

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК: 601.4 (574)

На правах рукописи

МУСРАЛИНА ЛЯЗЗАТ ЗЕНУРАИНОВНА

**Палеогенетический анализ патогенных микроорганизмов в
археологических находках с территории Казахстана**

6D070100 – Биотехнология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
к.б.н., профессор Джансугурова Л.Б.;
доктор, профессор Краузе Й.

Республика Казахстан
Алматы, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Актуальность исследований в области археогенетики	10
1.2 Особенности палео-ДНК	13
1.3 Роль исследований патогенных организмов в истории древних миграций популяций человека	17
1.4 Общая характеристика вируса гепатита В	20
1.5 Общая характеристика возбудителя чумы - <i>Yersinia pestis</i>	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	27
2.1 Объекты исследований	27
2.2 Методы анализа	29
2.2.3 Приготовление библиотек ДНК и высокопроизводительное секвенирование	30
2.2.4 Тест на ингибирование qPCR в древних образцах	31
2.2.5 qPCR для первичного скрининга <i>Y.pestis</i>	31
2.3 Обработка данных биоинформатическими методами	32
2.4 Полногеномный гибридационный захват ДНК патогенов	32
2.5 Филогенетический и статистический анализ	34
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1 Создание коллекции зубов и костных фрагментов древних людей, представляющих известные археологические находки	36
3.2 Анализ выделенных образцов палео-ДНК и их библиотек	40
3.3 Полногеномный анализ	44
3.3.1 Количественная оценка просеквенированных библиотек	44
3.4 Скрининг образцов палео-ДНК на наличие древних бактерий <i>Yersinia pestis</i>	45
3.4.1 Оценка ингибирования qPCR в древних образцах ДНК для первичного скрининга <i>Yersinia pestis</i>	47
3.4.2 Скрининг на наличие ДНК <i>Yersinia pestis</i> в образцах, представляющих древнее население Казахстана и прилегающих территорий России и Кыргызстана	48
3.5 Биоинформационный анализ наличия патогенных микроорганизмов в исследованных образцах ДНК	57
3.6 Полногеномный гибридационный захват ДНК наиболее важных древних патогенов: микроорганизмов <i>Yersinia pestis</i> , <i>Salmonella enterica</i> и вируса гепатита В	72
3.6.1 <i>Yersinia pestis</i>	73
3.6.2 <i>Salmonella enterica</i>	74
3.6.3 Hepatitis B virus (HBV)	75
3.7 Филогенетический и статистический анализ	75
3.7.1 Результаты филогенетического анализа выявленных древних штаммов	

<i>Yersinia pestis</i>	76
3.8 Популяционный анализ древних людей, оцененный методом 1240К	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	103
ПРИЛОЖЕНИЯ А-И	117

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
Палео-ДНК – архео-, древняя дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР - полимеразная цепная реакция
BAM - Binary Alignment Map
BEAST - Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees
BEAUti - Bayesian Evolutionary Analysis Utility
EAGER - Efficient ancient genome reconstruction
EBI – European Bioinformatics Institute
HBV – Virus Hepatitis B, вирус гепатита Б
HOPS - Heuristic Operations for Pathogen Screening
IGV – Integrative Genomics Viewer
IF - impact factor
ISBA - International Symposium on Biomolecular Archaeology
GATK - Genome Analysis Toolkit
kb – тысяч пар оснований
LNBA - Late Neolithic/Bronze Age
MALT – Megan Alignment Tool
MEGAN - MEtaGenome ANalyzer
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NGS –Next Generation Sequencing
PCA - Principal components analysis
QC- Quality Control
SNP - Single-Nucleotide Polymorphism
t C⁰ - температура в градусах Цельсия.
UNG – uracil –N- glycosylase
VCF - Variant Call Format
Y.pestis - *Yersinia pestis*
S.enterica – *Salmonella enterica*

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Диссертационная работа относится к области палеогенетики. Она посвящена анализу древних патогенных организмов в костном материале человека, представляющем археологические находки с территории Центрально-Евразийской степи. В работе представлены данные по сбору археологических материалов с территории современного Казахстана, России и Кыргызстана, данные по выделению палео-ДНК, приготовлению библиотек, полногеномному секвенированию палео-ДНК (360 древних индивидов), биоинформатическому скринингу на наличие ДНК широкого спектра патогенных микроорганизмов и некоторых ДНК-содержащих вирусов, оценке их копийности и древности. Для обнаруженных штаммов чумной палочки *Yersinia pestis* в работе применялись биотехнологические подходы реконструкции древних геномов на основе данных полногеномного секвенирования древних индивидов и qPCR-основанной специфической идентификации *pla* гена активатора плазминогена. Для древних штаммов *Yersinia pestis* и *HBV* был проведен филогенетический анализ и суммированы все последние достижения по анализу ДНК древних штаммов в эволюционном, медицинском, экологическом и историческом контексте.

Актуальность темы исследования. В последние годы возможности палеогенетики существенно расширились благодаря развитию биотехнологий, совершенствованию методов работы с древними биоматериалами, разработке новых методов анализа ДНК, развитию современных технологий биоинформационного анализа и накоплению данных о последовательностях древних ДНК человека, животных и низших организмов. Разработка биотехнологических методов анализа, позволяющих не только выявлять различия между древними и современными ДНК на основе дегградации и химической модификации древних ДНК, но и успешно проводить реконструкции древних геномов, стала основой для создания специфических пакетов программного обеспечения, без которых сейчас практически невозможен анализ древних геномов. Однако стоит отметить, что в виду сложности анализа древних ДНК, количество лабораторий палео-ДНК по всему миру все еще остается весьма ограниченным, среди них очень мало лабораторий, работающих с древними патогенными микроорганизмами. Анализ древних патогенов требует удостовериться в том, что идентифицированный в древнем костном материале агент не является результатом контаминации. Верификация положительного результата требует подтверждения несколькими методами анализа.

Помимо исторического аспекта, исследования древних патогенов актуальны и с точки зрения современной медицины. Последовательности человеческих штаммов опасных вирусов и бактерий, выделенные из разных географических мест и в разные периоды времени, позволяют применить подходы филогенетического анализа, провести географическое и молекулярное датирование, получить информацию о распространении инфекций.

Настоящая работа имеет особую актуальность в связи с тем, что археологический материал из Центрально-Евразийского пространства, включая территорию современного Казахстана, практически не был изучен в контексте

древних возбудителей заболеваний и миграционной истории особо опасных инфекций.

Цель исследования. Целью настоящей работы явился палеогенетический анализ ДНК человека из могильников Центрально-Евразийского региона на наличие древних штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов.

Задачи исследования

1. Анализ археологических находок ранних периодов истории Центрально-Евразийского региона и сбор материалов для исследования, представляющих древние костные останки людей.

2. Выделение и анализ образцов палео-ДНК. Подготовка ДНК-библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования.

3. Биоинформационный скрининг данных NGS на известные возбудители заболеваний человека, включая возбудителей чумы, туберкулеза, воспалительных и желудочно-кишечных заболеваний.

4. Верификация результатов биоинформационного скрининга в отношении значимых патогенных организмов.

5. Реконструкция геномов и филогенетический анализ наиболее значимых древних штаммов возбудителей заболеваний человека в контексте мировых данных о геномах древних и современных патогенов.

6. Анализ связей между миграционной историей человеческих популяций обнаруженными патогенами.

Объекты исследования и материалы. Объектами исследования были образцы костных тканей и зубов 360 древних индивидов, датированных с VII века до н.э. по XIV век н.э., из них 205 с территории современного Казахстана, 120 - из Кыргызстана, 35 - из России.

Методы исследования. В диссертационной работе использован комплекс современных методов палеогенетического анализа костных останков человека, акцентированный на геномах древних возбудителей заболеваний. Все манипуляции, связанные с предобработкой и выделением ДНК из археологического материала, проведены в специализированной лаборатории для палеогенетических работ с применением всех возможных мер для защиты от контаминации древних ДНК современными ДНК. NGS секвенирование библиотек палео-ДНК проведено на платформах Illumina (HiSeq 4000 / MiSeq). Биоинформационная обработка первичных NGS данных и скрининг на известные возбудители болезней проведены с использованием специализированных для анализа древних ДНК пакетов программ EAGER и HOPS. Наличие древних штаммов возбудителей чумы в образцах палео-ДНК человека устанавливали как с помощью метода реал-тайм ПЦР с использованием специфических праймеров к референсной ДНК *Yersinia pestis*, так и методами биоинформационного анализа данных NGS. Верификацию результатов биоинформационного скрининга проводили методом захвата (Capture) референсных ДНК с использованием мировых баз данных по патогенам. Автоматическую реконструкцию древних геномов патогенов и филогенетический анализ значимых патогенных организмов проводили с учетом всех известных мировых палеогенетических и современных данных с использованием пакетов программ MEGAN, VCF, BEAST, R-Studio.

Научная новизна исследования. В данной работе впервые в мире проведен анализ древних возбудителей заболеваний на археологическом материале, представляющем костные останки человека из могильников с территории современного Казахстана и прилегающих районов Кыргызстана и России. Такой большой массив данных (360 древних индивидов) с территории Центрально-Евразийской степи изучен впервые. В отношении этих древних возбудителей опасных инфекций были суммированы все последние достижения по анализу ДНК древних и современных штаммов *Yersinia pestis* и HBV в эволюционном, медицинском и экологическом контексте.

Так, впервые, в сотрудничестве с большой группой ученых всего мира, установлена эволюционная история HBV на основе изучения всех известных на сегодняшний день данных по идентифицированным у древних людей (137 объектов) штаммам HBV, датированных периодом от ~10 500 до ~400 лет назад. Результаты исследования показывают пути распространения и сдвиги в вирусном разнообразии, которые отражают известные исторические миграции людей и демографические события, а также связи с современностью. При этом казахстанские древние штаммы показали принадлежность к генотипу D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современным штаммам HBV.

Новизну исследования представляет также обнаружение древнего штамма *Yersinia pestis* железного века в образце из некрополя Кызыл и средневековых штаммов *Yersinia pestis* в 3 образцах несторианского кладбища Кара-Джигач, которые являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы («Черная смерть») в Европе.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что до сегодняшнего дня не проводились работы, связанные с изучением древних инфекционных заболеваний, циркулирующих на территории Казахстана.

Теоретическая значимость работы заключается в использовании мирового опыта современных палеогенетических методов анализа, в широком международном сотрудничестве для получения детальных сведений и комплексного анализа геномов древних патогенных микроорганизмов и вирусов, их филогении и связи с историческими событиями. Комбинируя результаты генетических исследований древних патогенов с данными из других дисциплин, таких как археология, история и палеопатология, а также генетика человеческих популяций получили возможность построить более полную картину взаимоотношений между людьми и патогенами, и современных инфекционных заболеваний, проследить пути древних миграций и восполнить пробелы в аспектах человеческой истории

Практическая значимость диссертационной работы. В ходе исследований были установлены наиболее эффективные методы анализа древних патогенов, которые имеют методологическое значение. Имеющие междисциплинарный характер результаты исследования представляют интерес для специалистов смежных наук (медиков, антропологов, археологов, демографов и историков). Результаты работ имеют широкую образовательную ценность, будут применяться в учебном процессе при подготовке курсов лекций и семинаров для студентов биологических, медицинских, исторических специальностей, для разработки

курсов повышения квалификации, а также будут использованы в популяризации науки. Результаты исследования включены в учебный план дисциплины «ІМКВ 5206» Engineering Molecular Cell Biology по специальности «7M05115-Биомедицинская инженерия» КазНУ им. Аль-Фараби.

Основные положения к защите:

1. Создана пригодная для анализа геномов древних патогенов и древних людей коллекция костных останков, библиотек палео-ДНК, данных полногеномного секвенирования, представляющая 360 древних индивидов, датированных от VII века до н.э. по XIV век н.э. с территории современного Казахстана (205 образцов), Кыргызстана (120 образцов) и России (35 образцов).

2. Самыми распространенными патогенами древнего мира Центрально-Евразийской степи эпохи бронзы и железного века были микроорганизмы, вызывающие кариес, заболевания десен и других мягких тканей ротовой полости (*Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Tannerella forsythia*, *Veillonella parvula* и др.). Передаваемые животными паразитарные заболевания, такие как гельминтоз, сальмонеллез, брюшной тиф отмечены у отдельных индивидов, представляющих разные некрополи. Частыми были случаи венерических заболеваний. Такие опасные заболевания, как гепатит В (HBV), чума (*Yersinia pestis*), сальмонеллез (*Salmonella enterica*) отмечены только у единичных индивидов.

3. Древние штаммы вируса гепатита В с территории Казахстана (3 индивида пазырыкской и хунно-ксяньбийской культур из некрополя Берел и 1 образец тасмолинской культуры из некрополя Акбеит) характеризуются генотипом D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современным штаммам HBV (A и D генотипы).

4. Распространение и эволюция *Yersinia pestis* в Центральной Евразии и Европе в эпоху от позднего неолита до раннежелезного века (LNBA) осуществлялось параллельными путями. Об этом свидетельствует общее происхождение LNBA линий и наличие предкового, менее инфекционного варианта *pla* гена. Некоторые древние линии, в том числе образец из некрополя Кызыл, в результате протяженных делеций и псевдогенизации лишены генов, ответственных за вирулентность (ген адгезии *yapC*), уклонение от иммунной системы хозяина (гены флагеллинов *flgB* и *fliZ*) и эффективную трансмиссию чумной палочки от блох (гены *ymt* и *YPM1*). При этом наиболее обширная делеция (~83 kb), включающая потерю генов системы секреции типа VI (Т6SS), в частности Т6SS-G, характеризует штамм *Y. pestis* из некрополя Кызыл, что связано с ослаблением его вирулентности.

