

GENETIČKI PORTRET MUŠKARACA IZ HRVATSKE U KONTEKSTU REGIONALNIH POPULACIJA

Dragan Primorac^{1,2,3,4}, Pavao Rudan^{5,6}, Lejla Kovačević^{7,8}, Damir Marjanović^{7,11}, Richard Willems¹⁰, Peter Underhill¹¹

¹Sveučilište u Splitu Medicinski fakultet i Odjel za forenzičke studije, Hrvatska

²Sveučilište u Osijeku Medicinski fakultet, Hrvatska

³Eberly College of Science, Penn State University, SAD

⁴University of New Haven, SAD

⁵Institut za antropologiju, Zagreb, Hrvatska

⁶Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, Hrvatska

⁷Institut za genetsko inženjersvo i biotehnologiju, Sarajevo, Sveučilište u Sarajevu, Bosna i Hercegovina,

⁸Farmaceutski fakultet, Sarajevo, Sveučilište u Sarajevu, Bosna i Hercegovina,

⁹Genos doo, Zagreb, Hrvatska

¹⁰Institut za molekularnu i staničnu biologiju, Sveučilište Tartu i Estonski biocentar, Estonija

¹¹Zavod za genetiku, Medicinski fakultet, Sveučilište u Stanfordu, SAD

SAŽETAK

Cilj rada: Ponuditi sažetu i jasnu interpretaciju kompleksnih znanstvenih rezultata, o genetskome naslijeđu Hrvata, a koji su dobiveni analizom uniparentalnih biljega (Y-kromosoma i mitohondrijske DNA [mtDNA], te analizom više od pola milijuna autosomalnih SNP biljega.

Metode: Tijekom proteklih 15 godina analizirali smo genetičku strukturu populacije muškaraca iz Republike Hrvatske kao i muškaraca iz Bosne i Hercegovine primjenjujući najsuvremenije tehnologije, između ostaloga i analizu tzv. *bead-array* čipovima. Dosadašnja istraživanja velikoga broja informativnih bialelnih biljega na Y-kromosomu, ali i onih pozicioniranih na mtDNA značajno su pridonijela razumijevanju hrvatske prapovijesti kao i novije povijesti, ali i povijesti naših susjeda.

U okvirima ovoga rada ukratko smo prezentirali i najnovije rezultate dobivene primjenom *whole-genome* pristupa, te ukazali na značaj ovakvog tipa analize u populacijsko-genomskim studijama. Nadalje, povukli smo paralele između ranije objavljenih rezultata analiza Y-kromosoma, i mitohondrijske DNA, s najnovijim rezultatima tzv. *whole genome* analize, točnije analize genetskih varijacija 660 000 polimorfizama unutar autosomalne DNA kako za hrvatsku tako i za okolne populacije¹.

Rezultati: Molekularno-genetska analiza Y-kromosoma i mtDNA suvremene hrvatske populacije potvrdila je izvanrednu heterogenost i kompleksnost ove populacije i podržala postavku o visokom stupnju miješanja novopridošlih doseljenika s autohtonim stanovništvom koje je već bilo prisutno u regiji. Nadalje, nakon analize 660 000

Autor za korespondenciju: Dragan Primorac, M.D., Ph.D. University of Split, Medical School, Šoltanska 2, 21 000 Split, Croatia

E-mail: draganprimorac2@gmail.com

autosomalnih biljega utvrdili smo da postoje iste zakonitosti viđene tijekom analize Y kromosoma i mt DNA.

Tijekom nedavne analize mtDNA haplogrupa (do visokog nivoa rezolucije) pokazali smo da se određen broj ispitanika ne može svrstati u niti jednu mtDNA sub-granu ili sub-haplogrupu prema referentnomu filogenetičkom stablu². To se naročito odnosi na one koji pripadaju hg H kao najučestalijoj haplogrupi na europskome kontinentu, a za koju se spekulira da joj je moguće ishodište prije otprilike 20.000-25.000 godina bilo na teritoriju jugozapadne Azije.

Zaključak: Ranija istraživanja su pokazala da populacija muškaraca iz Republike Hrvatske - kao i većina drugih europskih populacija - predstavlja iznimnu genetsku mješavinu. Više od 3/4 muškaraca iz današnje Hrvatske, vjerojatno su potomci starih Europljana, koju su došli na ove prostore prije i nakon posljednjega ledenog doba. Ostatak populacije uglavnom predstavlja potomke naroda koji su u ovaj dio Europe pristizali južno-istočnim pravcem, u posljednjih 10.000 godina, uglavnom tijekom procesa neolitizacije. Prilično smo sigurni da će nam najnovija otkrića u tehnikama tipizacije cijeloga genoma, baziranih na tzv. *čip tehnologiji*, pomoći da detaljnije razumijemo strukturu hrvatske populacije i aspekte njezine demografske povijesti. Gledano globalno, analiza autosomalne DNA nam je omogućila detaljni "scoring" genetske strukture muškaraca iz današnje Hrvatske, te ukazala na sličnosti i razlike s ostalim populacijama u regiji. Shodno tome, autosomalna analiza primjenom *genom wide* pristupa pokazala je da je na globalnome nivou hrvatska populacija genetski najsličnija svojim geografskom susjedi-ma, populacijama Bosne i Hercegovine i Slovenije, ali, isto tako, i potvrdila da je ipak najveća varijabilnost primijećena unutar vlastite populacije.

S druge strane, tipizacija mtDNA haplogrupa do visokoga nivoa rezolucije prema referentnoj nomenklaturi u filogenetičkom stablu ukazala je da se, ipak, određeni broj uzoraka ne može svrstati u odgovarajuće sub-grane. Ova konstatacija ukazuje da je vjerojatno diverzitet matrilinearnih biljega u ovom dijelu Europe specifičan za regiju, što u budućnosti može biti iznimno značajno za preciznija istraživanja mtDNA populacija cijele regije.

Ključne riječi: genetički portret Hrvata, zapadni Balkan, *genom-wide* analiza, uniparentalni biljezi

PREDGOVOR

Nedavno, nas petero: Peter Underhill (Sveučilište u Stanfordu, SAD), Richard Villems (Estonska akademija znanosti i Sveučilište Tartu, Estonija), Pavle Rudan (Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Institut za antropologiju), Damir Marjanović (Institut za genetički inženjering i biotehnologiju u Sarajevu) i ja (Sveučilište u Splitu i Osijeku te sveučilišta Penn State i New Haven, SAD), objavili smo pregledni članak u *Croatian Medical Journalu* (*Croat Med J. 2011;52:225-34*)³ u tematskomu broju posvećenomu "The Seventh ISABS Conference on Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine" kojeg tradicionalno organiziramo već punih 16 godina. Članak je objedinio naša trinaestogodišnja istraživanja ranije objavljuvana u vodećim svjetskim časopisima iz područja molekularne i populacijske genetike, poput časopisa *Science*, *American Journal of Human Genetics*, *European Journal of Human Genetics*, *Annals of Human Genetics* i ponudio odgovore na neka od pitanja koja su predmetom stoljetnih rasprava i polemika. Tijekom simpozija *Nova dostignuća hrvatskih znanstvenika iz bioinformatike i biološke fizike s naglaskom na glavne teme: genomika, proteomika i stanična dinamika* koji je u organizaciji HAZU-a održan u Zagrebu, 21. studenoga 2012. godine, prikazan je niz istraživanja hrvatskih znanstvenika, a među njima i naša prezentacija »Genetička istraživanja hrvatskog stanovništva: mitovi i znanstveni podatci«. Ovaj rad predstavlja najsazetije rezultate prikazane tijekom izlaganja, kao i smjernice naših budućih istraživanja.

Rasprava o precima suvremenih Europljana među arheolozima, antropolozima, lingvistima, genetičarima i drugim znanstvenicima traje već dugo. Zanimljivo je da određeni arheolozi koriste naziv »Stara Europa« kako bi opisali široko rasprostranjenu pred-indoeuropsku neolitsku kulturu u Europi, posebice na Balkanu, smatrajući ga sinonimom za pojmove neolitska Europa, stara Europa, te pred-indoeuropska⁴. No, ako neolitske ljude nazovemo stari Europljani, kako bismo trebali imenovati pojedince koji su lovili i preživljavali u cijeloj Europi i prije posljednjega ledenog doba? Rezultati najnovijih molekularno-genetskih analiza polimorfizama Y-kromosoma ukazuju na postojanje dvaju glavnih ogranaka unutar Europskih muškaraca: »stari Europljani« koji uključuje roditeljsku liniju koja je već postojala u Europi prije posljednjega ledenog doba i »rani farmeri« koji su stigli iz zapadne Azije, bilo kao lovci sakupljači koji su širili svoje područje u ranom post-glacijalnom dobu, ili kao pioniri farmeri s područja Plodnoga polumjeseca⁵. Osim toga, moguće je da su tragači za hranom i farmeri istovremeno migrirali u Europu tijekom ranoga neolitika. Očito, pojam stari Europljani kojeg koriste molekularni antropolozi sveobuhvatniji je i opsežniji nego kad se koristi izvan konteksta genetike.

Predmet našeg interesa tijekom posljednjih 15 godina vezan je uz razumijevanje podrijetla suvremenih Hrvata, točnije muškaraca iz današnje Hrvatske. Slična su pitanja obrađena prije 10 godina za druge Europske populacije⁶, no rasprava koja je nakon toga uslijedila nije bila tako snažna i burna poput one koja se razvila u Hrvatskoj. Reći kako niti jedna tema nije izazvala tako intenzivnu raspravu u hrvatskoj znanstvenoj javnosti u posljednjemu desetljeću kao takozvano »genetsko naslijeđe Hrvata«, nije daleko od istine. Uistinu, fascinantno je kako je jedan znanstveni rad, objavljen u časopisu *Science* 2000. godine⁷, uspio pokrenuti lavinu velikih i novih znanstvenih ideja i pristupa, ali i stvoriti podlogu za mnoge neznanstvene rasprave. Bez obzira na kojoj je populaciji analiza napravljena (hrvatskoj, bosanskoj, srpskoj, slovenskoj, ostalim europskim populacijama), gotovo svaki članak pridonio je vječnome *sudaru mišljenja* među znanstvenicima različitih znanstvenih područja, no u jednom se svi slažu, genetika je egzaktna, mjerljiva i usporediva znanost i ne dopušta neutemeljene zaključke. Svjesni smo da svaki čovjek unutar vlastitih stanica nosi dugu povijest vrste *homo sapiens* i da je ljudski genom ažurirani zapis vlastite evolucije i povijesti⁸. Ipak, moramo se upitati što se uistinu može zaključiti iz tumačenja tih poruka skrivenih unutar svakog od nas. Stoga, želimo ponuditi sažetu i jasnu interpretaciju znanstvenih podataka o genetskoj naslijeđu muškaraca iz današnje Hrvatske dobivenih tijekom posljednjih 15-tak godina.

