Это позволило узнать место происхождения и маршруты расселения людей по мутациям, накопленным с момента происхождения современного человека. Достижения в области секвенирования и анализа геномных данных, позволяет рассматривать эволюционную историю на примере, как новых, так и древних образцов. Работа на стыке генетики, археологии и антропологии предоставляет нам наиболее полную информацию по распространению, путям миграции и генетической связи древних и современных людей.

**3. Африканская теория происхождения человека**

Одни из самых первых исследований мтДНК подтвердили африканское происхождение человека (Cann et al., 1987). Стоит учесть, что мтДНК отражает содержание лишь одного генетического маркера и не может представить полноценного рисунка эволюции без ядерного генома и генов Y-хромосомы. Самые ранние останки анатомически современного человека, датируемые 150-190 тыс. лет обнаружили в Эфиопии (White et al., 2003; McDougall et all., 2005). За пределами Африки образцы анатомически современных людей уже моложе и датируются в 100 тыс., лет (Grün et al., 2005) на Ближнем Востоке и 80 тыс. лет на востоке Китая (Liu et al., 2005). В пользу африканского происхождения человека говорит высочайшее генетическое разнообразие среди всех популяций на планете (Rosenberg et al, 2002). Огромное количество исследований указывают на то, что современные африканские народы сохранили предковые кластеры, которые соотносятся с регионами проживания, культурой и языком, а самые древние генетические расхождения между популяциями человека лежат к югу от Африканской Сахары (Nielsen et al., 2017). Выход людей из Африки зафиксировался в их генофонде более низким уровнем разнообразия, но более высокой степенью взаимодействия популяций друг с другом (Nielsen et al., 2017).

**4.Основные маршруты миграции человека современного антропологического вида**

Количество волн миграций и их временные неоднозначны на сегодняшний день. Сейчас исследователи придерживаются мнения, что массового и одномоментного выхода из Африки в буквальном смысле не было (Macaulay et al 2005; Forster and Matsumura 2005). Судя по данным антропологии и археологии, демографического взрыва, которой мог послужить толчком к миграциям человека не было. Процент дожития до взрослого возраста (меньше 10% особей доживало до 40 лет) у современных анатомических людей не превышает процент дожития у поздних архаичных людей, то есть увеличение численности популяции с большой вероятностью не происходило (Trinkaus et. all, 2011). На сегодняшний день отсутствует общепризнанная полноценная теория, описывающая маршруты расселения за пределами Африки. Но последние данные указывают на наличие не менее двух волн миграции человека современного вида с Африканского континента (Tempelton,2002). Первая миграция людей датируется 120 тыс. лет. Находки, подтверждающие эту теорию, были найдены на севере Израиля в пещерах Схул и Кафзех (Sankararaman et al., 2012). Обнаружены скелеты более 10 особей возрастом 120 и 80 тыс. лет. Кроме того, анализ генома папуасов Новой Гвинеей и негритосов Филиппин показал наличие более коротких геномных последовательностей африканского происхождения, которые образовались путем разбиение длинных последовательностей рекомбинациями. Время отделения данных популяций от африканских оценивается в 90 тыс. лет. В свою очередь время ответвления папуасов от евразийских популяций составили 40 тыс. лет (Pugach et al., 2012). Таким образом видно, что за долго до основной миграции людей, давшей начало современным популяциям, происходил выход людей из Африки и диффузия его по направлению к Ближнему Востоку.