5. Средневековые штаммы *Yersinia pestis* из несторианских кладбищ Кара-Джигач и Бурана (Кыргызстан) являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы («Черная смерть») в Европе. Филогения определяет эти штаммы, как предковую форму для опубликованных геномов Второй пандемии чумы, отделяя его одним SNP от изолята начала пандемии из Поволжья, и двумя SNP от изолятов, связанных с Черной смертью, из Западной Европы.

6. Носительство множественных и значимых патогенов у представителей различных культур и разных периодов с Восточного Казахстана, а также анализ главных компонент генома популяций человека, указывает на особое значение

Горного Алтая как перекрестка миграционных путей, определяя богатство детерминированных во времени миграций древнего населения с Востока и Запада в Центрально-Евразийский регион и социально-экономических связей.

Связь исследования с научным проектом. Диссертационная работа частично связана с проектом «Анализ знаковых феноменов, представляющих раннюю историю Великой степи, для решения вопросов этногенеза казахов» (2018-2020 гг.) и проектом на 2020-2022 годы по теме «Палеогенетический анализ патогенных микроорганизмов в археологических останках человека, представляющих Центрально-Евразийский регион», и грантом «Анализ древних геномов *Salmonella enterica* из человеческих останков с территории Центральной Азии».

Личный вклад автора. Работа с литературными данными по теме диссертации; сбор информации по археологическим материалам; работа с каталогом от музея НИИ МГУ имени М.В.Ломоносова для отбора необходимых образцов; общение с археологами; сбор археологических образцов; вся лабораторная часть: подготовка образцов, приготовление костной стружки, приготовление растворов для выделения ДНК, выделение палеоДНК, тест на ингибирование, скрининг на наличие *pla* гена *Y.pestis* методом реал-тайм ПЦР, подготовка библиотек для полногеномного секвенирования, расчет концентраций и подготовка пуллов для полногеномного секвенирования на оборудовании Illumina, подготовка к усилению для подтверждения древнего патогенного микроорганизма. Биоинформатический скрининг патогенных микроорганизмов в полученных образцах палео-ДНК. Поиск и уточнение археологических характеристик по собранным образцам. Внедрение информации по образцам в базу данных PANDORA. Подготовка акта внедрения, тезисов, статей и материалов диссертации.

Апробации исследования. Основные результаты и наблюдения представлены и подтверждены публикациями в престижных международных научных журналах, включенных в базу данных Scopus, Web of Science, журналах, рекомендованных ККСОН. Результаты обсуждались на научных семинарах института, докладывались на международных и республиканских научных конференциях.

Публикации. Основные результаты проведенных исследований по теме диссертации опубликованы в 9 научных работах, из них 4 статьи в международных рецензируемых журналах, входящие в базу данных Thomson Reuters и Scopus с импакт-факторами (IF = 14,136; IF = 41,846, IF = 11.205, IF=49.962) и 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК, 2 тезиса в республиканских и международных конференциях проведенных в Казахстане и за рубежом.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 116 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка использованных источников из 184 наименований, из них 176 на английском языке. Работа содержит 26 рисунков, 4 таблицы и 9 приложений.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность исследований в области археогенетики

Применение молекулярной генетики к вопросам ранней истории человеческой популяции и, следовательно, к основным вопросам доисторической археологии привела к возникновению новой дисциплины, как археогенетика. Сам термин «археогенетика» был придуман в 1990-х годах археологом Колином Ренфрю от греческого слова *archaios* (древний) + генетика = археогенетика буквально древняя генетика [1]. С появлением передовых методов молекулярной биологии изучение генетики человека подверглось новой революции [2].

Сегодня анализы на основе ПЦР теряют популярность по сравнению с подходами к секвенированию следующего поколения (NGS), так как теперь можно получить гораздо больше данных при значительно низких затратах. Преимущество характеристики коротких молекул, которые являются общими для древней ДНК, можно анализировать с помощью NGS. Применимость этих подходов к секвенированию в палеогенетических исследованиях была признана, о чем свидетельствуют древние наборы данных, которые были одними из первых, опубликованных в зарождающуюся эпоху высокой производительности [3]. Стремительное развитие археогенетики в последнее десятилетие прошлого века привело к настоящему взрыву числа публикаций по генетике человеческих популяций [4].

По мере того, как все больше информации о тонкой генетической структуре ядерной ДНК и мтДНК различных этнических групп со всего мира накапливалось, популяционные генетики использовали ее для выводов о доисторических демографических событиях и для подтверждения сведений из исторических источников. При этом им приходилось согласовывать свои выводы с данными от археологов, лингвистов и палеоантропологов. Каждый человек в своем геноме несет генетическую запись своих предков [5]. И археогенетические методы все чаще используются для открытия и использования генов в антропологии, медицине и судебной генетике и т.д.

Применение секвенирования ДНК, позволяющего исследовать женские линии через мтДНК [6] и мужские линии через Y-хромосому [7], уже поставило ряд новых вопросов, вызывающих оживленные дискуссии. Таким образом, настало время для более узких исследований, посвященных конкретным историческим проблемам. Исследование разнообразия живого населения дает некоторую информацию об эволюционном процессе, рассредоточении населения и эмиграции в прошлом.

Поскольку высокая чувствительность анализа рассматривалась как первостепенное значение для доступа к древним молекулам, которые, как предполагалось, присутствовали в чрезвычайно малых количествах, лабораторное загрязнение, вызванное реагентами или условиями работы, представляло серьезное препятствие и постоянную угрозу целостности данных. В ответ на это во многих лабораториях [8] были установлены очень строгие

стандарты как для лабораторных процедур, так и для анализа данных, которые впоследствии легли в основу оживленных академических дебатов относительно надежности данных [9].

В настоящее время достижения в этой области настолько многочисленны и стремительны, что к концу этого десятилетия, несомненно, кардинально изменятся как методы, так и знания в области изучения эволюции и истории. Особенно использования молекулярно-генетических методов в археологии уже в течение нескольких лет, Колин Ренфрю продемонстрировал значительные результаты и суждения по этому поводу [1].

После смерти организма его ДНК начинает деградировать и зависит от времени [10]. При благоприятных условиях ДНК может сохраняться в течение сотен тысяч лет и давать ценную информацию об эволюционной истории организмов [11]. Тем не менее лишь незначительные количества древней ДНК (палео-ДНК) часто остаются в исторических или археологических материалах. Кроме того, большая часть выделенной ДНК обычно происходит от микроорганизмов, которые распространяются в разлагающихся тканях [12]. В то время как микробные последовательности редко совпадают с эталонным геномом, используемым для идентификации эндогенных последовательностей, если используются соответствующие отрезки длины [13], загрязнение ДНК от близкородственных организмов представляет собой повторяющуюся проблему [14]. Так как люди, работающие с образцами во время раскопок, часто оставляют свою ДНК, вышесказанная проблема особенно актуальна для геномного анализа древних людей [15]. Поскольку эти загрязнения могут существенно повлиять на результаты популяционного, генетического или филогенетического анализа. Количественная оценка уровня загрязнения имеет решающее значение для последующих анализов. Оценка уровня загрязнения ДНК в настоящее время также желательна для принятия решений при скрининге образцов.

В последнее время мы стали свидетелями значительных достижений в археогенетике, включая использование крупномасштабных наборов геномных данных для отслеживания миграций человечества [16, 17]. Кроме того, достижения в области древней и современной геномики позволили исследователям решить ряд вопросов, имеющих важное значение для коренных народов [18]. Наиболее примечательной из них является возвращение древних останков их родственникам, т.е. к примеру, что австралийцы-аборигены называют своим "местом и страной" [19].

До недавних достижений в области древней геномики единственным методом изучения географического происхождения древних аборигенов были исследования морфологии скелета и, в частности, краниометрии [20]. Однако грубые морфологические различия между аборигенным населением не всегда применимы для определения географического происхождения.

ДНК, выделенная из древних тканей, содержит информацию, выходящую за рамки генетических данных человека: также было показано, что она содержит сохраненные бактериальные ДНК, присутствующих в человеке на момент его смерти. Эти данные использовались для исследования древнего микробного

мира как патогенных, так и других сообществ с учетом их эволюционной истории [21, 22, 23, 24].

В археогенетике информация о ДНК различных этнических групп со всего мира используется для анализа доисторических событий и подтверждения отчетов из исторических источников. Данные ДНК согласованы с открытиями археологов, лингвистов и палеоантропологов, чтобы пролить свет на прошлое.

С исторической точки зрения, новые области науки можно охарактеризовать как переходящие в три этапа, начиная с описания, за которым следует сосредоточение внимания на механизмах/функциях и заканчивая формулировкой экспериментов и проверкой гипотез. В настоящее время новая наука об археогенетике находится на стадии описания. Она включает в себя крупномасштабное секвенирование генома и использование исторических повествований.

Так же необходимо рассматривать археогенетику в контексте онтогенеза научных дисциплин в целом. Общая закономерность в науке заключается в том, что дисциплины начинают с процесса описания, затем со временем продвигаются к определению потенциальных механизмов и функций и, наконец, переходят к экспериментам и проверке гипотез. Однако это общая закономерность, и этапы необязательно являются дискретными и могут накладываться друг на друга. Кроме того, важно понимать, что наука проводится в социальном контексте и что этот контекст обычно определяет то, что является предметом изучения.

Объектом археогенетики является исследование древней ДНК: древнюю ДНК можно извлечь из разных окаменелых образцов, такие как искусственно сохранные ткани в человеческих и в образцах животных, яичной скорлупе. У растений же древнюю ДНК выделяют из семян и тканей.

Область исследования древней ДНК началась с работы Аллана Уилсона 1984 г. по равнинной зебре [25]. Исследовательская группа Уилсона смогла восстановить короткие последовательности ДНК с музейной кожи этого вымершего вида. Однако авторы ограничились клонированием фрагментов и ручным секвенированием ДНК. Впоследствии, область палео-ДНК расширилась благодаря ряду технологических достижений. К ним относятся ПЦР - разработка Кэри Мюллиса [26] и автоматическое капиллярное секвенирование и других видов. Эти совместные разработки привели к резкому увеличению числа исследований палео-ДНК, хотя они, как правило, ограничивались короткими фрагментами ДНК. Последующие разработки в области оптики высокого разрешения и секвенирования позволили реконструировать существенные участки многих геномов и, наконец, древние геномы. Полный потенциал области древней ДНК был реализован с публикацией знаковой работы Сванте Паабо, в которой была использована последняя технология для секвенирования полного генома неандертальца [3, 16]. Вместе с новыми достижениями в области методов захвата ДНК эти технологии заложили основы дисциплины археогенетики. Исследования в области археогенетики описали

взаимоотношения между человеческими популяциями с использованием полных геномов [6, 27].

Для анализа происхождения древних патогенных микроорганизмов и установления связей между миграцией населения и заболеваниями в прошлом все большее значение приобретают масштабные палеогенетические исследования, полученные на основе полно-геномного секвенирования ДНК археологических образцов. Для этой цели проводят анализ для сбора интересных археологических находках для дальнейшего исследования, учитывая временные и географические данные самих образцов, обсуждая с археологами и историками. Для самого анализа полученных результатов очень важны биоинформатические знания и использования различных программ. Так, недавно на основе полногеномного секвенирования полученные результаты анализировали с помощью программ, созданных специально для анализа древних патогенных микроорганизмов – HOPS [28], анализ которых позволил получить интересные результаты, и выявить множество патогенных микроорганизмов [29], что позволило рассказать нам многое о прошлых эпидемий.

Массивы данных по разнообразию SNP или полногеномного секвенирования в древних и современных ДНК позволяют искать предковые формы, определять генетическое родство древних людей с современными популяциями, восстанавливать историю миграций населения по земному шару в разрезе больших исторических периодов [30, 31].

Весьма информативными в отношении миграционной истории человечества рассматриваются и такие косвенные маркеры, как изменчивость вирусов и бактерий, долговременно населяющих организм современного человека и не распространяющихся эпидемично (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella enterica*). В то же время, патогенные микроорганизмы, приводящие к массовым исторически известным эпидемиям и пандемиям (*Yersinia pestis*, *Mycobacterium leprae* и т.д.) активно изучаются не только с точки зрения их изменчивости и патогенности, но и для уточнения вопросов исторических миграций древнего населения.

1.2 Особенности палео-ДНК

При благоприятных условиях ДНК может тысячелетиями выживать в останках погибших организмов. ДНК, извлеченная из таких останков, неизменно деградирует до небольших средних размеров в результате процессов, которые, по крайней мере, частично связаны с депуринизацией. Она также содержит большое количество дезаминированных остатков цитозина, которые накапливаются на концах молекул, а также ряд других менее хорошо охарактеризованных повреждений.

В живых клетках молекулы ДНК постоянно подвергаются химическим посягательствам, которые противодействуют ферментативным механизмам восстановления, поддерживающим целостность генома. После смерти эти механизмы восстановления клеток перестают функционировать. Как следствие,

геном подвергается воздействию многочисленных факторов, угрожающих его стабильности. К этим факторам относятся внутриклеточные нуклеазы, которые больше не синтезируются в клетке и, таким образом, могут получить доступ к ДНК и разрушить ее, а также микроорганизмы, которые распространяются в распадающихся тканях. Вместе эти факторы могут привести к потере всей извлекаемой ДНК. Однако, при благоприятных условиях окружающей среды, например, когда ткани замораживаются или быстро высыхают после смерти, эти процессы тормозятся до полного разрушения всей ДНК, эндогенной для организма. В этих случаях другие деструктивные факторы, в частности гидролизные и окислительные процессы, становятся ограничивающими факторами выживания ДНК в ткани.

При извлечении и анализе ДНК из древних образцов эти деструктивные факторы проявляются тремя различными способами:

- уменьшение размера фрагментов ДНК;
- поражения, которые блокируют репликацию молекул ДНК полимеразой, препятствуя тем самым многим формам анализа;
- поражения, которые приводят к включению неправильных нуклеотидов при репликации ДНК. Здесь мы суммируем то, что известно о каждой из этих форм повреждений в древней ДНК.