UVOD

Genetska osnova istraživanja podrijetla naroda

Činjenica je da svaki čovjek u svojim stanicama nosi dugu povijest svojih praotaca. Ljudski genom je ažuriran zapis vlastite evolucije i povijesti, a razumijevanje suvremenih obrazaca genetskih varijacija ključno je za dobivanje uvida u povijesne demografske procese. Osnovna nasljedna materija ili DNA, koju nasljeđujemo od naših roditelja identična je u gotovo 99.9% svoje strukture kod svih ljudi, no upravo tih 0.1% koja se razlikuje od osobe do osobe, determinira genetičku osobnost svakog pojedinca. Većina naših istraživanja su provedena analizirajući muškarcu svojstven i s genetskoga aspekta gledajući vrlo postojan Y kromosom koji ukupno sadrži oko 60 milijuna parova baza. Zanimljivo je da je ovaj relativno »asocijalni« genetički entitet koji je samo u nešto manje od 5% svoje dužine podložan izmjeni genetskoga materijala sa »sestrinskim« X kromosomom. Uz to, genetski materijal Y kromosoma u istovjetnom se obliku prenosi nepromijenjen s generacije na generaciju te predstavlja idealan materijal za evolucijska istraživanja. Jedina moguća promjena unutar tog postojanoga genetskoga materijala je nova mutacija. Drugim riječima, istražujući tzv. polimorfizme (varijacije) jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism* - SNP), koji predstavl-

jaju najučestalije od svih varijacija unutar genoma (90% ukupnih polimorfizama u genomu), pokazalo se da se mogu dobiti relevantne informacije za istraživanje ljudske prošlosti, točnije za potencijalno praćenje velikih povijesnih migracijskih epizoda modernoga čovjeka (*homo sapiens*).

Veličina uzorka i interpretacija rezultata

Pitanje veličine uzorka na kojemu se analiziraju biljezi Y kromosoma u populacijskoj genetici odavno je riješeno. Pod pretpostavkom da postoji ravnomjeran odnos unutar spolova neke ciljane populacije (1:1), u toj istoj populaciji, gledajući na jedan par muškarca i žene, nalaze se četiri kopije autosoma (autosom je bilo koji kromosom izvan seta spolnih X i Y kromosoma), tri kopije X kromosoma, dvije kopije mitohondrijske DNA (mtDNA) i jedna kopija kromosoma Y (isključujući iznimno rijetke slučajeve numeričkih aberacija kromosoma). Na osnovu toga jasno je da stvarna ili efektivna veličina populacije kromosoma Y odgovara jednoj četvrtini efektivne veličine populacije analiziranoga autosoma. Sve navedeno je proisteklo iz poznatog Hardy-Winbergovog teorema koji između ostalog pretpostavlja da niti jedna populacija nije neograničeno velika, ali i iz Wright-Fisherovog modela koji ističe da u slučaju ravnomjernoga odnosa spolova unutar jedne populacije svi roditelj imaju jednaku šansu u prenošenju genetskoga materijala u sljedeću generaciju. Par navedenih genetskih postulata su osnova svega i nemoguće je baviti se populacijskom genetikom, a ne poznavati ih. Govoreći još jednostavnijim jezikom, analiza Y kromosoma zahtjeva četiri puta manji uzorak nego što je to slučaj kod analize tzv. autosomalnih biljega. Tako je veličina od 50 uzoraka pri analizi Y kromosoma usporediva s veličinom od 200 uzoraka pri analizi autosomalnih biljega.

Genetička struktura različitih etničkih grupa konzistentno pokazuje da se, zapravo, najveći dio genetičke raznolikosti pojavljuje unutar vlastitih etničkih skupina. U posljednjem desetljeću, podaci generirani primjenom *high-throughput* tehnologije genotipizacije omogućili su populaciono-genetičkim istraživanjima dva osnovna pravca: karakterizaciju genetičke strukture humanih populacija, te istraživanje znakova prirodne selekcije na molekularnom nivou. Sve generirane informacije omogućavaju krucijalnu viziju za razumijevanje i fenotipskoga diverziteta humanih populacija. Globalno, i unutar kontinentalnih populacija, ali isto tako i na subkontinentalnom nivou, geografska se rasprostranjenost populacija pokazala vodećim parametrom u oblikovanju genetičke varijabilnost koja se danas može analizirati u sklopu različitih populaciono-genetičkih istraživanja. Tijekom posljednjih nekoliko stoljeća dogodile su se velike seobe naroda, te masivne trans-kontinentalne migracije, što je u velikoj mjeri dovelo do velikoga miješanja među populacijama.

Genom-Wide analize (GWA), također, u znanstvenoj literaturi poznate kao *Whole-Genom Association* (WGA) studije, generalno, podrazumijevaju istraživanje velikoga broja genskih polimorfizama kod različitih individua, da bi se utvrdilo, na koncu, je li i jedna od tih varijanta povezana sa iskazivanjem pojedinih osobina kod individua unutar jedne populacije, ili pak među različitim populacijama. S obzirom da se genetska struktura svake analizirane populacije veže za njezinu historijsku prošlost, kao i geografsku poziciju, neophodno je kod ovakvih tipova studija uvijek imati u vidu populacijsku stratifikaciju, kao jedan od bitnih parametara za generiranje vjerodostojnih rezultata.

Ljudske su populacije vrlo zanimljive za različite aspekte istraživanja, upravo zbog činjenice što su podijeljene na različite skupine, plemena, klanove, etničke grupe, nacije i sl. S druge strane, nasljeđivanje pojedinih segmenata genoma kod analiziranih osoba uvjetovano je i raznim povijesnim zbivanjima. S obzirom da analiza mtDNA kao i analiza Y kromosoma omogućuje segmentarna istraživanja, GWA analiza, koja je uzela maha u posljednjih par godina rapidnim razvojem tehnologije sekvenciranja i genotipizacije, pridonosi razumijevanju procesa vezanih za cjelokupni genom, što u mnogome širi nove spoznaje o povijesti i podrijetlu pojedinih populacija, te njihovomu miješanju⁹.

Nedvojbeno je da su do sada najzanimljivije i najkorisnije informacije dobivene analizom dvaju uniparentalnih biljega unutar našega genoma: Y kromosoma i mitohondrijske DNA (mtDNA). Nekoliko značajki čine Y kromosom korisnim i zanimljivim filogenetskim alatom. Ovaj kromosom je haploidan i prisutan samo kod muškaraca. Prenosi se s oca na sina, a njegov najveći dio (preko 95%) isključen je iz mejotičke rekombinacije. Sve promjene nastaju samo putem mutacija. Ljudski Y kromosom pokazuje izvanredan broj i raznolikost različitih klasa genetskih biljega¹⁰.

Slične značajke vrijede i za mtDNA. Filogenetski odnosi između mitohondrijskih haplotipova u uzorku odražavaju maternalne genealoške odnose među promatranim pojedincima, te je tako na temelju mutacija kodirajuće i kontrolne regije izgrađeno i filogenetsko stablo ukupne varijacije ljudske mitohondrijske DNA^{2,11,12}.

Vrlo zanimljiva i informativna studija atraktivnoga naslova u vidu pitanja »Odakle je došao europski čovjek?« objavljena je prije nekoliko godina⁵. Obim (50 stranica) i kvaliteta podataka (broj referenci, mapa i drugih slika) čine taj rukopis vrijednim respektabilnoga poglavlja u knjizi. Stoga smo za polazište našega »putovanja genetskim nasljeđem Hrvata« odlučili koristiti kratak pregled tog rukopisa. Međutim, pokušali smo, također, ažurirati obrasce filogeografske diverzifikacije unutar Y kromosom haplogrupa E i R i njihove revizije^{13,14,15}.

Prema Wiik 2008, gotovo svi europski muškarci mogu biti raspoređeni unutar jedanaest Y haplogrupa (abecednim redom: E3a, E3b, G, I1a, I1b1-P37, I1b2-M223, J2, N2, N3, R1a, R1b.)⁵. Migracije muškaraca, prema klasifikaciji Y haplogrupa, događale su se u nekoliko faza. Prva migracija, podijeljena u 10 faza, predstavlja najranija kretanja predaka europskoga čovjeka. Devet od tih faza dogodilo se prije posljednjega glacijalnog maksimuma (PGM). Wiikova priča započinje prije 50.000 godina, kada su svi preci europskoga čovjeka još uvijek živjeli u sjeveroistočnoj Africi unutar jedne rodovske zajednice (klana). Dvadeset tisuća godina kasnije prvi pripadnici vrste *homo sapiens* (klan R1) stižu na europsko tlo (područje stepa između Urala i Kaspijskoga jezera), preko Euroazije. Oko 5.000 godina kasnije prvi su se ljudi naselili na Iberskome poluotoku i obalama Atlantika (klan R1b). Gotovo u isto vrijeme novi Klan stigao je s Bliskoga istoka, preko Anadolije, na područje Balkana. Ova je mala grupa bila odgovorna za otkrivanje gotovo najvažnijega genetskog subjekta za našu priču - haplogrupe I. Vrlo brzo, nakon tog prvoga dolaska, otprilike prije 20.000 do 13.000 godina⁷, ljudske su populacije u cijeloj Euroaziji iskusile posljednje ledeno doba (posljednji glacijalni maksimum - PGM). Taj je događaj značajno smanjio teritorij pogodan za život ljudske vrste. Preci europskoga čovjeka bili su prisiljeni preživjeti unutar četiriju velikih utočišta koji su se nalazili u Ukrajini, u Iberiji, na Balkanu i vjerojatno u Sibiru. Ove izolirane lokacije minimizirale su protok gena i pojačale proces genetskoga drifta u oblikovanju različitih genetskih obrazaca u smislu frekvencije alela i pojave novih regionalno specifičnih mutacija. Ovi inkubatori genetske raznolikosti kasnije su za vrijeme PGM postali regije iz kojih je krenula rekolonizacija Europe tijekom post-glacijalnoga perioda i Holocena (10.000 godina). Istovremeno, s ovim post-PGM migracijama, otprilike prije 10.000 godina, novi su klanovi sa Srednjega i Bliskoga istoka i Anadolije stigli u Grčku i proširili se duž obala Sredozemlja. Oni su sa sobom donijeli pripitomljavanje divljih životinja i biljaka dijeleći svoje znanje s autohtonim stanovništvom, što ujedno predstavlja početak poljoprivrede i stočarstva u Europi.