После секвенирования генетически чистых коренных жителей Австралии была предложена теория двух массовых волн миграций с Африканского континента (Rusmussen et.all., 2011). Первая Южно-прибрежная волна датируется от 75-60 тыс. лет назад. С ее помощью произошло заселение побережья Индийского океана, южного побережья юго-восточной Азии, Океании и Австралии (Rusmussen et.all., 2011). Свидетельства существования ранней южной прибрежной волны подтверждают данные мтДНК. Специфичные древние гаплогруппы мтДНК: М31, М32 (Андаманские острова), М21, М22 (Малайзия) возрастом не менее 60 тыс., лет представляют собой реликты, формирование которых шло во время первой волны миграции по побережью Индийского океана (Endicott et al., 2002). Археологии не находят доказательств, подтверждающие наличие первой волны, но генетические следы достаточно яркие. Носители первой волны вступали в генетический контакт с денисовцами (Qin and Stonneking, 2015). Вторая волна миграции датируется по генетическим данным возрастом до 25 тыс. лет, хотя образцы, собранные с верхнепалеотических стоянок, увеличивают этот возраст до 40 тыс. лет. Вторая волна формировала повторное заселение побережья Евразийского континента с дальнейшим движение вглубь материка, а также обеспечивала заселение юга Европы (Rusmussen et.all.,2011).

**4. Заселение Европы**

Наиболее изученным регионом мира по маршрутам его заселения является Европа. Так, Европейские популяции включают в себя не менее трех генетических компонент, которые пришли на данную территорию в разное время (Lazaridis et al.,2014). Первые современные люди в Европе жили одновременно с неандертальцами еще 43 тыс. лет назад и оставили небольшой генетический след в генофонде современных европейцев (Günther, T. & Jakobsson, M., 2016). Первые выходцы из Африки, заселившие Европу являются палеолетическими охотниками-собирателями, широко отличавшимися друг от друга с точки зрения генетики. Около 11 тыс. лет назад, после последнего ледникового максимума, сформировался новый образ жизни на территории Европы, в основе которого лежит животноводство и собирательство. Предыдущее европейское население пережило неблагоприятные условия в рефугиумах, подвергаясь эффекту бутылочного горлышка, тем не менее не смогло повторно широко заселить Европу по неизвестным причинам. Выход из рефугиумов происходил в несколько этапов и люди, вышедшие из них позже всех, имели явное преимущество и вытесняли ранних выходцев. Анализ древней ДНК показал, что фермеры пришли с территории центральной Анатолии, однако другие регионы Плодородного полумесяца внесли небольшой вклад в генофонд ранних Европейских фермеров. Их эффективная стратегия взаимодействия с окружающей средой, позволила широко распространится и вытеснить охотников-собирателей (Posth et al., 2016). Ранние европейцы активно мигрировали и геномные данные подтверждают их присутствие на Пиренейском полуострове 7 тыс. лет назад, а в Англии и Скандинавии около 6 тыс. лет назад (Günther and Jakobsson, 2016). Анализ генетического материала древних образцов свидетельствует о ближневосточном происхождении этих людей и сравнение с ДНК современных европейцев дает высокое совпадение. Данные миграции обуславливались движением неолитических фермеров и их ассимиляцией с местными охотниками-собирателями, а их неолитический образ жизни способствовал увеличению численности популяции (Haak et al., 2005). Третья компонента в генофонд Европейцев пришла во времена позднего неолита и раннего бронзового века. Оленеводы из Понтийско-Каспийской степи, которые участвовали в миграции около 4,5 тыс. лет назад. Эту миграцию в первую очередь связывают с завоеваниями и технологическими инновациями (верховая езда, распространение индоевропейских языков в Европе). Суммируя вышесказанное, в популяции Европейского человека генофонд включает три компоненты: материал от охотников-собирателей при реколонизации Европы после последнего ледникового максимума, Неолитические землевладельцы, мигрировавшие из Анатолии в Европу и мигранты позднего неолита и бронзового века с востока (Nielson, 2017). Эти компоненты объясняют значительную часть генетического разнообразия. Несмотря на то, что основные компоненты генофонда сформировались посредством отдельных волн миграции, последующие генетические потоки оказали большое влияние на содержание современного генетического пула.