Уже при первом систематическом изучении свойств древней ДНК [5] было показано, что почти вся ДНК, выделенная из образцов возрастом от 400 до 13000 лет, деградировала до фрагментов 40-500 п.о. Последующие исследования подтверждали, что это общая особенность ДНК, извлеченной почти из всех древних останков. На основании экспериментов *in vitro* с использованием современной ДНК было высказано предположение, что фрагментация происходит в результате гидролитического депурирования, что приводит к разрыву одной цепи [10]. Действительно, щелочная обработка древних экстрактов ДНК указывает на наличие терминальных 5'-фосфатных и альдегидных 3' концов.

В последнее десятилетие высокопроизводительные методы секвенирования позволили лучше понять закономерности фрагментации древней ДНК. Это связано с тем, что эти методы опираются на перевязку адаптеров ДНК к концам молекул ДНК для построения библиотек секвенирования. Последующее секвенирование от адаптеров позволяет определить местоположение разрывов штаммов до тех пор, пока терминальные нуклеотиды поддаются перевязке и не удаляются ферментативной обработкой, используемой во время подготовки библиотек. Используя этот подход и эталонный геном для вывода оснований, непосредственно прилегающих к древним фрагментам ДНК, было показано, что пурины: аденины (A) и гуанины (G) перепредставлены рядом с 5' концами фрагментов ДНК, извлеченных из останков неандертальцев, мамонтов и пещерных медведей, возраст которых составляет ~40 000 лет [12].

Большинство методов подготовки ДНК-библиотек к секвенированию связаны с репарацией - ферментативным процессом, который простирается в

углублении и разлагается на нависающие 3' концы фрагментов ДНК, тем самым исключая определение точного местоположения 3' концов [32]. Первая попытка определить контекст последовательности вокруг 3' концов была предпринята с использованием технологии секвенирования, которая позволяет определять последовательности из полиаденилированных, но в остальном немодифицированных 3' концов [33]. Разрушение прядей происходит предпочтительно на каком-либо конкретном нуклеотиде. Однако это может быть связано с неэффективным поли(А)-хвостом альдегидных 3' концов, который исключает фрагменты, образующиеся в результате β-элиминации [33]. Недавно разработанный метод подготовки ДНК-библиотеки, при котором адаптеры лигируются к одноцепочечной ДНК, сохраняет 5' и 3' концы и подтверждает, что пурины, особенно остатки гуанина, перепредставлены непосредственно рядом с обоими концами древних фрагментов ДНК в ДНК, извлекаемой из костей, сохранившихся десятки тысяч лет [11, 24].

Некоторые модификации ДНК препятствуют движению ДНК-полимераз, предотвращая их амплификацию и секвенирование. Такие блокирующие повреждения происходят в виде нуклеотидных модификаций и сшивок, которые могут образовываться либо между цепочками ДНК, либо между различными фрагментами ДНК, либо между ДНК и другими молекулами. Несколько нуклеотидных модификаций блокируют синтез ДНК, опосредованный полимеразой. О других блокирующих поражениях древней ДНК известно мало, хотя эксперименты по расширению праймера показали повышенную частоту прерывания на остатках гуанина в древних образцах, что позволяет предположить, что модификация гуанина также может действовать как блокирующее поражение, но в настоящее время существуют противоречивые данные о степени присутствия блокирующих повреждений в древней ДНК.

Основания нуклеотидов восприимчивы к гидролитическому дезаминированию, что приводит к модификациям, вызывающим их неправильное считывание ДНК-полимеразой. Первичной мишенью дезаминирования является цитозин. Его продукт, урацил, будет направлять присоединение аденина (А) во время репликации ДНК, что приведет к замещению от С до Т или Г до А (в зависимости от последовательности цепочки). Поскольку древняя ДНК чувствительна к урацил-N-гликозилазе (UNG), было сделано предположение, что она содержит остатки урацила [5].

Более того, асимметричная ПЦР, которая амплифицирует только одну цепочку ДНК, показала, что подавляющее большинство замещений нуклеотидов в древних последовательностях ДНК находятся в диапазоне от С до Т, и что обработка UDG приводит к значительному снижению таких замещений.

Анализ 3-х концов фрагментов древней ДНК, ставший возможным благодаря новым технологиям секвенирования [33] и недавнему методу подготовки однониточной библиотеки [17], однозначно показывает, что изменения от С до Т происходят на одинаковых и высоких частотах на обоих концах фрагментов древней ДНК.

Хотя такие условия окружающей среды, как влажность, температура, соленость и рН будут оказывать сильное влияние на сохранение ДНК, путем экстраполяции из экспериментов *in vitro* [10] было подсчитано, что ДНК проживет не более нескольких сотен тысяч лет. Действительно, недавно было подсчитано, что период полураспада 242 п.о. митохондриальных фрагментов ДНК в костях птиц, раскопанных на небольшом участке в Новой Зеландии, составляет около 500 лет и что только сохранение в замороженном состоянии может позволить ДНК выжить более миллиона лет [34]. Когда станет доступно несколько таких подробных исследований выживаемости ДНК из различных сред, можно будет оценить вероятность выживания ДНК, учитывая условия окружающей среды на археологическом объекте. Однако даже в этом случае условия, имеющие отношение к выживанию ДНК, такие как количество проникающей воды, соленость, рН и рост микроорганизмов, скорее всего, будут варьироваться в пределах участка или археологического слоя.

Характеристики последовательности ДНК, свидетельствующие о повреждении ДНК, недавно были оценены на останках животных в возрасте от 18 до 60 000 лет. Корреляция между длиной фрагментов и их возрастом не обнаружена, а лишь слабая отрицательная корреляция между возрастом и появлением пуринов, непосредственно примыкающих к 5' концам фрагментов. Интересно, что в образцах моложе 100 лет вблизи 5' концов фрагментов преобладали остатки аденина, в то время как в образцах старше 40 000 лет преобладали остатки гуанина. Это говорит о том, что в более молодых образцах происходит некоторый процесс, помимо депурирования, который, вероятно, вызывает повышенный сигнал гуанина в более старых образцах, возможно, деградацию ферментами вскоре после смерти. Из изученных особенностей последовательности ДНК только дезаминация цитозина была сильно положительно коррелирована с возрастом, несмотря на то, что образцы поступали с разных участков и из разных условий захоронения. Поэтому деаминирование цитозина, проявляющееся повышенной частотой замещения С-Т, может быть использовано как указание на то, что молекулы ДНК действительно древние [14].

Депуринизация является хорошо описанным механизмом деградации ДНК, но ее вклад в фрагментацию древней ДНК полностью основан на косвенных доказательствах и, вероятно, составляет лишь 10-40% фрагментации, которая происходит в древней ДНК. Кроме того, неясно, насколько распространены блокирующие поражения в древней ДНК. К счастью, вероятно, появятся технологии, которые позволят непосредственно обнаруживать и характеризовать модификации нуклеотидов и поражения без предварительной амплификации или ферментативных модификаций. Улучшенное понимание повреждений древней ДНК может позволить разработать новые стратегии репарации, которые могут еще больше увеличить число последовательностей ДНК, которые могут быть извлечены из древних останков [35, 36].

1.3 Роль исследований патогенных организмов в истории древних миграций популяций человека

Многовековая общая история между людьми и инфекционными заболеваниями ставит изучение древних патогенов в круг интересов нескольких дисциплин, таких как микробиология, вирусология, эволюционная биология, генетика, история и антропология. Исследования по этой теме направлены на то, чтобы лучше понять взаимодействие между патогенами и их хозяевами в эволюционном масштабе, раскрыть происхождение патогенов и определить генетические процессы, связанные с их появлением и распространением среди людей.

Геномы древних патогенных микроорганизмов ранее определялись сравнительной геномикой современного патогенного разнообразия [37], палеопатологической оценкой древних скелетных останков [38] или анализом исторических записей [39]. Период возникновения и распространения инфекционных заболеваний в сочетании с данными подходами, могут быть использованы для построения междисциплинарной картины истории инфекционных заболеваний. Однако существуют и ограничения, как в примере анализа современного генетического разнообразия патогенных организмов, учитывающий лишь кратковременную глубину имеющихся данных и не может предсказать эволюционные сценарии, вытекающие из родословных, которые в настоящее время вымерли. Кроме того, скелетные маркеры специфических инфекций в прошлых популяциях существуют лишь для нескольких заболеваний и в настоящее время редко могут рассматриваться как окончательные, поскольку для данной патологии могут существовать многочисленные дифференциальные диагнозы [40]. Аналогичным образом, исторически зафиксированные симптомы часто могут быть неправильно истолкованы с учетом того, что прошлые описания могут быть неспецифическими и не всегда соответствуют современной медицинской терминологии [41]. За последние 10 000 лет произошли множество изменений, подвергших наш вид воздействию новым инфекциям, сопровождавших с времен неолита [42].

Более тесный контакт с домашними животными увеличил бы частоту случаев передачи зоонозных инфекций, а более высокая плотность населения повысила бы способность патогенов распространяться внутри и между группами.

На протяжении всей истории человечества было зарегистрировано множество эпидемий и пандемий и большинство их возбудителей все еще остаются не исследованными. Традиционно, древние инфекционные заболевания изучались путем анализа физической структуры древних скелетов, которые имели признаки заболевания. Однако большинство инфекционных заболеваний не оставляют видимых следов на костях и в таких случаях важными источниками информации служили исторические записи и имеющиеся знания о геномах современных патогенных микроорганизмов и вирусов. Стремительное развитие молекулярной генетики и методов анализа геномов сделало

возможным изучение геномов древних патогенов, извлеченных из археологических останков (с 1990-х годов). К примеру, с помощью метода ПЦР был определен туберкулез у древней Египетской мумии [43]. Развитие высокопроизводительного секвенирования (NGS) и применение биоинформационных подходов, позволили расширить направления до углубленного изучения эволюции инфекционных заболеваний, предоставляя уникальный ресурс для реконструкции временных и географических путей распространения инфекций в истории человечества [44]. К примеру, появление штамма *Salmonella enterica*, приспособленного к человеку, было связано с процессом неолитизации [45]. Масштабные изменения в стратегиях жизнеобеспечения человека, которые происходили в период неолитической революции подвергли наш вид новому спектру инфекционных заболеваний. Более тесный контакт с одомашненными животными увеличил частоту случаев зоонозной инфекции, а более высокая плотность человеческой популяции увеличила потенциал распространения патогенов внутри и между популяциями [29]. В связи с тем, что многие инфекционные заболевания не оставляют видимых следов на костях, диагностику этих заболеваний и изучение древних эпидемий возможно проводить только с помощью анализа ДНК возбудителей, сохранившейся в останках больных. Эти исследования дают нам возможность проследить возникновение и эволюцию инфекционных бактериальных штаммов и вирусов, особенности их распространения и течения инфекционных заболеваний у древнего населения, а также, сопоставлять полученные данные с современными знаниями о конкретном заболевании [46].

Чума хорошо известна своим разрушительным воздействием на средневековую Европу во время «Черной Смерти» и последующих вспышек. Хотя эту бактерию часто считают исторической болезнью, известно, что она поразила человеческие популяции еще 5000 лет назад [23]. Древняя ДНК помогла нам разобраться в ранней эволюции *Y. pestis* через анализ геномов древних захоронений. Эти данные помогли выявить ключевые этапы, которые способствовали появлению этого патогена от близкого родственника *Yersinia pseudotuberculosis*, но все еще остаются вопросы о его передаче. Благодаря непосредственному исследованию ДНК древнего возбудителя чумы *Yersinia pestis*, возможные эволюционные пути и условия превращения микроорганизма в чрезвычайно вирулентную форму, которая способна вызывать бубонную чуму [47].

Анализ геномов древних микобактерий *Mycobacterium tuberculosis*, собранных из человеческих останков в Перу, позволил сделать выводы о происхождении и распространении возбудителя туберкулеза на территории Америки. Ученые предполагают, что туберкулез передался коренным жителям Южной Америки задолго до того, как на континенте появились европейцы, а источником заражения послужили ластоногие млекопитающие, мигрировавшие из Африки примерно 2500 лет назад [22]. Однако, полномасштабная эпидемия туберкулеза на Американском континенте началась в XVI веке, когда конкистадоры и другие европейские завоеватели завезли новую, более

агрессивную версию туберкулезной палочки, которая постепенно вытеснила местный штамм [48].

Реконструкция древних геномов, принадлежащих различным сероварам *Salmonella enterica*, одни из которых способны вызывать желудочно-кишечные заболевания, другие паратиф С (*S. enterica Paratyphi C*), позволила ученым проследить путь перехода бактерии от животных к человеку. Предполагают, что возникновение специфичной для человека линии произошло около 4 тысяч лет назад вследствие накопления в бактериальном геноме псевдогенов [45].

Анализ средневековых геномов возбудителя проказы *Mycobacterium leprae* позволил предложить европейский источник проказы на Американском континенте и установить, что в средневековой Европе присутствовали все четыре штамма микобактерии, которые встречаются сейчас по всему миру [49].

В 2018 году были реконструированы геномы средневекового и неолитического штаммов вируса гепатита В и доказано, вирус существует в Европе на протяжении более 7000 лет. Ученые пришли к выводу, что скорее всего эти древние вирусы представляют особые линии, которые сегодня не имеют близких родственников и, возможно, вымерли. Эта работа представляет собой огромный потенциал древней ДНК из человеческих скелетов для изучения долгосрочной эволюции переносимых кровью вирусов [50].

Все эти исследования включают достоверную идентификацию возбудителей древних заболеваний, которые остаются актуальными для общественного здравоохранения и сегодня. Становится все более очевидным, что, помимо возбудителей чумы и проказы, в прошлом существовали и другие инфекционные заболевания, вызываемые многочисленными патогенными микроорганизмами. Анализ генетических особенностей древних патогенов позволяет понять эволюцию современных штаммов микроорганизмов, которые могут гипотетически вызывать новые пандемии или вспышки.