Prema ovom izvoru, moglo bi se zaključiti da se na osnovi povijesti Y kromosoma sve europske muškarce može svrstati unutar dviju glavnih grana: »stari Europljani« s roditeljskim linijama (haplogrupa I, moguće G i N) koje su već bile prisutne u Europi prije PGM i koje su preživjele to razdoblje u četiri europska refugija i »rani farmeri« (haplogrupe E3b, J2, neke podskupine G) koji su još uvijek bili na »ljetovanju« u Aziji i Africi za vrijeme PGM, a u Europu su stigli tijekom neolitizacije.

Međutim, dok je Wiikov rad dosta dobro sažeo ranije publikacije o modernoj Europi, postalo je jasnije da bi ranije postavljen model⁷, koji navodi da je haplogrupa R paleolitska, trebalo

revidirati. Najnovija istraživanja na tom polju^{13,14} navode da je prisustvo haplogrupe R, bilo R1a-M17 ili R1b-M269, u Europi noviji (nakon PGM) događaj (prije ≤ 15.000 godina). Prema tim nedavnim nalazima, moguće je da su se ove R linije počele širiti iz zapadne Azije u Europu ubrzo nakon povlačenja ledenih pokrivača, ali prije dolaska poljoprivrede u jugoistočnu Europu i Kretu prije 9.000 godina. Dakle, ovaj model sugerira da su prije 15.000 do 10.000 godina Europu naseljavali mezolitski ljudi, od kojih su neki pripadali autohtonoj haplogrupi I, a neki su pripadali post-glacijalnoj invazivnoj haplogrupi R iz zapadne Azije. Tada poljoprivredna djelatnost stiže s pionirskim farmerima iz područja Plodnoga polumjeseca i biva prihvaćena od strane lokalnih stanovnika.

Zanimljivo je da Wiik⁵, uzimajući u obzir povijest Y kromosoma i poštujući postojeće europske jezične skupine, dijeli cijeli kontinent u osam zasebnih područja. Jedno od njih - Balkan - posebno je zanimljivo za našu »kroniku Y kromosoma Hrvata«. Wiik opisuje nekoliko zanimljivih Y kromosom gradijenata u ovom području: a) sjever-jug gradijent R1b u sjevernome dijelu Balkana, što je vjerojatno povezano sa širenjem zapadnoeuropskih ili iberijskih ljudi na Balkan, b) haplogrupa R1a pokazuje sjever-jug gradijent, što je vjerojatno povezano s migracijama iz euroazijskoga područja, c) vrlo visoka učestalost haplogrupe I1b1-P37 u zemljama zapadnoga Balkana koja se smanjuje u svim smjerovima, što je vjerojatno povezano s postojanjem glacijalnoga refugija i post-PGM rekolonizacije od strane starih Europljana iz tog područja, d) haplogrupa E3b pokazuje jug-sjever gradijent i sličan, ali slabiji gradijent koji se tiče haplogrupe J2, što je vjerojatno povezano s migracijama ranih farmera. Međutim, Battaglia i suradnici u svome članku¹⁵ preispituju tumačenje E3b u Europi. Čini se da su gotovo sve europske E3b zapravo nastale V13 mutacijom za koju se čini da se pojavila na Balkanu kod M78* molekularnoga pretka. Stječe se dojam da haplogrupa E-V13 ipak nije došla s Bliskoga istoka. Prema King i suradnicima njezino je prisustvo vjerojatnije posljedica grčke kolonizacije¹⁶. Važno je napomenuti da u onim područjima Plodnoga polumjeseca, gdje je nastala prva poljoprivredna djelatnost, V13 nije zabilježena. Dakle, suprotno onome što je ranije predloženo⁵, haplogrupa E3 u Europi je vjerojatno nastala kao lokalno specifična balkanska linija, vjerojatno ne prije 8.000 do 10.000 godina, a potom je, kada se uspostavio poljoprivredni uzgoj, doživjela demografski rast.

Indikativno je da Wiik prepoznaje posebnost hrvatske populacije, što je čak obrađeno u posebnome odjeljku. On je zaključio da su R1a muškarci u Hrvatsku stigli uglavnom iz Ukrajinskoga utočišta, R1b muškarci iz Iberskoga utočišta, dok je najveća učestalost haplogrupa I1b1-P37 na zapadnome Balkanu na području središnje Hrvatske, što bi se moglo opisati kao središte Balkanskoga utočišta i epicentar post-glacijalne rekolonizacije Europe iz ovoga područja. I1b1-P37 proizašla je iz haplogrupe I vjerojatno tijekom rekolonizacije. Haplogrupa I na ovo je područje stigla prije 25.000 godina s Bliskoga istoka.

Najnoviji podaci^{13,14} koji opisuju R1b-M412 linije ne podržavaju Wiikov model da je R1b u Hrvatsku došao s Iberijskoga poluotoka. Ako bi to bilo točno, današnja bi populacija u Hrvatskoj trebala imati vrlo čestu M412 mutaciju. Međutim, najnoviji podaci objavljeni od strane Myres¹³ jasno pokazuju da balkanska R1b ne nosi ovu mutaciju već prije varijantu L23 prekursora. Prema tim podacima postalo je jasnije da balkanska R1b najvjerojatnije nije došla u Hrvatsku iz Iberije, nego iz nekog nepoznatoga mjesta iz zapadne Azije, vjerojatno preko Levanta (Libanon), no neovisno od farmera. Nadalje, moguće je da su R1a-M17 linije u Hrvatsku došle iz sjevernoga dijela istočne Europe kao dio širega procesa koji je započeo s rasprostranjenjem kultura prugaste keramike tijekom bakrenoga i brončanoga doba (prije 5.200 – 4.300 godina) sve do skorijih ekspanzija Slavena (slika 1). Arheolozi se slažu da se tradicija prugaste keramike proširila iz srednje Europe prema istoku do Volge. Stoga, usredotočit ćemo se na ove zaključke kroz direktan i kratak pregled nekoliko važnih i ranijih izvješća koja je Wiik u svome preglednom članku⁵ naveo kao referentna, kao i korištenjem nekih skorije objavljenih studija^{13,14}.

NAŠI DOSADAŠNJI REZULTATI

Polazna točka

Kod nas je sve započelo objavljivanjem rada u vodećem znanstvenom časopisu, *Science*⁷ (*Semino O, Passarino G, Oefner JP, Lin AA, Arbuzova S, Beckman EL, De Benedictis G, Francalacci P, Kouvatsi A, Limborska S, Marcikic M, Mika A, Mika B, Primorac D, Santachiara-Benerecetti AS, Cavalli-Sforza LL, Underhill AP. The Genetic Legacy of Paleolithic Homo sapiens in Extant Europeans: A Y Chromosome Perspective. Science 2000; 290: 1155-1159*), kada su dvadeset i dva odabrana binarna biljega na Y kromosomu analizirana u 1.007 muškaraca iz 25 različitih europskih i bliskoistočnih geografskih regija. Pedeset i osam od tih uzoraka potjecalo je od rodbinski nepovezanih muškaraca iz Republike Hrvatske. Rezultati su pokazali da 45% analiziranih muškaraca-stanovnika današnje Hrvatske, najvjerojatnije potječe od starih Europljana koji su uglavnom preživjeli posljednje ledeno doba na području zapadnobalkanskoga utočišta. Točnije, jedinstven genetski biljeg (haplogrupa Hg I-M170), za koju se pretpostavlja da je nastala na Europskomu tlu i to od potomaka ljudi koji su došli sa Srednjega istoka prije 25.000 godina ima najvišu učestalost na teritoriju današnje Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Kao što je rečeno ranije, isti se taj biljeg kasnije širio prema sjeveru tako da je danas vrlo učestao u središnjoj Europi.

Na osnovu rezultata objavljenih u *Science*, ali i nekih ranije dobivenih rezultata, predložili smo tri moguća vala migracija u Europu: prvi se val migracija zbio prije 40.000, drugi prije više od 22.000, a treći prije 9.000 godina. O svemu tome bit će više riječi u daljnjem tekstu. Nadalje, u radu smo naveli da je više od 80% europskih muškaraca naslijedilo Y DNA (s različitom učestalošću pojedinih haplogrupa) od paleolitskih predaka koji su živjeli na teritoriju Europe prije 25. 000 do 40. 000 godina.

Nedugo nakon objavljivanja našeg rada u časopisu *Science* slični rezultati su dobiveni analizom 457 hrvatskih muškaraca kad je utvrđeno da gotovo 49% ispitanih hrvatskih muškaraca pripada haplogrupi I (*Y chromosomal heritage of Croatian population and its island isolates. Barac L, Peričić M, Klarić IM, Rootsi S, Janičijević B, Kivisild T, Parik J, Rudan P, Villems R, Rudan P. Eur J Human Genet 2003;11 (7)535-42*)¹⁷.