**5. Заселение Северной Азии**

Картина заселения Сибири и Дальнего Востока, в сравнении с заселением Европы менее ясна. Отчасти, на сложность реконструкции эволюции данного региона повлиял не только контакт монголоидной и европеоидной рас, который оставил существенный отпечаток на формировании населения Евразии, но и миграционные потоки ориентированные на заселение Америки. При анализе Северной Азии фиксируется высокий уровень разнообразия мтДНК. Минимальный уровень генетического разнообразия наблюдается у Восточных Эвенков и Чукчей, что можно объяснить малочисленностью, изоляцией, инбридингом и эффектом основателя. Общность происхождения популяций Северной Азии подтверждает присутствие и широкое распространение линий крупных гаплогрупп (C, G, M, Y). Локальные кластеры формировались на основе вторичных экспансий, культурных общностей.

Сибирь, за исключением своих южных районов, исследована крайне слабо, тем не менее можно делать осторожные выводы по заселению территории на основе современных генетических данных. Заселение территории восточной Евразии связывают со второй волной миграции человека современного вида. Генетические данные, свидетельствуют о том, что эволюционные возраст групп мтДНК, имеющих место в генофонде народов Северной Азии варьирует от 2 до 40 тыс. лет. Верхняя оценка этого интервала совпадает с виденьем археологов вопроса о заселении территории Сибири в середине позднего плейстоцена (Goebel T., 1999, Pitulko et al.,2004). Древнейшие компоненты, фиксирующиеся в популяциях Северной Азии представлены гаплогруппами b4b1, b4e, b4b, помимо макрогрупп М7. Эволюционные возраст перечисленных гаплогрупп попадает в период малохетского потепления (43-33 тыс. лет назад), c которым связано заселение южного горного пояса Сибири позднепалеолетическими людьми, а также их последующее расселение. С последующим приходом периода конощельского похолодания (33-30 тыс. лет назад) наблюдалось стабилизация климата южного горного пояса Сибири и территорий северной Азии, что дало толчок к расселению палеолетических людей как на Среднесибирском плоскогорье, так и на Северо-Востоке Азии (Деренко, 2010).

Исследования показали, что расширение линий ДНК, характерных для Сибирских популяций, связана с сартанским оледенением, датируемым 22-16 тыс. лет назад и последующим за ним потеплением климата. Именно в это время возникают большинство кластеров и отдельных гаплотипов на севере и юге Сибири. С эпохи голоцена начинают своё формирование линии специфичные для генофонда современных народов Северо-Востока Азии.

Исследования подтверждают, что население северной Евразии, представляющее собой малочисленные коренные народы, проживало в относительной изоляции достаточно долгое время, в сравнении с другими этническими группами. Они представляют собой уникальную модель для изучения эволюционных механизмов, а также факторов, влияющих на нее. Коренное население Дальнего Востока еще мало изучено и представляет большой интерес, что обуславливается богатой сложной историей формирования этносов. В последнее десятилетие возрос интерес к генетическому разнообразию, межэтническим связям, формированию и происхождению популяций коренного населения северной Евразии. Наименее изучена территория острова Сахалин.

**6. Нивхи - коренное население Дальнего Востока**

В настоящей работе акцент сделан на анализ генофонда малого коренного народа нижнего течения реки Амур, прилегающих к ней районов и Сахалина – нивхов (гиляков). По итогам переписи населения 2012 года численность гиляков составляет 4652 человека http://www.gks.ru/free\_doc/new\_site/perepis2010/perepis\_itogi1612.htm­. Традиции ориентированы на добычу рыбы, промысел морских и лесных млекопитающих, собирательство таежных трав. Нивхи существенно отличаются от соседских этнических групп. Уникальный нивхский язык, непохожий ни на один другой, является генетически изолированным и лишь условно включается в группу палеоазиатских языков. Лингвисты выделяют четыре диалекта нивхского языка: амурский, восточно-сахалинский, северно-сахалинский и южно-сахалинский (Груздева, 1997). Наличие языка, столь непохожего на остальные, свидетельствует о длительной изоляции коренного народа. На протяжении истории острова Сахалин, климат и рельеф данной территории менялся. Что отражалось на передвижениях и взаимодействиях людей. 13 тыс. лет назад Сахалин отделился от Хоккайдо, а 9,5-9,8 тыс. лет назад уровень моря достиг современных отметок (Василевский, Шубина, 2008). Так, образовалась достаточно замкнутая экологическая система. Несмотря на это, изоляция Сахалина была относительной, так как узкий пролив Невельского, отделяющий Сахалин от материка, промерзает в зимнее время, что дает возможность передвижения по льду. В голоцене на передвижение людей через пролив Лаперуза указывают находки хоккайдского обсидиана на Сахалине (Василевский,2008). На сегодняшний день популяция подразделена на две группы: одна сосредоточена в дельте Амура, а другая, более многочисленная, в северной части острова Сахалин (Levin and Potapov, 1964; Black, 1988; Василевский, 2008).