На протяжении своей истории люди подвергались воздействию широкого круга микроорганизмов, и такие взаимодействия, вероятно, со временем повлияли на эволюцию и здоровье человека. В частности, было определено около 1400 патогенов человека, в то время как на Земле оценивается один триллион видов микробов, подавляющее большинство из которых остаются не охарактеризованными [51].

По мере того, как люди перемещались по всему миру, популяции встречали отдельные патогены, а естественный отбор увеличивал частоту аллелей в обеих новых экосистемах. Использование новых высокопроизводительных методов, аналитических методов и расширение общедоступных ресурсов данных приводит к появлению свежих доказательств существования естественного отбора, в результате чего у людей раннего бронзового века, по крайней мере за 3000 лет до каких-либо исторических записей об этом заболевании, появились свежие данные о бактериях чумы (*Yersinia pestis*) [47].

1.4 Общая характеристика вируса гепатита В

Сотни миллионов людей в настоящее время инфицированы HBV, что делает его глобальной проблемой здравоохранения [52]. HBV является одним из наиболее распространенных патогенов человека, известных сегодня, однако его происхождение и история эволюции до сих пор остаются неясными и противоречивыми.

HBV представляет собой оболочечный ДНК-вирус, который принадлежит к семейству *Hepadnaviridae* и поражает гепатоциты широкого круга животных: род *avihepadnavirus* поражает птиц (таких как утки, гуси, цапли, аисты, журавли и попугаи), а род *Orthohepadnavirus* заражает млекопитающих, такие как белки, сури, приматы и летучие мыши [53].

Вирусный геном HBV – это кольцеобразная, частично двухцепочечная ДНК размером около 3,2 тысяч пар оснований (kb), которая включает четыре частично перекрывающихся гена (PreS / S, PreC / C, P и X), кодирующие по семь белков: три поверхностных белка (малый, большой и средний S-белки), два основных антигена (HBcAg и HBeAg), полимераза (кодируемая геном P) и малый регуляторный белок X [54]. На основании геномного разнообразия последовательностей, HBV в настоящее время классифицируются на восемь генотипов (A-H) и многочисленные субгенотипы, которые показывают различные географические распределения [55]. Все генотипы предположительно являются в первую очередь результатом рекомбинационных событий [56]. В меньшей степени эволюция HBV также обусловлена накоплением точечных мутаций [56]. Несмотря на то, что HBV широко распространен и хорошо изучен, происхождение и эволюционная история HBV все еще неясны и противоречивы [56, 57]. HBV у приматов, например у шимпанзе и горилл, филогенетически тесно связан с изолятами HBV человека и в то же время отличается от них, поддерживая представление об африканском происхождении вируса [57]. Молекулярно-часовой анализ, датированный происхождением HBV, привел к противоречивым оценкам с некоторыми из них еще около 400 лет назад [58]. Эти наблюдения вызвали сомнения в пригодности подходов молекулярных датировок для реконструкции эволюции HBV [59]. Более того, исследования древней ДНК мумий, инфицированных HBV, начиная с 16 века н.э., выявили очень тесную взаимосвязь между древними и современными геномами HBV [60], что указывает на удивительное отсутствие временных генетических изменений в вирусе за последние 500 лет [61]. Поэтому необходимы диахронические исследования древней ДНК HBV, в которых исследуются как изменения вирусного генома во времени, так и происхождение и возраст археологических образцов, чтобы лучше понять происхождение и эволюционную историю вируса [61].

Похоже, что древние вирусы представляют собой отдельные родословные, которые сегодня не имеют близких родственников и, возможно, вымерли. Наши результаты раскрывают огромный потенциал древней ДНК из человеческих скелетов для изучения многолетней эволюции вирусов, переносимых с кровью. Недавние исследования показали, что этот вирус, передаваемый половым путем

и перинатально, инфицировал людей на протяжении тысячелетий и позволил получить первое представление о его прошлом многообразии и распространении [62].

HBV передается при контакте с биологическими жидкостями, главным образом в половом и перинатальном случаях [50] и не имеет известного экологического или животного резервуара. Поэтому его распространение тесно связано с миграциями людей, сформировали генетическое разнообразие этого вируса, который в настоящее время классифицируется на десять генотипов (А-Ј) [63]. Однако временная и географическая картина древних геномов вируса гепатита В в настоящее время ограничена, что оставляет многие вопросы без ответа.

Технологические достижения, которые позволяют проводить последовательное секвенирование вирусных геномов, а также биоинформатические анализы таких данных генома, в значительной степени расширили наши знания истории эволюции вирусов гепатита человека. Таким образом, за исключением вируса гепатита D, близкие или дальние родственники этих патогенов человека были идентифицированы у ряда домашних и диких млекопитающих [63].

В 2018 году были реконструированы геномы средневекового и неолитического штаммов HBV и доказано, вирус существует в Европе на протяжении более 7000 лет. Ученые пришли к выводу, что скорее всего эти древние вирусы представляют особые линии, которые сегодня не имеют близких родственников и, возможно, вымерли. Эта работа представляет собой огромный потенциал древней ДНК из человеческих скелетов для изучения долгосрочной эволюции переносимых кровью вирусов [49].

1.5 Общая характеристика возбудителя чумы - *Yersinia pestis*

Чума - зоонозная болезнь грызунов, вызванная бактериальным патогеном - грамотрицательной бактерией *Yersinia pestis*, является возбудителем бубонной, легочной и септической чумы, которая произошла от близкородственного экологического предка *Yersinia pseudotuberculosis* [64]. Хотя эти два вида четко различимы с точки зрения их потенциала вирулентности и механизмов передачи, их нуклеотидная геномная идентичность достигает 97% среди хромосомных белков-кодирующих генов [65]. Кроме того, они разделяют вирулентность плазмиды pCD1, которая кодирует систему секреции III типа, общую для трех известных патогенных *Yersinia*: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Четкий механизм передачи и патогенность *Y. pestis* обусловлены уникальным приобретением двух плазмид, pPCP1, которые способствуют развитию инвазивного потенциала бактерии [66], и pMT1, который участвует в колонизации блох [67, 68], а также псевдогенизацией или потерей хромосомного гена на протяжении всей истории его эволюции [69].

В произведениях таких писателей, как Аретей из Каппадокии (середина I-века нашей эры), Руф Эфесский (конец I века н.э.) и Орибасиус (конец IV-века нашей эры), чума появляется не как болезнь, которая наблюдалась, по слухам

издалека в стороне Средиземного моря [70]. Они часто ссылались на случаи Египта и Ливии, реже Сирии, где у больных и умерших были злокачественные бубоны. Затем, начиная с 541 г., когда чума уже стала описываться как болезнь, было дано точное описание симптомов чумы (во время правления императора Юстиниана), позже известной как «Чума Юстиниана» или «Юстинианская чума» [71]. Это была первая зафиксированная пандемия чумы (VI-VIII век). Исследования палео-ДНК древних штаммов чумы продемонстрировали, что эта бактерия вызывала инфекционные заболевания у людей в последние 5000 лет [23], в том числе вызывала самые разрушительные исторические пандемии [71, 72]. Первые исторически задокументированные вспышки второй пандемии чумы, относятся к 1346 году и зарегистрированы в регионах Нижнего Поволжья и Черного моря [73, 74]. Далее эпидемия чумы, названная «Черной смертью», распространилась по всей Европе (1346-1353 гг.). Отдельные вспышки чумы в Европе наблюдались вплоть до конца XVIII века [67, 68]. Третья пандемия чумы связана с XIX веком [69], она произошла в провинции Юньнань (1855 г.) и вызывала бубонную и легочную форму заболевания. За несколько десятилетий она распространилась по всему миру, исключая полярные регионы и Австралию.

Сегодня ежегодно регистрируется несколько тысяч случаев человеческой чумы из стран Азии, Африки и Америки, и большинство из них, как полагают, связаны с местными резервуарами чумы в дикой природе [70] и поддерживается популяциями лесных грызунов [71].

С 1990 по 2002 год в природных очагах чумы на территории республики зарегистрировано 19 случаев чумы человека и 2 случая бактерионосительства. В Казахстане диагностирована чума в формах бубонной и бубонно-септической. Использование лечения по новой схеме резко снизило летальность от чумы. Живая аттенуированная вакцина *Y. pestis* EV, доступная для людей и верблюдов, применяется как основная профилактическая мера в природных очагах чумы. Эпидемиологическая значимость заболевших верблюдов остается высокой. В анализируемый период в 5 случаях заражение произошло в результате насильственного убоя верблюдов. 11 человек (57,8%) заразились через укусы блох. Среднеазиатский очаг пустынной чумы все еще остается наиболее активным, и его потенциал для начала эпидемии возрастает в связи с усилением антропогенного воздействия. Все эти изменения происходят на фоне уменьшения эпидемиологических наблюдений в естественных очагах чумы [72].

На данный момент чума является энзоотической во многих частях Азии, Африки, Северной и Южной Америки. Его естественными резервуарами обычно являются грызуны, но домашняя мышь может выступать в качестве главного связующего между лесным резервуаром и людьми [75]. Помимо широко признанного исторического значения, чума теперь может быть классифицирована как новая болезнь. Изменения в землепользовании во многих частях мира увеличивают вероятность взаимодействия между лесными грызунами и людьми, а также между лесными и домашними грызунами.

В виду того, что количество опубликованных геномов древних штаммов *Y. pestis* остается ограниченным [22], до сих пор не охарактеризованы и остаются

гипотетическими источниками известных пандемий чумы и маршруты, по которым бактерия распространялась по Евразии и другим континентам, также как и вопросы, связанные с путями переноса бактерий через животных. Не ясным остается качества и количество древних штаммов *Y. pestis*, ответственных за многочисленные вспышки чумы в Европе и Азии, включая массовые эпидемии [67, 68].

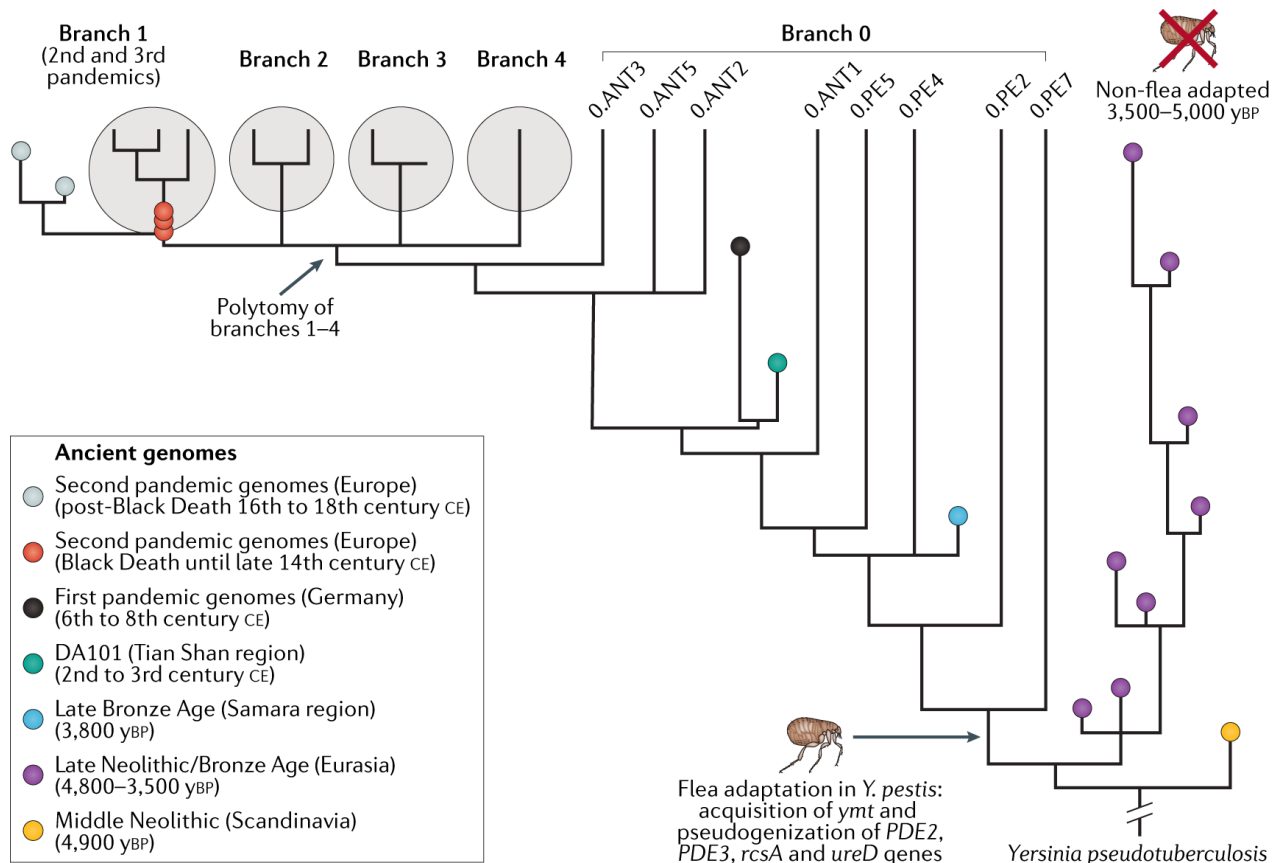
На сегодняшний день идентифицированы четыре древние линии *Y. pestis*, которые можно отличить по геному на основе их адаптации к блохам, являющим главным переносчиком современной чумы. Нам известно, что блохи играют главную роль передаче чумы в популяциях грызунов, которые могут выступать в качестве резервуаров, тем самым попадая в человеческие популяции [88, 89]. Самые древние линии *Y. pestis* [76, 77] относятся к позднему неолиту (preLNBA-линии), широкое распространение чумная палочка получила в период от позднего неолита до бронзового века (LNBA-линии) [23, 78]. LNBA-линии имеют генетический фон, который был интерпретирован как несовместимый с передачей блох через блокирование передней кишки (линии LNBA-). Однако недавно выявленная древняя линия из Испании, также датируемая бронзовым веком, представляет все генетические адаптации для высокоэффективной формы передачи блох [47] (линия LNBA+, знак «+» указывает на адаптацию к блохам как переносчикам). Удивительно, что оба варианта (LNBA- и LNBA+) сосуществовали на протяжении тысячелетий и могли занимать разные ниши. Однако остается неясным, как различные формы *Y. pestis* заражали людей в доисторический период и как возникшие заболевания проявлялись в человеческой популяции. Остается неизвестным, может ли экология и передача чумы в том виде, в котором мы знаем ее сегодня, служить моделью для понимания ее проявления в прошлом.