Nastavljajući naša istraživanja u Bosni i Hercegovini (*Marjanovic, D., Fornarino, S., Montagna, S., Primorac, D., Hadziselimovic, R., Vidovic, S., Pojskic, N., Battaglia, V., Achilli, A., Drobnic, K., Andjelinovic, S., Torroni, A., Santachiara-Benerecetti, A. S., Semino, O. The Peopling of Modern Bosnia- Herzegovina: Y-chromosome Haplogroups in the Three Main Ethnic Groups. Annals of Human Genetics. 2005; 69(6):757-63*)¹⁸, gdje smo u studiju uključili 256 muškaraca (90 Hrvata, 81 Srba i 85 Bošnjaka) s više od 50 različitih lokacija u Bosni i Hercegovini dobiveni su rezultati koji slijede logiku dvaju ranije spomenutih radova. Uzimajući u obzir paleolitsko podrijetlo haplogrupe I i njezinu ekstremno visoku učestalost, u prosijeku za sve tri glavne etničke skupine današnje Bosne i Hercegovine oko 50% ili točnije za bosanske Hrvate 71.1%, Bošnjake 43.5% i bosanske Srbe 30.9%, očit je utjecaj zapadnobalkanskoga utočišta na genetski fond muškaraca današnje Bosne i Hercegovine. Što se pak Hrvatske tiče, a na osnovu svih dosadašnjih rezultata može se zaključiti da većina hrvatskih muškaraca (»vlasnika« haplogrupe I) potječe od ljudi koji su zakoračili na europsko tlo prije 25.000 godina i koji su preživjeli posljednje ledeno doba u zapadnobalkanskomu utočištu/utočištima.

Autori poput Rootsi¹⁹, nakon dodatne analize više od 1.000 Hg I - Y kromosoma na uzorku 60 populacija, otkrili su nekoliko pod-klastera u Europi, s divergentnom geografskom distribucijom. Autori ukazuju na to da haplogrupa I pruža odličan zapis preglacijalne diferencijacije iza koje je uslijedila geografska izolacija te kasnija postglacijalna ekspanzija i širenje. Pojava I1a u Skandinaviji u skladu je s postglacijalnom rekolonizacijom sjeverozapadne Europe iz najvjerojatnije Ukrajinskoga ili eventualno Iberijskoga utočišta. Ekspanzija I1b* u širem jadranskome području

sugerira da su demografski procesi započeli iz utočišta koji se nalazio u toj regiji, dok I1c pokriva širok prostor u Europi s najvišim frekvencijama u sjeverozapadnoj Europi.

Interesantno je da je Iberijsko utočište, o kojem je donedavno raspravljano kao o mogućem izvoru migracija prema Balkanskomu poluotoku, danas stavljeno pod znak pitanja (što smo posebno istakli u našem radu) i da znanost još uvijek traži odgovore vezano za njegovo postojanje i ulogu u ponovnom naseljavanju Europe. Najnovija istraživanja ukazuju da su preci današnjih muškaraca iz Hrvatske, a za koje se vjerovalo da su došli iz područja Iberijskoga poluotoka, ustvari ljudi koji su neovisno o neolitskim migracijama, i nešto prije njih (prije 10.000 godina), na ovo područje došli iz pravca Bliskoga istoka (na slici je migracija prikazana plavom strjelicom). Danas vjerujemo da je Hg R1b s još uvijek neke nepoznate lokacije iz zapadne Azije, vjerojatno preko Levanta (Libanon), stigla na naš teritorij, no neovisno od neolitske migracije.

Neolitik i migracije ranih poljodjelaca

Jedno od najvažnijih pitanja koja su desetljećima mučila znanstvenike je pitanje »Jesu li prvi poljodjelci koji su tijekom velikih migracija došli sa Srednjega istoka potpuno potisnuli autohtono/starosjedilačko stanovništvo i naselili njihova područja (*demska difuzija* ili "demic diffusion model") ili se pak nisu događale nikakve drastične i velike migracije, već su se starosjedoci/lokalni lovci-sakupljači postupno učili kulturi nužnoj za razvoj ratarstva kroz interakcije s populacijama koje su to znanje imale (*cultural diffusion model*)?« Drugim riječima, »Je li moguće danas pronaći neke signale interakcije-autohtonoga/starosjedilačkoga Mezolitičkoga čovjeka i neolitskih došljaka koji su donijeli poljoprivrednu kulturu i kolonizirali područje Jugoistočne Europe?«. Naš rad objavljen u *European Journal of Human Genetics* po prvi je put pružio »molekularno-genetički odgovor« na to temeljno pitanje (Battaglia V, Fornarino S, Al-Zahery N, Olivieri A, Pala M, Myres NM, King RJ, Rootsi S, Marjanovic D, Primorac D, Hadziselimovic R, Vidovic S, Drobic K, Durmishi N, Torrioni A, Santachiara-Benerecetti AS, Underhill PA, Semino O. *Y-chromosomal evidence of the cultural diffusion of agriculture in southeast Europe. Eur J Hum Genet. 2008; 1-11.*)¹⁵.

Vratimo se kratko razdoblju koje je prethodio neolitiku, tom iznimno važnom dijelu ljudske povijesti. Moderni čovjek prolazeći kroz razdoblje paleolitika (prehistorijski period, koji je započeo prije 2.6 milijuna godina, a završio prije 10.000 godina), kao razdoblje u kojem su živjeli lovci-sakupljači hrane, nastavlja svoju evoluciju kroz prijelaznu fazu mezolitika (prijelazno razdoblje prema neolitiku). No tek u razdoblju neolitika (započinje oko 9.500 godina prije Krista) doživljava ogroman kulturološki iskorak koji je rezultirao razvojem ratarstva i stočarstva. Neolitik kojeg zovemo i »Novo kameno doba« predstavlja posljednji period Kamenoga doba, i jedno je od najvažnijih razdoblja u povijesti čovjeka, jer upravo u neolitiku čovjek od klasičnog lovca postaje postupno zemljoradnikom, bavi se ribarstvom i pripitomljava divlje životinje. Sve to je uvjetovalo prekretnicu u povijesnomu razvoju modernoga čovjeka nakon čega su se započele osnivati veće zajednice, a čovjek više nije ovisio isključivo o ulovu. Zalihe žita mogle su mu osigurati preživljavanje i u »gladnim godinama«, što je do tada bilo nezamislivo. Čovjek postaje proizvođač hrane, uzgaja životinje, i sve to stvara osnovu za drastičnim povećanjem populacije koja je tada živjela na zemlji. Prema dostupnim podacima nedvojbeno je da je neolitik započeo pred približno 10.000 godina oko Jerihona u dolini rijeke Jordan, a kasnije u Turskoj, Mezopotamiji, Siriji.

Ranija su istraživanja pokazala da Hg J-M241 odgovara neolitskim širenjima populacija s područja istočne Sahare i Bliskoga istoka (Turska, istočne obale Mediterana, Egipat), dok su najvjerojatnije Hg E-V13 i Hg I-M-423 vezane za mezolitičke lovce-sakupljače koji su vjerojatno bili starosjedoci na područjima današnje Hrvatske, Bosne i Hercegovine i okolne regije.

Znakovito je da je mala učestalost Hg I-M423 i Hg E-V13 na područjima koja se smatraju ishodištem neolitika i to u području Bliskoga istoka (Anatolija - današnja Turska) i Srednjega istoka (Mezopotamija - današnji Irak i Sirija); Perzija; Levant (današnja Sirija, Libanon, Izrael,

Palestina i Jordan), sugeriraju da se kod Hg I-M423 i Hg E-V13 radi o haplogrupama tipičnim za mezolitičke lovce-skupljače hrane (starosjedioci sa područja današnjeg Balkana), koji nisu došli s Bliskoga istoka tijekom neolitika. Dakle, suprotno onome što je predloženo ranije, haplogrupa Hg E3b je vjerojatno nastala kao lokalno specifična balkanska linija, vjerojatno ne prije 8.000 do 10.000 godina, a potom je, kada se uspostavio snažan rast poljoprivrede, doživjela demografski rast. Rezultati govore u prilog činjenici da je lokalno mezolitičko stanovništvo s biljekom I-M423 i E-V13 poznavalo osnove ratarstva i prije nego što su se dogodile sustavnije migracije dolaskom neolitika.

Rezultati naših istraživanja ukazuju nedvojbeno da su autohtoni mezolitski lovci-skupljači (starosjedioci) prihvatili agrikulturu od farmera s područja Bliskoga istoka s kojima su slučajno ili u manjoj mjeri dolazili u kontakt te da se nisu događale velike migracije/neolitska doseljavanja koja su zamijenila starosjedilačku populaciju koja je postojala prije neolitika. Dakle, preobraženi lovci-skupljači koji postupno postaju poljodjelci postaju ključni čimbenici za širenje ratarstva prema sjeveru i to kroz brojne interakcije s mezolitičkim populacijama koje su tada živjele. Oko 15% muškaraca u Hrvatskoj može s ponosom izjaviti da su njihovi muški preci »donijeli poljoprivredu« u Europu tijekom nadiranja poljodjelaca u Europu (demska difuzija).

No vrlo je zanimljivo što naši rezultati upućuju i na činjenicu da od 15 % »neolitskog gena« kojeg imaju današnji muškarci u Hrvatskoj, dio je njih stigao s područja koja se smatraju ishodištem neolitika, konkretno s Bliskoga (današnja Turska) i Srednjega istoka (današnji Irak i Sirija), Perzije i Levanta (današnji dio Sirije, dio Egipta, Libanon, Izrael, Palestina i zapadni Jordan), i to prije otprilike 9.000 godina. Drugi dio ima podrijetlo u specifičnoj liniji koja se širila grčkom kolonizacijom, potpuno neovisno o migraciji iz smjera Bliskoga istoka. Ta je linija u Europi vjerojatno nastala kao lokalno specifična balkanska linija, pred 8.000 do 10.000 godina.

Sve ovo govori u prilog vrlo kompleksnoj interakciji između farmera i lovaca-skupljača hrane radije nego velikoj migraciji zemljoradnika s područja Bliskoga istoka koja je zamijenila lokalne autohtone lovce-skupljače.

I raniji su rezultati sugerirali da se nakon širenja »agrikolturnog utjecaja« (Danilo kod Šibenika, Panonska nizina, Vinča u Srbiji) neolitska ekspanzija širila prema ostatku Europe, no ovime je prvi put to pokazano i analizom genetičkoga materijala.