Нивхов Сахалина связывают с охотской культурой, которая преобладала вдоль побережья Охотского моря в 5-13 веке (Amano, 2003). Гипотеза, что охотскую культуру представляют собой протонивхи, тесно генетически связанные с неолетическими племенами нижнего Амура, поддерживается данными археологии и этнографии (Васильевский, Голубев, 1976), (В. А. Дерюгин, 2007). Охотскую культуру связывают с наличием керамики гончарной традиции Эноура, который повсеместно имел место на острове Сахалин в 7 веке (Дерюгин, 2007).

Генетические данные демонстрируют, среди людей охотской культуры следующие гаплгруппы: Y-43.2%, G1-24.3%, N9-10.8%, A-8.1%, M7-5.4%, C3-5.4%, B5-2.7%. Основу генетического пула составляет гаплогруппа Y, которая значительно превалирует у современных Нивхов Сахалина. По данным генетического анализа можно говорить, что носители Охотской культуры имели тесные связи с жителями Амурского региона. Нивхи могут вносить одну из компонент в генетический пул Охотских людей (Sato, 2009).

Дальний Восток занимает особое положение в эволюционной истории человека. Нивхи, представляющие собой уникальный изолят, непрерывно теряют свою генетическую идентичность. В связи с этим остатки их генофондов представляют бесценный источник генетической информации, не только для анализа молекулярной эволюции популяций Дальнего Востока, но и реконструкции эволюционной истории человека как вида.

**Материалы и методы**

В настоящей работе мы анализируем разнообразие митохондриальной ДНК в популяции коренного населения Дальнего Востока – нивхов. Образцы проб цельной крови были получены от неродственных по материнской линии коренных жителей, в результате двух экспедиционных выездов. При сборе образцов также уточнялись и фамильные истории местных жителей. Сбор проводился в 1991 и 2016 году в поселках Некрасовка, Рыбновск-1, Рыбновск-2, Луполово, Рыбное, расположенных на северо-западе Сахалина и в пос. Ноглики и Вал соответственно. 59

В 2016 г. было собрано 44 образца крови нивхов Сахалин.

Геномная ДНК экстрагировалась из лейкоцитарного слоя и использованием магнитных частиц (…). Визуализировали выделенную ДНК с помощью гель-электрофореза в агарозном геле. Агарозный гель включал в себя 1% раствор агарозы в ТАЕ-буфере (40 мМ Трис-ацетат и 1мМ ЭДТА). Фрагменты ДНК выявлялись бромистым этидием (кол-во). Гель заливался в горизонтальную камеру для гель-электрофореза. В карманы застывшего геля помещали пробу предварительно смешанную с маркером (,,,).

Концентрация ДНК измерялась спектрофотометром (…). Полимеразная цепная реакция проводилась в смеси, включающую в себя: (…)

Схема полимеразной цепной реакции: 94°С – 3 мин,

Визуализация результатов ПЦР проводилась в агарозном геле при гель-электрофорезе.

Полному секвенированию митохондриальной ДНК подверглись 44 нивха.

Генотипировали ,,,