В Казахстане и других странах Центральной Азии бактерия *Yersinia pestis* циркулирует в природных популяциях песчанок, которые являются источником случаев бубонной чумы у человека. Анализ полевых данных, собранных в период с 1955 по 1996 год, показывает, что чума вторгается, исчезает и вновь зарождается в ответ на колебания численности ее основного хозяина-накопителя - большой песчанки (*Rhombomys opimus*). Это редкий эмпирический пример двух типов порогов изобилия для инфекционных болезней - инвазии и персистенции - действующих в одной популяции диких животных [79].

Споры о том, как бактерия *Yersinia pestis* вновь появляется после многолетнего отсутствия в Пребалхашской области Казахстана, продолжаются уже полвека, но механизм пока не ясен. Одна из теорий заключается в том, что чума сохраняется в своем резервуаре-хозяине (большой песчанке) в так называемых "горячих точках", небольших регионах, в которых условия остаются благоприятными для размножения чумной палочки, в то время как в целом по области условия становятся неблагоприятными. Площадь очагов, необходимая для сохранения чумы, настолько велика, что она вряд ли была бы пропущена существующим эпиднадзором за чумой. Это говорит о том, что сохранение чумы в этом регионе не может быть объяснено исключительно

наличием очагов, поэтому следует рассмотреть и другие гипотезы, такие как выживание чумной бактерии у других видов-хозяев, а также резервация блох в почве [73].

На рисунке 1 представлено филогенетическое древо, которое наглядно показывает эволюционную историю *Yersinia pestis*, основанную как на древних, так и на современных геномах. Древние штаммы, ранее характеризовавшиеся филогенетическим анализом, представлены цветными кругами описаны в примечании.



Примечания: желтым цветом показан геном среднего неолита; фиолетовым цветом показаны геномы позднего неолита и бронзового века (LNBA); синим цветом показан геном позднего бронзового века (RT5), включающий в себя признаки адаптации блох; а до-юстинианский, II век н.э. (н.э.), геном показан зеленым; геномы первой чумной пандемии показаны черным; геномы второй чумной пандемии, XIV век н.э. показаны красным; и геномы после черной смерти (до XVIII века н.э.) показаны серым цветом.

Рисунок 1 - История эволюции *Yersinia pestis* [29]

В настоящее время эволюционное древо бактерии *Yersinia pestis* характеризуется пятью основными филогенетическими ветвями (рисунок 1). Предковая, «нулевая» ветвь (ветвь 0) включает штаммы, распространенные в Китае, Монголии и на территориях бывшего Советского Союза. Концевые ветви (ветви 1–4), образовались в результате миграций населения и быстрого роста численности популяций Евразии. Сегодня эти ветви встречаются в Азии,

Африке и Америке [74]. Их широкое распространение в основном обусловлено географической широтой ветви 1, связанной с третьей пандемией чумы. Линии ветвей 1-4 распространились по всему миру в XIX и XX веках [80]. До сих пор они являются причиной более ограниченных эпидемий, например, таких как Мадагаскарские вспышки (с начала XX века и до настоящего времени).

Современная медицина по большей части способна успешно изолировать случайные вспышки чумы, однако угроза эпидемий остается. Это диктует необходимость тщательного эпидемиологического контроля и молекулярно-генетического мониторинга новых мутаций *Y. pestis*. Лучшее понимание эволюции геномов *Y. pestis*, ее мутаций, обеспечивающих смену хозяев, вирулентность и адаптацию к иммунитету человека помогло бы давать прогнозы новых вспышек, сделав возможным раннее предупреждение и лечение болезни.

Современные знания об экологии *Y. pestis* позволяют предположить, что чума в значительной степени полагается на вектор блох для его энзоотической передачи через популяции грызунов, которые представляют его основные резервуары [74].

Самый ранний ген *Y. pestis*, содержащий все приспособления, необходимые для эффективной передачи, был обнаружен у особи в Самарской области (Россия) за 3800 лет до настоящего времени [47], что позволяет предположить, что бронзовый век был, возможно, решающим периодом для развития эпидемического патогена, известного нам сегодня. Однако это не объясняет, как передавались более ранние формы. Примечательно, что передача через блох не является единственной документированной формой распространения чумы: легочная чума - это форма заболевания, которая может возникнуть в результате прямого контакта человека с человеком лишь при нескольких зарегистрированных вспышках [80] а случаи заболевания чумой, как известно, были вызваны обращением с инфицированными животными или их приемом в пищу [81, 82].

На протяжении всего этого процесса одной из наиболее важных эволюционных адаптаций, связанных с его патогенностью, была его способность колонизировать членистоногих, и комбинацией хромосомных и плазмидных локусов [68, 69]. Эти генетические изменения являются центральными для наиболее распространенной «бубонной» формы болезни, когда бактерии проникают в организм через укус инфицированной блохи, перемещаются через лимфу к ближайшему лимфатическому узлу и размножаются, уклоняясь от иммунной защиты хозяина. Недавние геномные исследования древней *Y. pestis* выявили его самые ранние известные варианты в Евразии в период позднего неолита/бронзового века (LNBA), которые показывают генетические характеристики, несовместимые с адаптацией членистоногих. Молекулярно-генетический анализ геномов LNBA-линий *Y. pestis* показал неспособность к эффективной передаче через блох (ген трансмиссии *ymt*), однако альтернативная мутация *ymt* гена, известная для штамма бронзового века из Испании могла обеспечить независимый способ распространения *Y. pestis* через членистоногих [81, 23, 83].

Анализ древней ДНК (палео-ДНК) жертв эпидемии XIV-XVIII веков выявил штамм *Y. pestis* (1346 г., Нижнее Поволжье), ответственный за начало второй пандемии чумы [84-86]. Эти исследования подтвердили исторические данные, предполагающие, что первоначальная волна эпидемии «Черной смерти» проникла в Европу через юго-западную часть современной России [21, 86]. Кроме того, для эпидемии «Черной смерти» была охарактеризована эволюционирующая от первоначального штамма (из Нижнего Поволжья) линия *Y. pestis*, которая распространилась по всей Западной Евразии и ее окрестностям между XIV и XVIII веками [86-89], и выявлена связь между эпидемиями чумы XIV века и современными штаммами *Y. pestis* [88]. Несмотря на вышеупомянутый прогресс в исследовании древних линий *Y. pestis* в человеческих останках, географическое происхождение Второй пандемии чумы и линии, филогенетические предшественники штамма из Нижнего Поволжья остаются не определенными. С генетической точки зрения этот эволюционный скачок мог быть связан со звездной диверсификацией четырех линий *Y. pestis* (рисунок 1, ветви 1-4), потомки которых в настоящее время разбросаны по всей Евразии, Африке и Америке. Хотя линии, являющиеся предками этой диверсификации (разделение ветвей 1-4), сегодня идентифицированы в Центральной и Восточной Азии [90, 91], прямые данные о палео-ДНК из этих регионов отсутствуют. Поскольку большинство исследований по второй пандемии чумы проведено при исследовании массовых захоронений в Европе, а наличие *Y. pestis* в древнем материале из Центральной Евразии отсутствуют, в литературе господствует евроцентрический взгляд на источники пандемии «Черной смерти» [85, 92, 93]. Археологические свидетельства средневековых чумных эпидемий в Центральной Азии и, в частности, в окрестностях Иссык-Куля (Кыргызстан), тем не менее, очевидны [94]. Однако, исследований патогенных микроорганизмов и вирусов в останках людей, населявших территории Центрально-Евразийской степи от эпохи бронзы до эпохи средневековья практически не проводилось. Это обуславливает необходимость проведения таких исследований для уточнения мировых источников происхождения возбудителей не только чумы, но и других особо опасных и инфекционных заболеваний человека и животных, а также для получения сведений о путях распространения инфекций и связанных миграций древнего населения Евразии.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследований

Объектами исследования были образцы зубов 360 древних индивидов человека, датированных с VII века до н.э. по XIV век н.э.

2.1.1 Сбор образцов зубов древних индивидов для палеогенетического анализа

Для палеогенетического анализа древних форм патогенов из костного материала отбирали цельные зубы поскольку патогенные микроорганизмы и вирусы лучше сохраняются в пульпе зуба. При отборе древних образцов для анализа ДНК акцент делали на множественные захоронения, поскольку шанс найти древние патогенные микроорганизмы в массовых захоронениях больше. В случае отсутствия в черепе цельных зубов, отбирали фрагменты губчатой ткани височной кости. В случае отсутствия черепа, отбирали фрагменты длинных костей.

Согласно договору с Институтом археологии им. А.Х. Маргулана, сбор образцов проводили в коллекции Лаборатории антропологии под руководством антрополога Егора Китова. При отборе проб учитывали сохранность костного материала и зубов, а также наличие археологических и антропологических описаний. В результате для анализа были отобраны образцы зубов 172 древних индивидов, датированных с VII века до н.э. по I век н.э. 27 образцов были собраны из исторического факультета КазНУ им. аль-Фараби.

Образцы зубов 3-х древних особей Бахмутинской культуры (III-V века н.э.) были переданы археологом Руслановой Р.Р. из Уфы (Башкирия). Археологические раскопки Бахмутинской культуры были проведены в период с 1958-1991 гг.

Для отбора других проб с территории современного Казахстана и прилегающих территорий России и Кыргызстана, была проведена работа с каталогом Краниологической и остеологической коллекций Научно-исследовательского Института и Музея антропологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия) [23]. В Приложении 1 приведен пример работы с каталогом и археологические описания некоторых образцов. Исходя из представленных данных был подготовлен список необходимых для моего исследования образцов с территорий Казахстана, Кыргызстана и России, на которые был составлен запрос в дирекцию Научно-исследовательского Института и Музея антропологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. В ходе командировки были собраны образцы зубов 151 древнего индивида, представляющие захоронения датированные с IV века до н.э. по IV века н.э. Кроме того, от ученого из Шотландии доктора, профессора Филипп Славина, который проанализировал исторические сведения по могильникам Чуйской долины, нами была получена ценная информация о позднесредневековых Несторианских кладбищах Кара-Джигач и Бурана, расположенных в Чуйской

долине, недалеко от озера Иссык-Куль в современном Кыргызстане. Надгробия данных кладбищ были снабжены надписями, свидетельствующими о возможной эпидемии чумы, датированной 1338–1339 гг., что предшествует «Черной смерти».

Рисунок 2 демонстрирует процесс отбора биоматериалов для исследования.



- а) Сбор образцов из Института археологии им. А.Х.Маргулана;
- б) Хранилище НИИ и музея антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова;
- в) Изъятие зуба для исследования

Рисунок 2 – Сбор образцов для исследования

Образцы зубов 7 древних особей из краниологической коллекции Несторианских (при-Бишкекских) кладбищ XIV века (Кара-Джигач и Бурана) были отобраны в ходе отдельной командировки на базе Музея антропологии и этнографии имени Петра Великого Российской академии наук - Кунсткамера (Санкт-Петербург, Россия).

Всего собрано 360 костных образцов, из них 333 были представлены зубами, оставшиеся 27 были костными фрагментами.

2.2 Методы анализа

2.2.1 Предобработка и подготовка образцов для выделения палео-ДНК

Самой главной проблемой, которая затрудняет работу с древней ДНК, является загрязнение исследуемого материала современной ДНК. Во избежание контаминации древних образцов современными ДНК, древние костные фрагменты и зубы облучали ультрафиолетовым светом с двух сторон в течение 30 минут с каждой стороны.

Образцы зубов затем разрезали в области цементно-эмалевого соединения. Все манипуляции, связанные с выделением ДНК из древних костей и зубов, проведены в специализированной лаборатории для палеогенетических работ с применением необходимых мер для предотвращения контаминации образцов современными ДНК. В образцах зубов с помощью стоматологической дрели высверливали около 50 мг порошка с внутренней камеры пульпы и корневых каналов.

2.2.2 Выделение образцов палео-ДНК

ДНК выделяли из 50-100 мг зубного порошка, полученного с внутренней камеры пульпы и корневых каналов (рисунок 3).