Posljednja velika migracija

U članku kojeg smo objavili 2009¹⁴ i gdje smo analizirali više od 2.000 uzoraka za Hg R1a (*Underhill PA, Myres NM, Rootsi S, Metspalu M, Zhivotovsky LA, King RJ, Lin AA, Chow CE, Semino O, Battaglia V, Kutuev I, Järve M, Chaubey G, Ayub Q, Mohyuddin A, Mehdi SQ, Sengupta S, Rogaev EI, Khusnutdinova EK, Pshenichnov A, Balanovsky O, Balanovska E, Jeran N, Augustin DH, Baldovic M, Herrera RJ, Thangaraj K, Singh V, Singh L, Majumder P, Rudan P, Primorac D, Villems R, Kivisild T. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a. Eur J Hum Genet. 2010 Apr; 18(4):479-84.*) istaknuli smo da je većina poznatih haplogrupa vezana teritorijalno za pojedine kontinente. Iznimka tom pravilu je relativno »mlada« haplogrupa Hg R1a koja je vezana za postglacijalni period. Prisutna je od teritorija južne Azije pa sve do centralne i istočne Europe kao i područja južnog Sibira. Ishodište ove haplogrupe još nije jasno i ono što je posebno važno nismo pronašli genetski biljeg koji bi mogao razlikovati Hg R1a s ishodištem u Aziji od onoga europskoga. Ipak biljeg M458 (R1a1a7) ima znakovitu učestalost u centralnoj i istočnoj Europi i uglavnom ne prelazi granice Urala i na jugu, današnje Turske. Neke od dosadašnjih studija ukazuju da Hg R1a ima ishodište na području ili neposrednom okružju današnje Ukrajine i to prije otprilike 15.000 godina, nakon čega je vjerojatno nakon otapanja ledenjaka, iz područja Ukrajinskoga utočišta s migracijskim populacijama krenula ka novim područjima.

Prema našim rezultatima (učestalost Hg R1a1a*) među današnjim muškarcima u Hrvatskoj varira ovisno o područjima za koja su uzorci analizirani, no u prosjeku je nešto niža od 30%. Dakle oko 30 % muškaraca iz današnje Hrvatske ima pretke koji su na ova područja stigli iz sjevernoga dijela istočne Europe, uglavnom s područja današnje Ukrajine i okolnih država, i to kao dio šireg migracijskoga procesa koji je počeo otapanjem ledenjaka prije 5.200 godina, a trajao sve do seobe Slavena između 5. i 8. stoljeća.

Međutim, nije moguće točno odrediti koliki postotak današnjeg humanoga genofonda u Hrvatskoj pripada isključivo tzv. slavenskim migracijama i zbog toga je neophodno izbjegavanje donošenja brzopletih zaključaka. Zanimljivo je i da je učestalost haplogrupe Hg R1a1a najviša u kontinentalnom dijelu Hrvatske, te na otoku Krku, dok je od analiziranih populacija iz današnje Hrvatske najniža na otoku Hvaru.

Rezultati istraživanja mtDNA

MtDNA dokazi, odnosno prisustvo određenih mitohondrijalnih linija upućuju na činjenicu da je naseljavanje zapadne i centralne Europe krenulo iz franko-kantabrijskog utočišta odnosno s Iberijskoga poluotoka²⁰. Također, sugerira se²¹ da se iz područja tzv. Istočnoga utočišta (vjerojatno područje Ukrajine) dogodilo širenje populacija s dominantnom haplogrupom U4 koja je tipična za područje današnje istočne Europe. Ipak, općenito gledajući, istočno Europski mtDNA bazen se ne razlikuje drastično od onog u zapadnoj i centralnoj Europi, iako je tu evidentan broj mtDNK haplogrupa koje su, inače, specifične za područje Kavkaza, Bliskoga istoka i centralne Azije^{22,23}. Pojednostavljeno, haplogrupa H je najučestalija u Europi, (oko 45%) i smatra se da je došla s Bliskoga istoka prije nekih 18.000 godina. Njezina starost na europskomu kontinentu se procjenjuje na 15.000 godina, što implicira da se počela širiti nakon posljednjega ledenog doba. Sestrinska haplogrupa V koja je također doživjela ekspanziju poslije posljednjega ledenog doba nastala je iz HV haplogrupe koja potječe s Istoka²⁴. Najnoviji podatci procjene starosti europskih mtDNA haplogrupa, a koja je bazirana na analizi 2.000 kompletnih mtDNA sekvenci, sugeriraju da se ekspanzija dogodila poslije posljednjega glacijalnog maksimuma u pravcu jug-zapad Europe²⁵. Starost se haplogrupa V, H1 i H3 procjenjuje na cirka 11.000-11.500 godina, što obuhvaća razdoblje mlađega drijasa, poslije kojeg su se klimatske prilike stabilizirale i slične su današnjima. Najranije studije koje su se bazirale na analizi mitohondrijalne DNK pokazale su da svi Europljani, u osnovi, pripadaju istim haplogrupama kao populacije s Bliskog istoka, što indicira da zapravo imaju zajedničkoga najranijega ancestralnog pretka. Većina europskih mtDNK haplogrupa je proizišla iz subgrane haplogrupe R, i to R0 (ranije poznata kao pre-HV), JT i U, pored triju grana makrohaplogrupe N koje su u manjini, i to N1, N2 i X²⁶. R1 i R2 subhaplogrupe koje su zapadnoeuropske relativno su rijetke na europskomu kontinentu. Studije s početka ovoga stoljeća²⁷ dokazale su, zapravo, da su sve današnje europske mtDNK haplogrupe vrlo vjerojatno proistekle direktno od autohtonoga ancestralnog pretka iz razdoblja ranoga, srednjega ili, pak, kasnoga gornjeg paleolita. Što se tiče kontribucije mtDNA haplogrupa iz razdoblja neolita, najnovija istraživanja sugeriraju da samo nekolicina mtDNA linija, i to njihovih specifičnih subgrana, potječe iz tog razdoblja prije oko 8.000 godina, kao što su J1b1, J2a1a, K2, T1a, te već spomenute, R1, R2 i N1a. Primjera radi, studije Haak-a i suradnika²⁸ sugeriraju da se linija N1a pojavila na europskomu kontinentu prije 7.000 godina, zajedno s Linearbandkeramik (LBK) grnčarijom (kulturom), a koja se veže za pojavu prvih, istinskih poljoprivrednih komuna na području Europe. Upravo su humane populacije iz tog razdoblja bile skoncentrirane na području srednjega toka Dunava, na Balkanu. Također, treba reći da je kontribucija bliskoistočnih, neolitskih linija u mtDNA bazenu Europe manja od 15%. Migracijski tok iz pravca Bliskoga istoka u pravcu sjeverozapadne Europe, kao i iz pravca jugo-zapadne Europe u pravcu sjeverne Afrike je opečaćen određenim subhaplogrupama velike i jedne od najstarije haplogrupe U, prije svega U5 granom u Europi i U6 u sjevernoj Africi²⁹. Analiza mtDNA

haplogrupa je pokazala da je disperzija anatomski suvremenoga čovjeka najvjerojatnije otpočela u gornjem paleolitu iz pravca Levanta u Europu³⁰. Osnovni, inicijalni moment za širenje populacija bila je stabilizacija klimatskih prilika. Najstarije mtDNA haplogrupe u Europi su U5 i U8. Procijenjena starost haplogrupe U5 je oko 37.000 godina, dok se pretpostavlja da se U8 na europskom kontinentu pojavila prije oko 50.000 godina. One se smatraju prvim signalom anatomski suvremenoga čovjeka (engl. AMH - *Anatomically Modern Human*) u ranom, gornjem paleolitu.

Nadalje, u jeku posljednjega ledenog doba prije 19.500-25.000 godina humane su se populacije počele intenzivno koncentrirati u utočištima na područjima jugo-zapadne Europe, duž Mediteranske obale, te, svakako na Balkanskomu poluotoku i području Levanta, s tendencijom daljeg rasta^{31,32}. Osnovni signal u suvremenomu europskom mtDNA bazenu za re-ekspanziju i ponovno naseljavanje centralne i sjeverne Europe tijekom zatopljivanja su haplogrupe H1, H3, H5 i U5b1 za koje se smatra da su potekle iz jugozapadne Europe, te se proširile poslije ledenoga doba u zapadnu, centralnu i sjevernu Europu poslije 15.000 godina²⁶.

O najbližem susjedstvu

Bosna i Hercegovina i Hrvatska susjedne su zemlje koje dijeli vrlo duga kopnena granica. Njihov međusobni geografski položaj, opsežna zajednička povijest i činjenica da Hrvati predstavljaju jedan od tri konstitutivna naroda u Bosni i Hercegovini, ukazuju da svaka populaciono-genetska analiza stanovništva Bosne i Hercegovine može dati dodatni, zanimljiv uvid i o hrvatskome stanovništvu.

Analiza varijacija Y kromosoma u tri glavne etničke skupine moderne Bosne i Hercegovine otkriva da sve tri etničke skupine iz ove zemlje (Hrvati, Srbi i Bošnjaci) nose haplogrupe koje dijele s mnogim drugim Europljanima, koje su nastale u različitim utočištima tijekom ledenoga doba u Europi (I-M170, R-M17 i RM269 s Balkana, ukrajinsko utočište), te haplogrupe za koje se smatra da su nastale u Africi (E-SRY4064) i Bliskome istoku (J-12f2) te da su stigle u Europu kroz prolongirani protok gena s Bliskoga istoka³³.

Uzimajući u obzir paleolitsko podrijetlo P37 mutacije u ovom okrugu Balkana³³ i njegovu ekstremno veliku učestalost (više od 50%), moguće je da je post-glacijalno širenje stanovništva s velikom učestalošću I-P37 iz jednoga od glacijalnih utočišta prisutnih na Balkanu odigralo veliku ulogu u naseljavanju Bosne i Hercegovine i okolnih područja, uključujući i Hrvatsku. Ovi rezultati ukazuju na to da su područja današnje Hrvatske i Bosne i Hercegovine vjerojatno bila dio balkanskoga glacijalnog utočišta. Frekvencije haplogrupe J i G zajedno iznose više od 9%, što ukazuje da 9% muškaraca iz današnje Bosne i Hercegovine vjerojatno potječe od ranih poljodjelaca. Prema prethodno navedenim podacima, E-V13 na Balkanu (14% u BiH) predstavlja lokalni biljeg koji je postojao s niskom učestalošću prije pojave poljoprivrednoga uzgoja, ali je onda jednom kada se poljoprivredna djelatnost raširila na Balkanu¹⁵ postao češći. Ovi rezultati ukazuju da je muški genofond bosansko-hercegovačke populacije više bio pod utjecajem neolitskih i post-neolitskih migracija nego što je to bio hrvatski genofond. S druge strane, relativno niske učestalosti R1a i R1b haplogrupa unutar bosansko-hercegovačke muške populacije dokazuju manje prisustvo gena iz ukrajinskoga glacijalnog utočišta nego je to slučaj u hrvatskoj populaciji za iste genetske biljege (slika 3). Analiza autosomalnih biljega je pokazala da je genetički profil bosansko-hercegovačke populacije skoro identičan genetičkomu profilu hrvatske populacije i da je u skladu s geografskim gradijentom u kontekst zapadnoga područja Balkanskoga poluotoka.

ZAKLJUČCI

Ne iznenađuje da je genetska analiza muškaraca u današnjoj Hrvatskoj potvrdila izvanrednu heterogenost i kompleksnost ove populacije i podržala postavku o visokom stupnju miješanja

novopridošlih doseljenika s autohtonim populacijama koje su već bile prisutne u regiji. Svjesni naših mogućnosti te činjenice da kao genetičari ne možemo sveobuhvatno razjasniti procese koji su se tisućama godina događali na ovim prostorima, učinili smo ono što se od nas i očekivalo, držali smo se genetike, a ostalim strukama smo ponudili naš, molekularno genetski scenarij. Sad je trenutak da znanstvenici iz drugih struka, arheolozi, antropolozi, lingvisti, i drugi uklope ovu kompleksnu priču u svoje znanstvene spoznaje, te da na kraju svi zajedno u sjecištu ovih znanstvenih spoznaja pokušamo doći do zajedničkih rezultata.

Budući da je haplogrupa R1a1a*-M17/M198 u više navrata bila predmetom javnih rasprava, još jednom se osvrćemo na naše rezultate vezane uz tu specifičnu haplogrupu. Izvorna rečenica objavljena u našem preglednom članku glasi »Nadalje, moguće je da su R1a-M17 linije u Hrvatsku došle iz sjevernog dijela istočne Europe kao dio šireg procesa koji je započeo s rasprostranjenjem tzv. "kulture vrpčaste keramike", tijekom bakrenoga i brončanoga doba (prije 5.200 – 4.300 godina) sve do skorih ekspanzija Slavena«. Općenito govoreći, moguće je da je od približno prije 5.000 godina pa sve do današnjega dana (uključujući i migraciju Slavena), haplogrupa R1a1a*-M17/M198 raznim putovima stizala na ova područja i kod muškaraca današnje Hrvatske, prisutna je u oko 30-tak % (postotak regionalno varira).

Kao što je i inače slučaj u znanosti, rješenje jednoga pitanja otvara nova pitanja, i u pravu su oni koji (se) pitaju kako sada u Hrvata povezati razmjeno tako malo Hg R1a1a*-M17/M198 (koja uključuje i genetski fond koji je pristigao migracijom Slavena) s potpunom slavenškoga jezika i kulture i koji je odnos genetike, jezika i kulture u definiranju nacionalne pripadnosti. Isto tako, druge struke koje će nadopunjavati ono što smo mi kao genetičari vrlo egzaktno prikazali, morat će voditi računa o činjenici da su se na našim (ali i na širim europskim prostorima), što silom što milom (pitanje osobnog izbora), mijenjale pripadnosti nekom narodu bez obzira na postojanost i profil njihova genetskoga materijala. Jednako tako, s velikim oprezom treba pristupiti procjeni učinka lingvističkih i genetskih (i drugih) osnova na usvajanje ili određivanje nacionalne pripadnosti! No, ta pitanja spadaju u druge grane znanosti i ne treba ih miješati s onim što smo mi u području genetike dokazali. Genetika ne istražuje pojedine nacije kao kategoriju već populacije koje žive na određenom prostoru, ali bitno pridonosi razumijevanju podrijetla naroda. Ni jedno od navedenih pitanja ne smije se politizirati, a napose ne u svrhu dnevne politike ili još gore, zbog osobnih animoziteta.

Dosadašnji rezultati istraživanja podrijetla pojedinih populacija (a s time se slaže i većina povjesničara), sugeriraju da pitanja velikih »seoba naroda« koje su dovele do istrjebljenja starosjedilaca i autohtonoga stanovništva nema znanstvenu potporu, barem ne na molekularno-genetskomu nivou. Tako je vrlo vjerojatno bilo i s autohtonim predslavenskim stanovništvom koje nije niti istrijebljeno niti izumrlo, nego je, kroz interakciju s pridošlicama, nastavilo dijeliti prostor u kojemu su nadalje zajednički obitavali. Potpuno je drugo pitanje kako opravdati postojanje književno-nacionalnih mitova ili slika u vidu umjetničkih djela koja epski prikazuju velike migracije, mitske osobe i sl. No, sve to zasigurno nije područje rada genetičara i netko drugi će trebati odgovoriti na ta pitanja.

Iz svega navedenog, očito je da populacijska genetika ponekad može dovesti do vrlo zanimljivih rezultata/predviđanja unutar analiza diferenciranih skupina stanovništva^{34,35}. Molekularno-genetska analiza genofonda moderne hrvatske muške populacije je potvrdila izvanrednu heterogenost i kompleksnost ove populacije i podržava visok stupanj miješanja doseljenika s autohtonim stanovništvom koje je već bilo prisutno u regiji. Kao što je prikazano u ovome kratkom pregledu, ranija su istraživanja ponudila genetski scenarij najvažnijih migracijskih epizoda koje su snažno utjecale na proces naseljavanja cijeloga područja suvremene Hrvatske. Većina se tih studija temeljila na istraživanju predačkoga genetskog utjecaja starih Europljana i ranih farmera na Hrvate.

S druge strane, naša najnovija populacijsko-genomska studija pokazala da je varijacija autosomalnih i uniparentalnih, *lineage*, biljega populacija zapadnoga Balkana u skladu s geografskom distribucijom analiziranih populacija. Isto tako, bez obzira što je naša nova *genome wide* studija omogućila »veći *input*« genetičkoga materijala koji je analiziran, ipak nam je uglavnom samo ukazala na jako visoku heterogenost unutar analizirane populacije Hrvata, kao i genetsku sličnosti sa susjednim populacijama.

Variranje se genetskoga profila analiziranih populacija može jednim djelom interpretirati kao prikaz kontinuiteta širenja genetskih biljega iz pravca Bliskoga istoka u pravcu zapadne i sjeverozapadne Europe preko Balkanskoga poluotoka. Tzv. *Structure like analysis* je pokazala da udio blisko-istočne i azijske ancestralne komponente opada u skladu s geografskim gradijentom, iz pravca juga prema sjeveru zapadnoga područja Balkanskoga poluotoka, što je kod populacija Bosne i Hercegovine i Hrvatske, manje izraženo, nego što je to kod ostalih zapadno-balkanskih populacija (Makedonaca, Crnogoraca, Srba i stanovništva Kosova)^{1,36}. No, ipak je analiza uniparentalnih biljega i autosomalne DNA pokazala da stanovništvo Kosova ima najveće razlike u odnosu na ostalu okolnu populaciju, što se jednim djelom može tumačiti povijesno specifičnim patrilinearnim nasljeđivanjem.

Tipizacija mtDNA haplogrupa (slika 4) do visoke rezolucije prema referentnoj nomenklaturi u filogenetičkom stablu je ukazala da se, ipak, određeni broj uzoraka ne može svrstati u odgovarajuće sub-grane. Ova konstatacija ukazuje da je vjerojatno diverzitet matrilinearnih biljega u ovom dijelu Balkanskoga poluotoka ipak specifičan za pojedine regije, što u budućnosti može biti vrlo zanimljivo u daljnjim i dubljim istraživanjima mitohondrijalnog genoma populacija zapadnoga Balkana. Naši rezultati su prvi rezultati analize mtDNA haplogrupa za populacije zapadnoga područja Balkanskoga poluotoka do krajnje rezolucije, no da bi se prethodna konstatacija zaista mogla potvrditi, potrebno je imati usporedive podatke na globalnom nivou^{1,36}.

Sukladno rezultatima prethodnih studija^{5,7,17,18} može se jasno zaključiti da većina muškaraca iz Hrvatske (»vlasnika« haplogrupe I) potječe od ljudi koji su zakoračili na europsko tlo prije 25.000 godina i preživjeli posljednji glacijalni maksimum u utočištu na zapadnome Balkanu. Analizom mtDNA i Y kromosoma s naših prostora utvrđeno je da većina biljega predstavlja genetski fond tipičan za euroazijske populacije koje su kolonizirale europski kontinent u kasnom gornjem paleolitiku.

Nadalje, nakon našeg rada objavljenog u časopisu *Science*, znanstvena zajednica je uglavnom jedinstvena u stajalištu da je mutacija M170 koja definira Hg I nastala prije otprilike 22.000 godine, najvjerojatnije na području zapadno-balkanskoga utočišta i to od potomaka ljudi koji su na taj teritorij došli sa Srednjega istoka prije 25.000 godina³⁷. Iznimno visoka učestalost te haplogrupe na teritoriju današnje Hrvatske i Bosne i Hercegovine nedvojbeno toj tvrdnji govori u prilog.

Naša su istraživanja dokazala da hrvatska populacija, kao i gotovo bilo koja druga europska populacija, predstavlja iznimnu genetsku mješavinu. Više od 3/4 današnjih hrvatskih muškaraca najvjerojatnije su potomci Starih Europljana, koju su došli na ove prostore prije i nakon posljednjega ledenog doba. Ostatak populacije uglavnom predstavlja potomke naroda koji su pristizali u ovaj dio Europe južno-istočnim pravcem, u posljednjih 10.000 godina, uglavnom tijekom procesa neolitizacije.

Literatura

1. L. Kovačević, *Univerzitet u Sarajevu*. 2012.
2. M. Oven, M. Kayser, *Hum Mutat.* **30** (2009) 386-94. www.phylotree
3. D. Primorac, D. Marjanović, P. Rudan, R. Villems, P. Underhill, *Croat Med J.* **52** (3) (2011) 225-234.
4. M. Gimbutas, *Los Angeles: University of California Press*; Reprinted 1996.
5. Wiik K, *Journal of Genetic Genealogy.* **4** (2008) 35-85.
6. G. Barbujani, G. Bertorelle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** (2001) 22-5.
7. O. Semino, G. Passarino, P.J. Oefner, A.A. Lin, S. Arbuzova, L.E. Beckman et al, *Science.* **290** (2000) 1155-9.
8. G. Chaubey, *Tartu: Tartu University Press*. 2010.
9. V. Colonna, L. Pagani, Y. Xue, C. Tyler-Smith, *Genome Biology.* **12** (2011) 234.