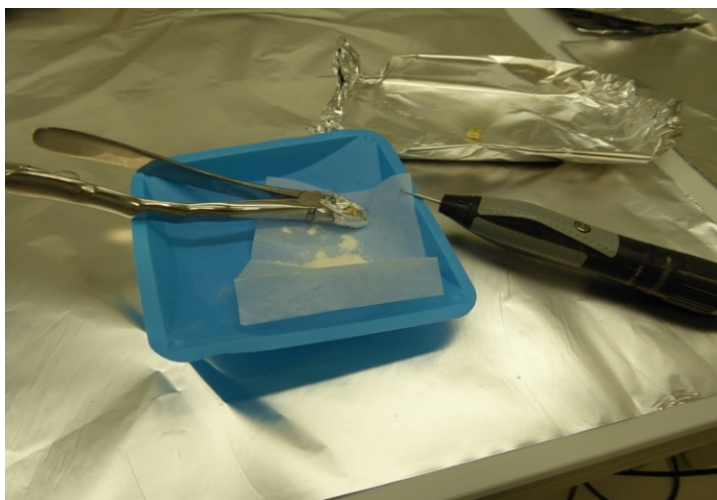


Рисунок 3 - Подготовка зубного порошка для выделения палео-ДНК

Выделение образцов палео-ДНК, подготовку растворов для выделения древней ДНК, инкубацию проводили согласно протоколу выделения древней ДНК [95, 96]. Порошок инкубировали 1 мл экстракционным буфером (0,45 М ЭДТА, 0,25 мг/мл протеиназы К, рН 5-6) в течение 16 ч и более при 37°C при ротации. После центрифугирования в течение 2 мин при 15000 оборотов супернатант смешивали с 10 мл буфера для связывания (5М гуанидин-гидрохлоридом, 40% изопропанолом) и 400 мкл 3М ацетата натрия. Для связывания ДНК использовали спиновые колонки на основе кремнезема High

Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche, Crawley, UK). После двойной промывки на колонках, ДНК элюировали в два этапа в буфере ТЭТ (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, 0.05 % Твин-20, рН 8) до конечного объема 100 мкл. Во избежание контаминации, с учетом временных затрат на обработку образцов, за 1 цикл выделяли максимально 24 образца палео-ДНК, где обязательно использовали 1 или 2 отрицательных контролей (молекулярно чистая вода) и один положительный контроль (предварительно оцененная ДНК плейстоценового пещерного медведя) [12].

2.2.3 Приготовление библиотек ДНК и высокопроизводительное секвенирование

Из выделенных ДНК (пункт 2.2.2) были подготовлены библиотеки для полногеномного секвенирования на платформе HiSeq (Illumina). При подготовке библиотек для уменьшения повреждений ДНК в результате дезаминирования цитозина в древних ДНК использовали фермент USER (New England Biolabs (NEB)), что является необходимым требованием при работе с палео-ДНК.

По 25 мкл экстракта палео-ДНК из каждого образца использовали для получения библиотек фрагментов двухцепочечной ДНК (75 п.о.) 3-х этапного протокола [88] с начальной обработкой с использованием фермента урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) и эндонуклеазы VIII [2]. Для этого, 25 мкл выделенной ДНК смешивали с 0.072 U USER фермента в буфере Tango (Life technologies), 1.2 мМ АТФ, 0.2 мг/мл BBSA, 0.4 мМ dNTPs и инкубировали 30 мин при 37°C и 1 мин при 12°C. Реакцию останавливали, добавив 0.1343 U Uracil Glycosylase Inhibitor (UGI, NEB), и ещё раз инкубировали 30 мин при 37°C и 1 мин при 12°C. После добавления 0,515 U полинуклеотид-киназы T4 (NEB) и 0.085 U T4 полимеразы (NEB) смесь инкубировали при 25°C в течение 20 минут и 12°C в течение 10 минут. ДНК очищали с помощью набора для ПЦР-очистки MinElute (Qiagen) и элюировали в 20 мкл элюирующего буфера EB, содержащего 0.05 % Tween-20 (EBT).

По 18 µl пропущенного через колонку MinElute раствора использовали для второго этапа - лигирования адаптеров к обоим концам фрагментов ДНК. Финальным этапом подготовки библиотеки ДНК была «реакция заполнения», когда 5'-выступы адаптеров были лигированы с адаптерами. Элюат смешивали с 0.25 мкМ адаптерами последовательности и 0.125 U Quick Ligase (NEB) в буфере Quick Ligase и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. ДНК очищали, как описано выше, и элюировали в 22 мкл EBT. Затем ДНК инкубировали 0.4 U Bst полимеразой и 0.5 мМ dNTPs в изотермическом буфере (NEB) при температуре 37°C в течение 30 мин и 80°C в течение 10 мин. Все библиотеки были дважды инкубированы с уникальной парой индексов длиной 8 nt в реакциях 0.025 U Pfu Turbo Polymerase (Agilent Technologies), 100 мМ dNTPs, 0.3 мг/мл BSA и 0.2 мкМ индексов в буфере Pfu Turbo в термоциклере со следующей программой: 2 минуты при 95°C, 10 циклов по 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 58°C и 1 минута при 72°C, и окончательным удлинением 10 минут при 72°C.

Приготовление библиотек и их индексирование осуществляли в суперстерильных условиях. Амплификацию библиотек проводили в условиях ПЦР-лаборатории.

Секвенирование эквимольных пулов библиотек палео-ДНК проведено методом дробовика с применением MPI-SHN на платформе Illumina HiSeq 4000 с использованием одностороннего набора для секвенирования с 76 циклами.

2.2.4 Тест на ингибирование qPCR в древних образцах

Для анализа ингибирования qPCR, как правило, используют специфичные стандарты – ДНК-мишени, на которые будет нацелен скрининг. В нашем случае в качестве стандарта была использована полная последовательность *pla* гена *Y.pestis*, включающая спейсерные межгенные участки с двух концов [97]. Стандарт (10 нг/мкл) использовали в разведении 0.001 нг/мкл для последующей амплификации. Все древние образцы ДНК для аналогичной qPCR использовали в концентрации 20 нг/мкл. Смесь для qPCR объемом 20 мкл содержала 10 мкл DynNAmo SYBR Green qPCR kit (Thermo Fisher Scientific, США), по 1 мкл специфических к *pla* гену паймеров (IS7 – 5'- ATGCCCTGAAAGACGTGG -3' и IS 8 – 5'- GGGCGCTCATTTCTGTTGTTT- 3'), 1 мкл разведенного стандарта и по 2 мкл тестируемых образцов палео-ДНК или молекулярно чистой H₂O (контроль). Тестировали от 18 до 64 образцов в день. О наличии или отсутствии ингибирования qPCR судили по показателю нормализованного относительного значения экспрессии гена ΔCq : > 0,5 – нет факторов ингибирования, < 0,5 – наличие ингибиторов.

2.2.5 qPCR для первичного скрининга *Y.pestis*

Для скрининга ДНК *Yersinia pestis* в образцах палео-ДНК использовались видоспецифичные анализы ПЦР в режиме реального времени [98, 99].

Первичный скрининг всех образцов выделенной ДНК из археологических образцов, где были зубы (в количестве 332) проводился для оценки сохранности ДНК *Y. pestis* с использованием qPCR-анализа [98], специфичного для (*pla*) гена активатора плазминогена, который находится на высококопируемой pPCR1 плазмиде *Y. pestis* [72]. Анализ был выполнен с помощью аппарата Roche Lightcycler с использованием отрицательных контролей (от выделенной ДНК, и отрицательный контроль для ПЦР). Стандарты были разбавлены в 10-кратном последовательном разбавлении до 2.23 копий/мкл в ТЭТ буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА и 0.05% Твин. qPCR проводили в 20 мкл реакциях, состоящих из 1 единицы 10-кратного ПЦР буфера II, 2,5 mM MgCl₂, 250 мкM на dNTP, 5% диметилсульфоксида (ДМСО), 0,75 мг/мл бычьей сывороточного альбумина (БСА), 300 нM на каждый праймер [95], 1 единицы 20-кратного красителя EvaGreen (Biotium), 0,05 Ед/мкл ДНК-полимеразы Amplitaq gold (Applied Biosystems) и 2 мкл выделенной ДНК.

Все выделенные образцы палео-ДНК были протестированы на наличие ДНК *Y.pestis* с помощью ПЦР в режиме реального времени на аппарате

LightCycler® 96 (Roche, Мангейм, Германия). Для QPCR использовали около 50 нг древней ДНК.

Смесь для qPCR объемом 20 мкл содержала 50 нг палео-ДНК, 1X ПЦР буфер 2, 2.5mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP mix, 5% DMSO, 0.75 mg/ml BSA, 1X EVA green, по 300 нМ специфических праймеров для ДНК *Y.pestis* (pla_Ef и pla_Er) и 0.05 ед./мкл ДНК-полимеразы Amplitaq gold (Promega, Madison, USA). Режим ПЦР: предварительная инкубация - 95°C в течение 12 минут; 3 этапа амплификации - 95°C в течение 30 секунд, 61°C в течение 30 секунд и элонгация - 72°C в течение 30 секунд, плавление - 95°C в течение 21 секунды, отжиг - 60°C в течение 30 сек, остановка - 90°C в течение 1 секунды, окончательное охлаждение при 37°C. Анализ ПЦР в реальном времени для скрининга *Y.pestis* и тест на ингибирования для всех образцов проводился на платформе LightCycler 96 (Roche, Мангейм, Германия). Далее были сделаны библиотеки для полногеномного секвенирования.

2.3 Обработка данных биоинформатическими методами

Биоинформатическая обработка данных, полученные после полногеномного секвенирования на платформе HiSeq (Illumina) обрабатывались с использованием нескольких пакетов программного обеспечения.

Данные сопоставлялись с пользовательской базой данных RefSeq Genome, включающей все полные геномы вирусов и бактерий (по состоянию на 2017 г.). Параметры картирования учитывали как минимум 90% идентичности (--minPercent Identity) и верхнее процентное значение (--topPercent), а также минимальная поддержка (--minSupport) на 1 параметр с режимом BlastN. Все остальные параметры были использованы в настройках по умолчанию. Обработку сырых данных проводили в программе EAGER [100]. Затем результаты были отфильтрованы в программе MaltExtract в HOPS [28]. Кроме того, результаты картирования MALT были визуально проверены в анализаторе MEtaGenome Analyzer (MEGAN) [101].

Биоинформационный анализ наличия древних ДНК патогенных микроорганизмов и вирусов проводили на основе данных полногеномного секвенирования образцов палео-ДНК с использованием референсных геномов для каждого патогена и программного обеспечения EAGER [100] и HOPS [28].

Для анализа полученных данных (графические результаты и филогения) использованы специфические программные пакеты MEGAN, BEAST и R-Studio и другие [100-105].

2.4 Полногеномный гибридационный захват ДНК патогенов

Для особо актуальных патогенов – *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica* Hepatitis B virus (HBV), проводили полногеномный гибридационный захват ДНК патогенов (Capture) с использованием специфических зондов. Зонды создавались на основе референсных геномов *Yersinia pestis* - *Y. pestis* CO92 (NC_003143.1) [106, 107], *Salmonella enterica* - *Paratyphi C* RKS4594 (Acc#: NC_012125) [45, 108]. Для HBV в виду высокой частоты мутирования

референсный геном создали на основе *de novo* сборки чтений последовательностей ДНК HBV в древних образцах с помощью программы Novoplasty Dierckxsens [16] в диапазоне генома от 3000 до 3500 п.о.

Набор зондов для захвата генома *Y. pestis* разработан с комбинацией геномов *Y. pestis*, включающей хромосому CO92 (NC_003143.1), плазмиду CO92 pMT1 (NC_003134.1), плазмиду CO92 pCD1 (NC_003131), KIM 10 хромосому (NC_004088.1), F-хромосому (NC_009381.1) и *Y. pseudotuberculosis* IP 32952 хромосома (NC_006155.1) в качестве шаблона.

Библиотеки, предположительно позитивные *Y. pestis* и *S. Enterica*, амплифицировали до концентрации 200-400 нг/мкл со специфическими праймерами IS5/IS6 и обогащали для захвата целых геномов *Y. pestis* [81] и *S. enterica* [45] с использованием 96-луночных планшетов в двух раундах. После чего, библиотеки были просеквенированы на платформе Illumina HiSeq 4000. Сырые чтения последовательностей присваивались соответствующим библиотекам на основе последовательных индексов P7 и P5 (допускающих одно несоответствие на индекс). Показания картировались с помощью опции CircularMapper с параметром несовпадения (-n) 0,01, качественной фильтрацией (-q) 30 и коэффициентом удлинения 500. Далее было дедулицировано с помощью Markduplicates (часть инструментов Picard; <http://broadinstitute.github.io/picard/>) и выровнено по отпечаткам с помощью инструментария GATK [110]. Полученные в результате бинарные файлы карт выравнивания (BAM) затем использовались для создания таблиц с подробным описанием числа и нуклеотидного состава чтений, охватывающих каждую геномную позицию с помощью Pysamstats (<https://github.com/alimanfoo/pysamstats>). Наконец, мы назвали согласованные последовательности для каждого генома, используя трехкратный порог покрытия с правилом большинства 90%. Штрих-коды удаляли путем обрезки 7 п.н. с каждого конца с помощью программы FastX-trimmer v.0.0.1472. Fastq файлы после удаления штрих-кодов загружались в читаемое хранилище. Препроцессированные пары чтения для библиотек были перечислены в файле значений (tsv), отделенном от табуляции, который использовался в качестве входных данных для nf-core/eager вместе с остальными исходными данными. Nf-core/eager был запущен с входом tsv, а следующие процессы были запущены: для оценки качества данных секвенирования была применена программа FastQC v0.11.4. С помощью AdapterRemoval были выполнены адаптерная обрезка, фильтрация коротких (<30bp) или низкокачественных чтений. Дубликаты с помощью Picard Tools v. 1.140 MarkDuplicates [111], объединив различные библиотеки из одного и того же человека и вычислили статистику отображения с помощью Qualimap v. 2.2.1 [112]. Для устранения возможного смещения, вызванного дезаминированием, перед дальнейшим анализом мы удалили поврежденные основания. Это было достигнуто путем удаления 1 п.о. с каждого конца считывания с помощью FastX-триммера. Затем полученные файлы были объединены с показаниями данных, полученными в результате секвенирования тех же библиотек, и объединены для каждого древнего индивида.