10. R. Kittler, A. Erler, S. Braurer, M. Stoneking, M. Kayser, *Eur. J. Hum. Gen.* **11** (2003) 304-14.
11. E. Watson, P. Forster, M. Richards, H.J. Bandelt, *Am. J. Hum. Genet.* **61** (1997) 691-704.
12. T.D. Kocher, W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo, F.X. Villablanca, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **86** (1989) 6196-200.
13. N.M. Myres, S. Rootsi, A.A. Lin, M. Jarve, R.J. King, I. Kutuev et al, *Eur. J. Hum. Genet.* **19** (2011) 95-101.
14. P.A. Underhill, N.M. Myres, S. Rootsi, M. Metspalu, L.A. Zhivotovsky, R.J. King et al, *Eur. J. Hum. Genet.* **18** (2009) 479-84.
15. V. Battaglia, S. Fornarino, N. Al-Zahery, A. Olivieri, M. Pala, N. Myres et al, *Eur. J. Hum. Genet.* **17** (2008) 820-30.
16. R.J. King, J. DiCristofaro, A. Kouvatzi, C. Triantaphyllidis, W. Scheidel, N.M. Myres et al, *BMC Evol. Biol.* **11** (2011) 69.
17. L. Barać, M. Peričić, I. Martinović-Klarić, S. Rootsi, B. Janicijević, T. Kivisild, J. Parik, I. Rudan, R. Villems, P. Rudan, *Eur. J. Hum. Genet.* **11** (2003) 535-542.
18. D. Marjanović, S. Fornarino, S. Montagna, D. Primorac, R. Hadziselimović, S. Vidović, N. Pojskić, V. Battaglia, A. Achilli, K. Drobnic, S. Andjelinović, A. Torroni, A.S. Santachiara-Benerecetti, O. Semino, *Ann. of Hum. Genet.* **69** (2005) 757-763.
19. S. Rootsi, *Documenta Praehistorica, 36 Neolithic Studies.* **16** (2009) 111-116.
20. A. Achilli, C. Rengo, C. Magri et al. (18), *Am. J. Hum. Genet.* **75** (2004) 910-918.
21. B.A. Malyarchuk, M.A. Perkova, M.V. Derenko, *Russian Journal of Genetics.* **44** (3) (2008) 344-349.
22. B.A. Malyarchuk, *Russian Journal of Genetics.* **37** (12) (2001) 1437-1443.
23. M.A. Bermisheva, K. Tambets, R. Villems, E.K. Khusnutdinova, *Molecular Biology.* **36** (6) (2002) 802-812.
24. A. Torroni, H.J. Bandelt, V. Macaulay et al. (30), *Am. J. Hum. Genet.* **69** (2001) 844-852.
25. P. Soares, A. Achilli, O. Semino, W. Davies, V. Macaulay, H.J. Bandelt, A. Torroni, M.B. Richards, *Current Biology.* **20** (2010) R174-R183.
26. A. Torroni, A. Achilli, V. Macaulay, M. Richards, H.J. Bandelt, *Trends in Genetics.* **22** (6) (2006).
27. M. Richards, V. Macaulay, E. Hickey et al. (34), *Am. J. Hum. Genet.* **67** (2000) 1251-1276.
28. W. Haak, P. Forster, B. Bramanti, S. Matsumura, G. Brandt, M. Tänzer, R. Villems, C. Renfrew, D. Gronenborn, K.W. Alt, J. Burge, *Science.* **310** (2005) 1016-1018.
29. A. Olivieri, A. Achilli, M. Pala, V. Battaglia, S. Fornarino, N. Al-Zahery, R. Scozzari, F. Cruciani, D.M. Behar, J.M. Dugoujon, C. Coudray, A.S. Santachiara-Benerecetti, O. Semino, H.J. Bandelt, A. Torroni, *Science.* **314** (2006) 1767-1770.
30. V. Macaulay, M. Richards, E. Hickey, E. Vega, F. Cruciani, V. Guida, R. Scozzari, B. Bonne-Tamir, B. Sykes, A. Torroni, *Am. J. Hum. Genet.* **64** (1999) 232-249.
31. C. Gamble, W. Davies, P. Pettitt, M. Richards, *Phil. Trans. R. Soc. B.* **359** (2004) 243-253.
32. C. Gamble, W. Davies, P. Pettitt, L. Hazelwood, M. Richards, *Camb. Archaeol. J.* **15** (2005) 193-223.
33. O. Semino, C. Magri, G. Benuzzi, A.A. Lin, N. Al-Zahery, V. Battaglia et al, *Am. J. Hum. Genet.* **784** (2004) 1023-34.
34. M. Wozniak, B. Malayarchuk, M. Derenko, T. Vaneeck, J. Lazur, P. Gomolcak, et al, *Am. J Physical. Anthropol.* **142** (2010) 540-8.
35. A. Boattini, D. Luiselli, M. Sazzini, A. Useli, G. Tagarelli, D. Pettener, *Ann. of Hum. Biology.* **38** (2009) 59-68.
36. K. Tambets, L. Kovacevic, D. Primorac, G. Lauc, A. Leskovac, Z. Jakovski, K. Drobnic, S. Kovacevic, T. Bego, E. Metspalu, D. Marjanovic, R. Villems, *ASHG 62nd Annual Meeting*, San Francisco. Abstract no: **3286**. (2012).
37. I. Martinović Klarić, *Zagreb: Sveučilišna knjižara.* 2009.

ABSTRACT

Genetic portrait of Croatian men in the context of regional populations

The latest scientific breakthroughs in the field of population genetics assert this field of science as potentially useful tool in the examination of the past human migrations. In this article we made a short overview of previously published articles (largely by our group) based mostly on Y-chromosome results. Human Y chromosome displays an extraordinary amount and variety of different classes of genetic markers. Several features promote Y chromosome as useful and interesting phylogenetic tool. It is haploid and male specific. It is passed from father to son, and for the most part (over 95% of its length) is excluded from meiotic recombination. Any changes occur only by mutation. This accumulation of sequence variation during the lineal life spans of Y-haplotypic systems provides a powerful resource for the recovery of genetic prehistory. Earlier research proved that Croatian human population, as almost any other European population represents remarkable genetic mixture. More than 3/4 of the recent Croatian males are most probably the offspring from Old Europeans, which came here before and after LGM.

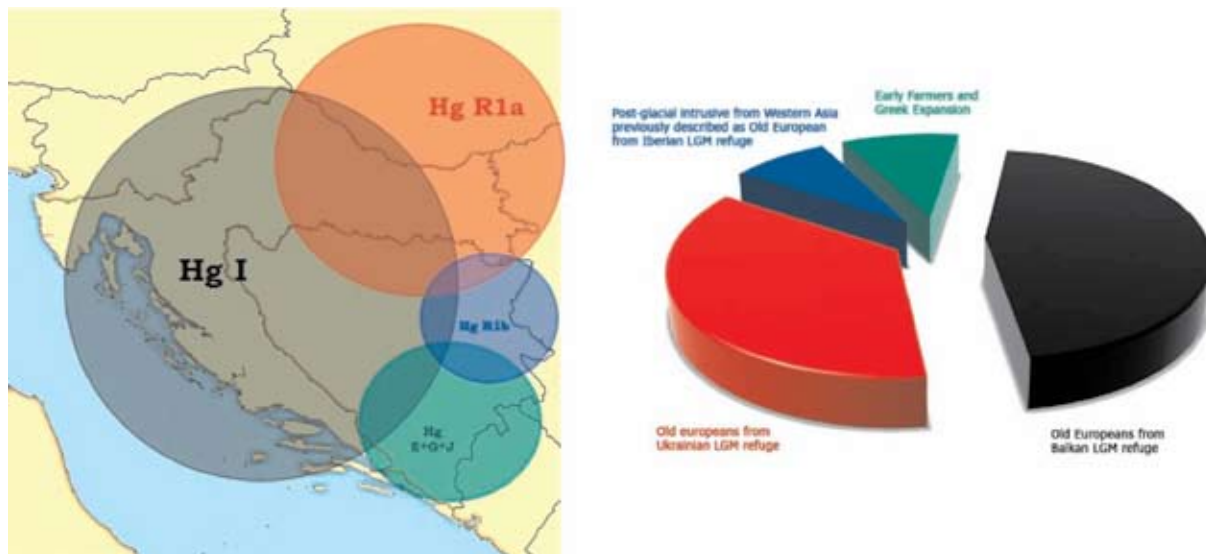
More precisely, according to the data published in our Science paper (Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE *et al.* The genetic legacy of Paleolithic *Homo sapiens* in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science* 2000;290:1155–9.) almost 45% of examined Croatians males belong to the Eu7 haplotype (synonymous with currently defined haplogroup I). In addition, almost 30% of them belong to the Eu19 (haplogroup R1a1) and around 10% to the Eu18 (haplogroup R1b). The rest of the Croatian males (approximately 15%) are divided between Eu4 (E3b), Eu9 (J2a), Eu11(G) and Eu16 (LT) haplotypes (Figure 2). When reading the manuscript it could be clearly concluded that 45% of the examined Croatians probably originate from the Old Europeans who mostly survived LGM in the Western Balkan refuge. After the climate improved, this population spread north and east. The rest of the population could be mostly recognized as the offspring of the people which were arriving in this part of Europe through the south-eastern route, within last 10.000 years, mostly during the Neolithization process. Recent study (*Whole Genome Analysis*) where we analyzed 660 000 autosomal markers confirmed our previous Y-chromosome analysis findings.

Molecular genetic analysis of genetic pool of modern Croatian male population has confirmed extraordinary heterogeneity and complexity of this population and supported high degree of mixing of the newly arrived settlers with the indigenous populations that were already present in the region. As illustrated in this short review, our earlier research offered a genetic scenario of the most important migration episodes that strongly influenced the peopling process all over the territory of modern Croatia. Most of those studies were based on the investigation of ancestral genetic impact of Old Europeans and Early Farmers on Croatians.