В данной работе для полногеномного захвата древних последовательностей ДНК вируса гепатита В впервые была применена *de novo* сборка чтений HBV, которую проводили на основе данных секвенирования палео-ДНК с помощью программы Novoplasty Dierckxsens [109] в диапазоне генома от 3000 до 3500 п.о., допуская 15% несоответствий и 10% пробелов. Далее сравнивали показания с эталонным геномом HBV (GenBank: NC_003977) в программе Geneious 9.1.8. с 5 итерациями сопоставления, что позволяло восстанавливать сильно расходящиеся с эталонной ДНК регионы. В частности, мы проверили согласованность рамок считывания в каждом гене и проблемы с выравниванием вокруг больших расхождений. Предварительные согласованные последовательности были получены из этих выравниваний с использованием 1х порога охвата и правила большинства 50% для того, чтобы получить окончательные консервативные согласованные последовательности, а также статистику охвата и анализа обусловленных временем повреждений ДНК. Полученные в результате *de novo* сборки и предварительные согласованные последовательности использовались в качестве ссылок в программе EAGER [100, 113]. Чтения были сопоставлены с использованием опций CircularMapper с параметром несоответствия (-n) 0,01, качественной фильтрации (-q) 30 и коэффициентом удлинения 500. Отображенные чтения были редуцированы с помощью Markduplicates (часть инструментов Picard; <http://broadinstitute.github.io/picard/>) и выровнены с помощью набора инструментов GATK [110]. Полученные карты двоичного выравнивания (BAM файлы) затем использовались для создания таблиц с подробным описанием количества и нуклеотидного состава операций чтения, охватывающих каждую геномную позицию, с помощью pysamstats (<https://github.com/alimanfoo/pysamstats>). Стоит отметить, что подобный подход был ранее использован для реконструкции древних геномов и повторного анализа данных секвенирования древних геномов патогенов [18, 50]. Далее анализ осуществляли с использованием *de novo* собранной референсной последовательности HBV также, как и в случае с *Y. pestis* и *S. enterica*.

2.5 Филогенетический и статистический анализ

Филогенетический анализ проводили с учетом вновь обнаруженных древних линий патогенных организмов и ранее опубликованных данных по древним и современным линиям патогенов. Так для *Yersinia pestis* в анализ включено 203 современных и 47 древних геномов *Y. pestis* [83]. По HBV – 136 линий, распространенных на территории Евразии и Америки [54-56].

Выравнивание SNP для штаммов *Yersinia pestis* проводили с помощью программного обеспечения MultiVCFAnalyzer v0.85104 (<https://github.com/alexherbig/MultiVCFAnalyzer>). Далее оно было использовано для построения филогенетического дерева в программе MEGA7 [42]. Для анализа молекулярной датировки проводили выравнивание SNP в качестве входных данных для установки в BEAUti, включая средние радиоуглеродные даты всех древних штаммов [103].

Для оценки времени дивергенции и филогении штаммов HBV мы использовали программное обеспечение BEAST v1.10 [104, 114].

Филогенетический анализ проводили с использованием статистической программы BEAST2 [114, 115]. Временной сигнал сопоставлялся для всех штаммов с учетом их возраста и совпадал с радиоуглеродным датированием. На основе радиоуглеродных датировок древних индивидов, использовали программу TempEst v1.5.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tempest/>). Возраст генома использовался в качестве точек калибровки (с использованием среднего значения C14 или археологического датирования и 0 для современных геномов). Для того, чтобы выбрать наиболее подходящую предшествующую модель древа и модель часов, мы выполнили выбор модели, используя выборку пути [32]. Для этого сравнили постоянное, экспоненциальное и байесовские значения [115] с учетом численности населения в группе древних индивидов (5 (Айгылры) или 10 (Кенколь) индивидов с одного археологического места) и исходные данные филогенетического древо (BEAUTi v. 2.5.2). Полученные оценки использовались для сравнения соответствия каждой модели [103]. Для оценки наличия и отсутствия известных факторов вирулентности у *Y. pestis* мы составили файл, содержащий координаты генов на хромосоме (n=115) и плаزمиде pCD1 (n=37), pMT1 (n=6) и pPCP1 (n=1) *Y. pestis* CO92. Выходные bam-файлы затем использовались для расчета процента охвата гена с помощью bedtools v2.25.0 [104] и подготовки данных для R с помощью Generate_bed_files.sh. Полученные файлы bed были скомпонованы вместе с помощью команды cat, и окончательные файлы можно найти на сайте: <https://github.com/aidaanva/LNBAplague/tree/main/Data/Virulence>. Результаты были построены в R [102] с помощью пакета ggplot2 [105]. Кроме того, мы использовали полученные нефильтрованные bam-файлы для изучения наличия хромосомных делеций, используя *Y. pestis* CO92 в качестве эталона. Мы восстанавливали непокрытые регионы из bam-файлов следующим образом: bedtools genomcov использовали для подсчета непокрытых регионов на образец. Код R можно найти здесь: https://github.com/aidaanva/LNBAplague/blob/main/Stone_Age_Plague_v5.Rmd.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Создание коллекции зубов и костных фрагментов древних людей, представляющих известные археологические находки

Древняя ДНК является мощным инструментом, позволяющим делать важные открытия в области биологии, эволюции и истории. Развитие и усовершенствование методов молекулярной генетики и биоинформатики позволяет все больше расширять круг вопросов, которые можно решать с помощью анализа древней ДНК. Палеогенетический анализ, являющийся результатом синтеза археологии, антропологии и молекулярной генетики, позволяет изучать древние ДНК, содержащиеся в биологических останках и ископаемых организмах. С помощью палеогенетического анализа можно не только идентифицировать видовую принадлежность древних ДНК, но и установить эволюционные связи между организмами. По идентификации отдельных мутаций в древних ДНК, при сравнительном филогеографическом анализе можно установить пути географического распространения популяций и описать миграции древнего населения. В совокупности с биоинформационным подходом, включающим анализ древних и современных ДНК, можно раскрыть вопросы генетической истории групп древнего населения Земли, описать характер их взаимоотношений друг с другом и с современными популяциями, производить реконструкцию половой, семейной и социальной структуры древних сообществ человека. Кроме того, палео ДНК-анализ может раскрыть вопросы частной жизни индивидов. Например, дать ответ о причине смерти индивида от какой-либо инфекции, его недугах и предрасположенности к различным заболеваниям. Этому способствует изучение древних патогенных организмов, присутствующих в костном археологическом материале.

Предпочтительным материалом для таких исследований является полость зубов человеческих останков, так как древняя патогенная ДНК хранится в пульпе. Как оказалось, возбудители инфекционных заболеваний, сопровождающихся бактериемией, такие как возбудители чумы, сыпной тиф и т.д., переносятся с кровью во внутренние ткани зубов (пульпы). После смерти больного ДНК этих возбудителей сохраняется там, и, в силу особенностей анатомического строения зубов, проникновение инородных микроорганизмов в пульпу практически не происходит.

Образцы пораженных костных тканей древних людей являются богатым источником палео-ДНК патогенных организмов. К настоящему моменту накоплено достаточно много сведений о выделении некоторых хронических болезнетворных бактерий из пораженного костного материала древних объектов. Так, *Mycobacterium tuberculosis* была выделена из позвонков древних скелетов [22], а *Mycobacterium leprae* была обнаружена в костном материале частей верхней челюсти и в различных длинных костях [49]; *Treponema pallidum subsp. pallidum* и *T. pallidum subsp. pertenue* были идентифицированы в длинных костях [115].

Следует отметить, что методы отбора проб для выделения ДНК для изучения древних патогенных микроорганизмов, как правило, не соответствуют стандартизированной процедуре, отчасти из-за большого разнообразия тканей и, как следствие, стадии прогрессирования заболевания. Кроме того, острые инфекции, передающиеся через кровь, обычно не вызывают диагностических изменений костных тканей, в отличие от тех, которые поражают их хозяев хроническим путем [31]. Следовательно, если инфекции вызвали смертность в острой фазе, как в случае с людьми после эпидемий, у которых нет признаков инфекции на скелете, предпочтительным материалом для исследования были внутренние полости зубных тканей. Считается, что древняя ДНК патогенных микроорганизмов сохраняется в остатках пульпы, вероятно, как часть высохшей крови [98]. Следовательно, сбор образцов зубов оказался успешным для изучения полного генома от древних бактерий, таких как *Yersinia pestis* [21, 87]; *Borrelia recurrentis* [116] и *Salmonella enterica* [45, 108]. Даже *Micobacterium leprae*, которая обычно проявляется заболеванием в хронической форме, была извлечена из древних зубов [49, 115]. Из зубного материала древних индивидов успешно выделяются эукариотические патогены, например *Plasmodium falciparum* [117], а также древние вирусы, такие как вирус гепатита В (Hepatitis B virus - HBV) [50] и парвовирус человека B19 (*Parvovirus - B19V*) [118].

В отличие от популяционного анализа ДНК древних людей, анализ древних патогенных микроорганизмов требует большей выборки объектов и привлекает дополнительные методы лабораторных исследований. Древние образцы для анализа патогенов должны быть не только хорошо охарактеризованы с точки зрения физической антропологии и датировок, но и по типу питания и другим физиологическим особенностям. Согласно требованиям к объему выборки образцов древних людей для анализа древних патогенов необходимо проверить не менее сотни образцов, чтобы обнаружить в них патогенные микроорганизмы. Учитывая этот факт, для нашего исследования мы старались включить как можно больше древних образцов.

Исходя из вышеизложенного, при создании коллекции костных материалов для изучения древних патогенов, обитавших на территории Центрально-Евразийской Степи, мы прежде всего обращали внимание на цельность зубов.

Сбор образцов археологических материалов (фрагменты костных останков и зубы) проводился в 3 местах:

- 1) Институт археологии им. А.Х.Маргулана, Алматы, Казахстан;
- 2) Научный Институт и Музей антропологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
- 3) Музей антропологии и этнографии имени Петра Великого Российской академии наук (Кунсткамера), Санкт-Петербург, Россия.

Институте археологии им. А.Х.Маргулана в Алматы отбор образцов проводила 2 раза (22 ноября и 25 декабря 2018 г.). В результате анализа археологических, антропологических описаний, осмотра останков в отношении

их пригодности для палеогенетических исследований, было собрано 186 образцов зубов древних людей, относящихся к бронзовому и железным векам.

Формируя коллекцию археологических объектов для палеогенетического анализа, мы рассматривали также фонды зарубежных организаций, в которых хранится материал, имеющий отношение к этногенезу казахов, найденный на территории современного Казахстана и прилегающих областей соседствующих стран (Россия, Кыргызстан и др.).

3 образца, собранных в 1958-1991 гг. археологом Руслановой Р.Р., представляющих бахмутинскую культуру (III-V век н.э.) были переданы из Уфы (Башкирия, Россия).

Для сбора образцов из хранилища Научного Института и Музея антропологии МГУ имени М.В. Ломоносова была организована командировка (г. Москва, Россия, с 05.02.2019 по 15.02.2019) совместно с сотрудниками департамента археогенетики Института наук об истории человечества Макс Планка (Йена, Германия). По любезно представленному сотрудниками хранилища каталогу [119] был подготовлен список желательных объектов для анализа, включающий древние останки человека, найденные на территориях Казахстана, Киргизии и России. В результате были собраны зубы 151 древних особей, датированных IV в. до н.э. - IV в. н.э.

По рекомендации профессора Университета Стерлинга в Шотландии, Филиппа Славина, который предоставил список археологических находок, потенциальных источников распространения «Черной смерти» (чумы) в Европе, мы связались с Музеем антропологии и этнографии имени Петра Великого Российской академии наук (Кунсткамера). Поскольку во многих образцах (черепках) из предложенного списка не было зубов, либо их количество было минимальным (1-2 зуба), было отобрано 7 образцов из Несторианских кладбищ (Бишкек, Кыргызстан). Археологом несторианских кладбищ был Пантусов Н., раскопки проводились в период 1885-1886 гг. Данные образцы были переданы в дар в Кунсткамеру в 1888 году из Императорской археологической комиссии.

112 образцов (31%), собранных в ходе экспедиций середины XX века, и 7 образцов из Кунсткамеры (экспедиции второй половины XIX века) представляют 20 различных районов Киргизии. В образцах из Киргизии, датированных от эпохи бронзы до эпохи средневековья, представлены как множественные, так и единичные захоронения.

35 древних индивида (9%) представляли археологические находки, найденные на приграничных с Казахстаном территориях России. Эти образцы датированы железным веком вплоть до первой половины I тысячелетия и представляют материалы, собранные в ходе экспедиций второй половины XX века. Все древние индивиды представляют множественные захоронения, что может быть предпосылкой к поиску древних форм патогенных микроорганизмов, вызывавших эпидемии.

В итоге для исследования было собрано 360 образцов, из них 333 были представлены зубами, оставшиеся 27 были костными фрагментами (рисунок 4).



Рисунок 4 - Процентное соотношение зубов и костных фрагментов древних образцов, взятых для палеогенетического анализа

Большинство образцов представляло множественные захоронения. Рисунок 5 характеризует взятые для анализа образцы в зависимости от вида захоронения.



Рисунок 5 - Процентное соотношение древних образцов, взятых для палеогенетического анализа в зависимости от вида



Рисунок 6 - Карта локализации использованных в анализе археологических находок с учетом временного периода и количества объектов

Выше приведена карта, наглядно показывающая место и временной период собранного материала (рисунок 6). Размер кругов показывает количество образцов, а цвета период, и чем светлее и больше круг, тем древнее и больше образцов в данной местности. Как показано на рисунке 6, большинство образцов (более 57%) были из Казахстана. Локализация их охватывает западную, южную и северо-восточные территории современного Казахстана. Казахстанские образцы в основном относятся к бронзовому и железным векам (вплоть до конца I тысячелетия нашей эры).

Полное описание собранной коллекции образцов зубов и костных фрагментов, использованных в палеогенетическом исследовании, представлено в Приложении 3.

3.2 Анализ выделенных образцов палео-ДНК и их библиотек

Древние ДНК выделялись согласно протоколам, представленным в п. 2.2.1 и 2.2.2. раздела Материалы и методы исследований.

Для выделения древних ДНК использовали все образцы за исключением одного образца (КҮҮ003.А) из кургана 10 могильника Қырықоба. Образец зуба данного индивида не подходил для палеогенетического исследования, так как целостность зуба была нарушена и полость зуба была заполнена грязью. Так, этот могильник был представлен 3 древними индивидами, мы посчитали нужным исключить КҮҮ003.А образец из анализа.