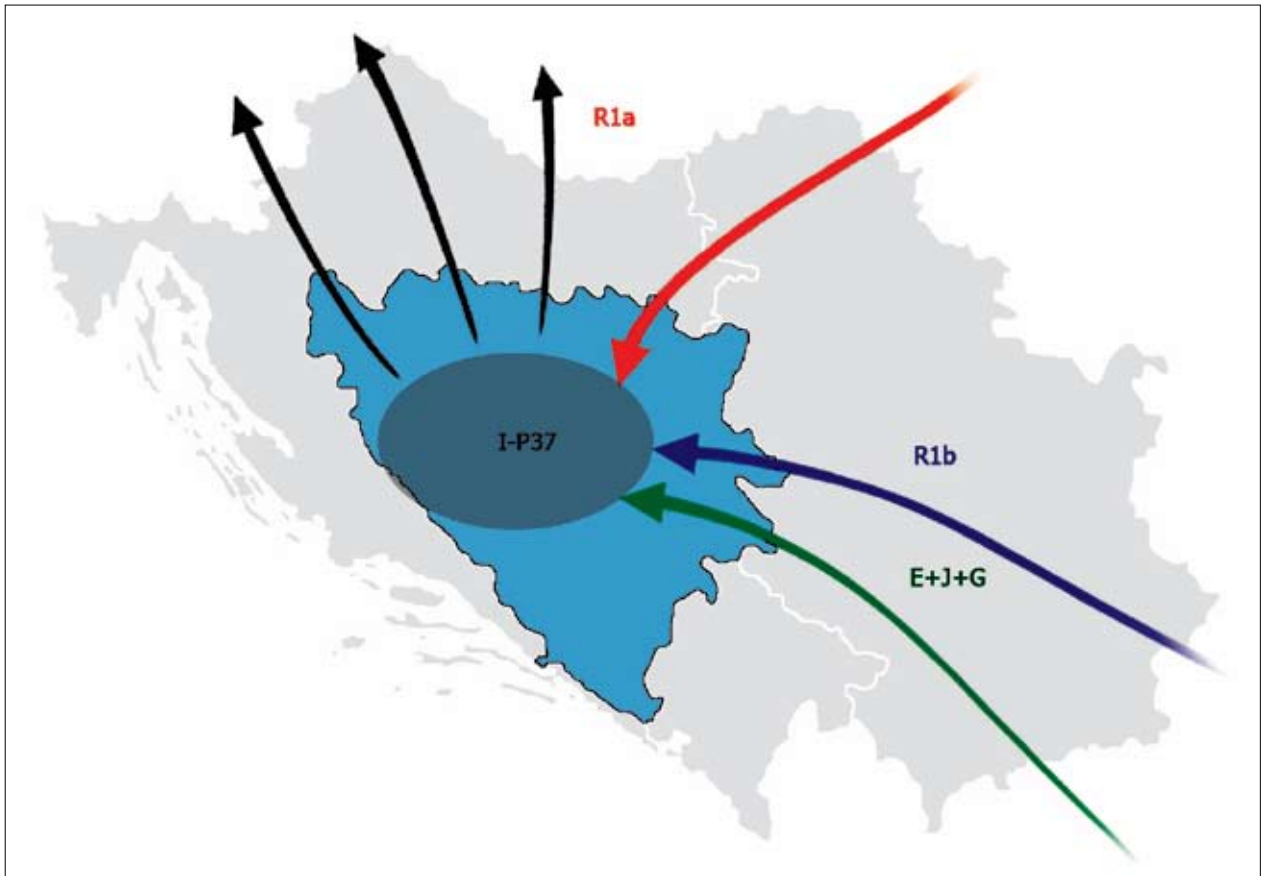
We are reasonably certain that the latest discoveries within techniques for whole-genome typing, using the array technology, will help us understand fine scale of Croatian population structure and aspects of demographic history.



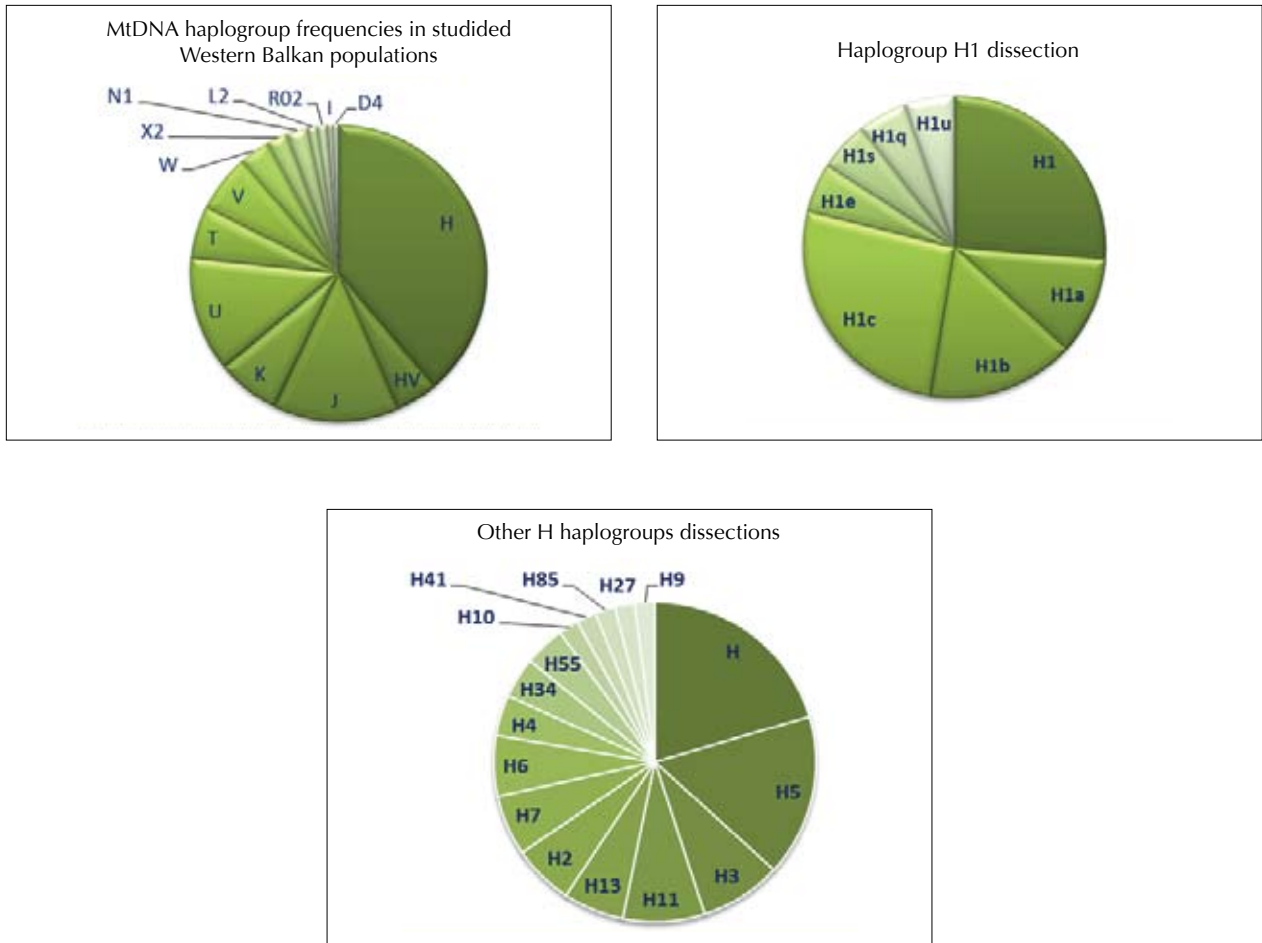
Slika 1. Predloženi migracijski putovi za glavne promatrane haplogrupe za hrvatsko područje: Crna (HgI) – pre-glacialne migracije s Bliskoga istoka; Plava – post-glacialne migracije iz zapadne Azije (preko Levanta); Crvena (R1a-M17) – post-glacialne migracije iz ukrajinskoga postglacijalnog utočišta, kao i iz područja današnje Njemačke/Poljske; Tamno zelena (J2) – rani poljodjelci s Bliskoga istoka; Svijetlo zelena (E3b) – specifična linija koja se širila s grčkom kolonizacijom. Migracijski su putovi konstruirani na osnovi podataka objavljenih u nekoliko radova^{5,13,14}.



Slika 2. Struktura Y kromosoma u hrvatskome stanovništvu prema podacima koje je objavila Semino i suradnici⁷. Prema tim rezultatima, oko 45% ispitanih muškaraca iz Hrvatske vjerojatno potječu od starih Europljana koji su uglavnom preživjeli glacialno doba u zapadnobalkanskome utočištu. Osim toga, gotovo 30% njih je došlo iz tzv. ukrajinskoga utočišta i 10% moguće iz prethodno opisanoga iberijskog utočišta. Ostatak muškaraca iz Hrvatske (oko 15%) mogli bi biti potomci ljudi koji su »donijeli poljoprivredu«⁷ Europi tijekom nadiranja poljodjelaca s Bliskoga istoka.



Slika 3. Tumačenje BiH Y kromosomskog kretanja predloženog prema podacima objavljenima u Marjanović *et al.*¹⁸ Uzimajući u obzir dobivene rezultate, moguće je da su područja današnje Hrvatske i Bosne i Hercegovine vjerojatno bila dio balkanskoga utočišta tijekom glacijalnog doba. Frekvencije haplogrupa J i G zajedno iznose više od 9%, što ukazuje da 9% bh. muškaraca potječe od ranih farmera. Ti rezultati sugeriraju da je muški genofond BiH populacije bio više pod utjecajem neolitskih i post-neolitskih migracija nego što je to bio hrvatski genofond. S druge strane, relativno niske frekvencije R1a i R1b haplogrupa unutar BiH muške populacije pokazuju manje prisustvo gena iz ukrajinskoga glacijalnog utočišta nego što je to slučaj u hrvatskoj populaciji za iste genetske biljege.



Slika 4. MtDNA haplogrupe prikazane u populacijama zapadnog dijela Balkanskoga poluotoka³⁶. Distribucija mt DNK haplogrupa u analiziranim populacijama zapadnog područja Balkanskoga poluotoka se podudara s modelom varijabilnosti mtDNA drugih slavenskih populacija, te generalno svih europskih populacija²⁷. Većina mtDNA linija, njih 77.1%, u analiziranim populacijama pripada mtDNA genskom bazenu zapadne Euroazije, s prevalencom H, U