Остальные 359 образцов прошли полный цикл обработки. Полученные образцы палео-ДНК оценивали по следующим параметрам: количество эндогенной ДНК, фрагментация ДНК, степень контаминации.

По количественным и качественным характеристикам полученных палео-ДНК, 332 образца соответствовали требованиям к анализу древних патогенных микроорганизмов. Из них 73 образца по качеству палео-ДНК (полногеномный охват) могли быть использованы для популяционного анализа.

Для 19 образцов, не имеющих точных датировок, но представляющих характерные популяции (захоронения различной географии и культуры) и хорошую сохранность палео-ДНК, наши коллабораторы из Института истории наук о человечестве (Йена, Германия) любезно финансировали радиоуглеродный анализ (C^{14}), который был проведен в Курт-Энгельхерн Центре археометрии (Curt-Engelhorn-Zentrum Archaeometry gGmbH, Mannheim, Germany). Данные по радиоуглеродному датированию включено в общее описание образцов в приложении 8. Остальные данные сохранили для дальнейших исследований. На рисунке 7 можно посмотреть более подробную информацию по направлениям исследований собранной коллекции древних образцов, имеющих отношение к территории Казахстана и прилежащих к Казахстану территорий России и Киргизии.

Все манипуляции, связанные с выделением ДНК из древних костей и зубов, проведены в специализированной лаборатории для палеогенетических работ с применением необходимых мер для предотвращения контаминации образцов современными ДНК.

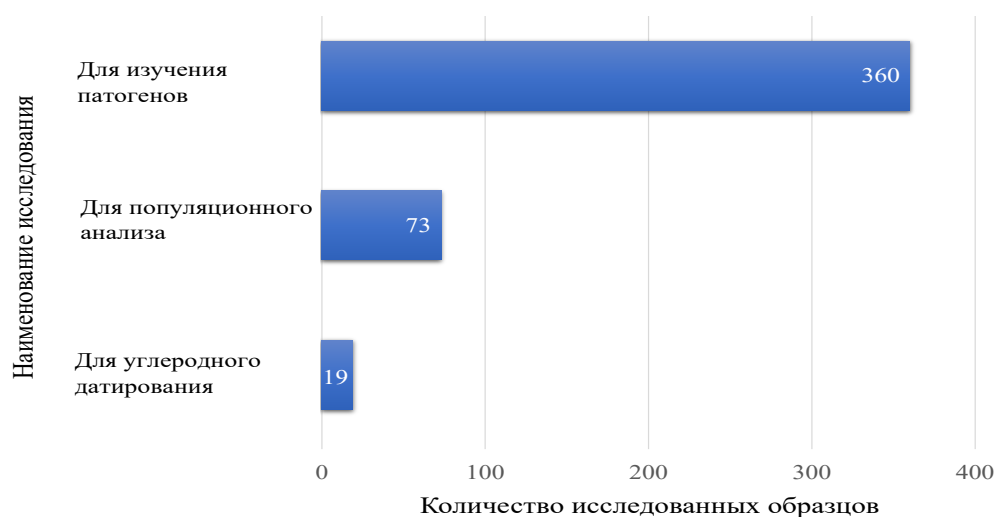
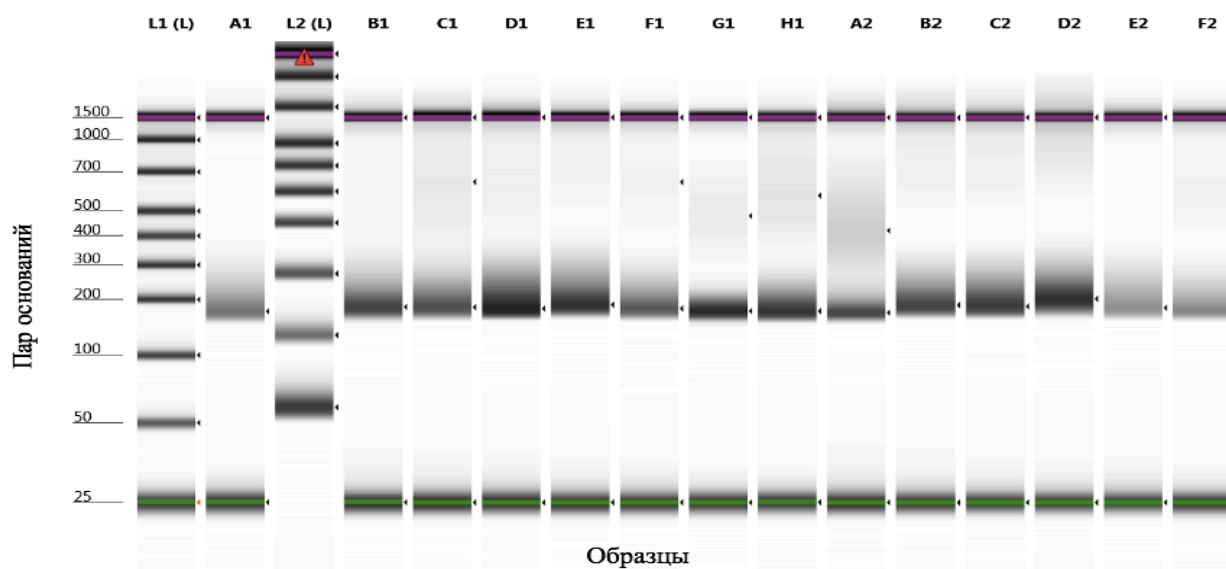


Рисунок 7 - Информация по исследованиям древних образцов

После выделения палео-ДНК были подготовлены ДНК-библиотеки для высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе Illumina (HiSeq 4000/MiSeq, как это описано в разделе «Материалы и методы исследований» (пункт 2.2.5) [120, 121].

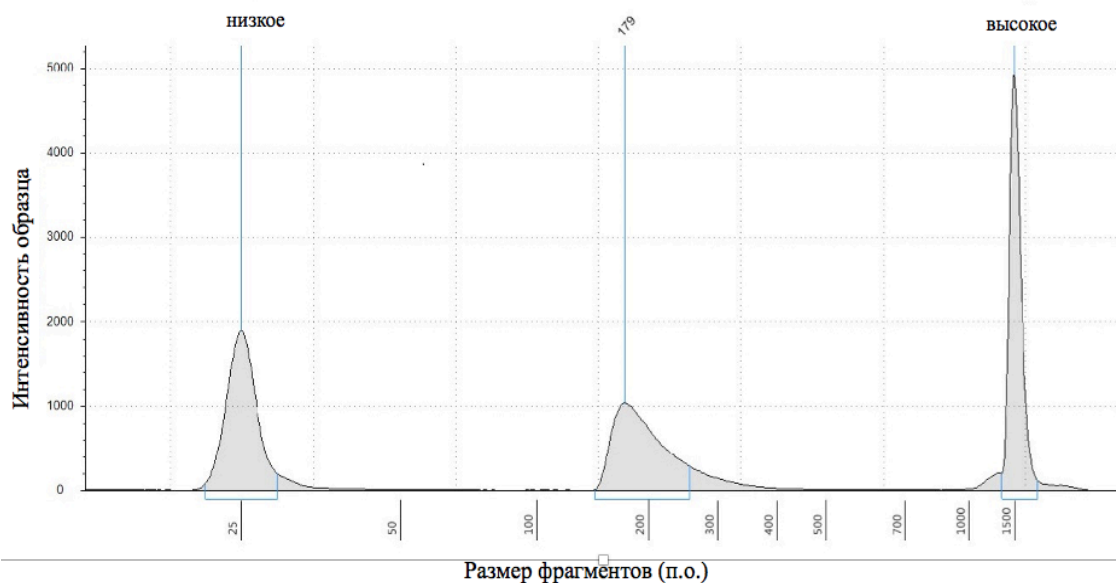
Ниже представлены результаты качественной (рисунок 8) и количественной (рисунок 9) оценки библиотек палео-ДНК.



L1 (L) и L2 (L) – маркерные наборы фрагментов ДНК 25-1500 п.о. (Ladder, Agilent technologies);

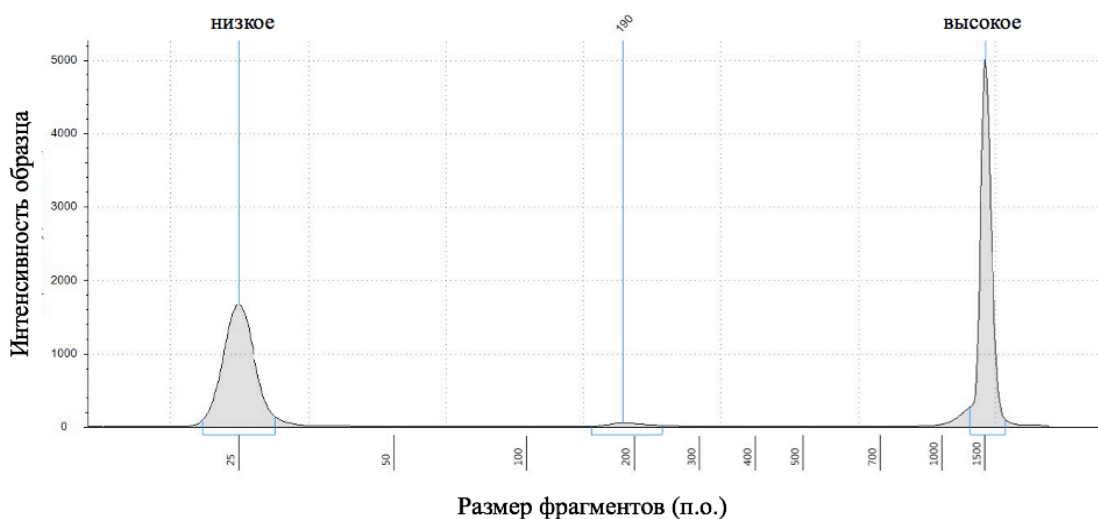
Образцы палео-ДНК: A1 - NUR003, B1 - BKB003, C1 - KNL034, D1 - KNL018, E1 - KKB002, F1 - BSK002, G1 - KZL001, H1 - BKB001, A2 - KEN003, B2 - KNL033, C2 - NZR001, D2 - SRK003, E2 - KKB001, F2 - KNL013

Рисунок 8 – Результаты качественной оценки выделенной палео-ДНК на приборе Tape-Station



Лунка	Концентрация, нг/мкл	Наименование образца (разведение)
A1	5.35	NUR003 (1:10)

а)



Лунка	Концентрация, нг/мкл	Наименование образца (разведение)
B1	0.224	ASU002 (1:10)

б)

- а) Образец палео-ДНК NUR003 (1:10) с концентрацией ДНК - 5.35 нг/мкл;
 б) Образец палео-ДНК ASU002 с концентрацией ДНК - 0.224 нг/мкл

Рисунок 9 – Результаты количественной оценки выделенной палео-ДНК на приборе Tape-Station

Оценку качества и концентрации библиотек палео-ДНК проводили с использованием прибора 4200 TapeStation (Agilent Technologies, США).

Среди всех выделенных образцов палео-ДНК только 4.82% (16 библиотек) показали низкие концентрации ДНК (до 5,63 нг/мкл), концентрации остальных

библиотек образцов палео-ДНК (95.18%) были в пределах 6,23-19,9 нг/мкл, что достаточно для полногеномного секвенирования.

Все библиотеки ДНК в дальнейшем были амплифицированы и просеквенированы. В некоторых случаях, для библиотек с низкой концентрацией ДНК, делали несколько циклов амплификации, потом объединяли в один пул, измеряли общую концентрацию и секвенировали.

Стоит отметить, что подходы к количественной оценке уровня загрязнения можно разделить на три категории. Некоторые методы основаны на предварительном знании различий в последовательностях контаминирующего и эндогенного геномов [115, 122]. В качестве альтернативы, если эти различия неизвестны, используют другие методы, оценивающие избыток аллелей по сравнению с ожидаемой [115, 120, 123]. Третий набор методов использует образцы химического повреждения, характерные для древних ДНК [108]. Результаты секвенирования древних последовательностей ДНК с помощью биоинформационных подходов были проанализированы на контаминацию их современными ДНК. Для этого мы применяли программное обеспечение EAGER [100], HOPS [28].

Кроме того, в качестве критериев достоверности данных следует рассматривать известные характеристики повреждения палео-ДНК. В виду того, что несколько типов химического повреждения (дезаминирование цитозинов, метилирование, депуринизация, фрагментация, окисление) могут повлиять на сохранность ДНК после смерти, определенные характеристики были количественно определены более тщательно. Первый - депуринизация, представляет собой гидролитический механизм, при котором пуриновые основания вырезаются из цепей ДНК. Этот процесс приводит к формированию базовых сайтов и, как известно, вносит вклад в паттерны фрагментации, наблюдаемые в древней ДНК. Таким образом, повышенная базовая частота аденина (A) и гуанина (G) по сравнению с цитозином (C) и тиминем (T), непосредственно предшествующими 5' концам фрагментов палео-ДНК, часто считается критерием аутентичности [108]. Второй тип повреждения, обычно идентифицируемый среди данных палео-ДНК, - это гидролитическое дезаминирование C, в результате чего основание C превращается в U (и обнаруживается как аналог - T) [124]. Эта базовая модификация обычно происходит на выступах одноцепочечной ДНК, которые наиболее доступны для воздействия окружающей среды, что приводит к увеличению частоты неправильного кодирования повреждений на концевых фрагментах древней ДНК [108, 125]. Следовательно, оценка профилей повреждений ДНК является необходимым условием для определения древнего ДНК патогенных микроорганизмов и необходима для обеспечения целостности данных палео-ДНК в целом. Для оценки повреждения палео-ДНК мы применили *mapDamage 2.0* [115], которое позволило вычленить эндогенные палео-ДНК исследованных образцов и определить их количества.

Следует учесть, что восстановление данных высокого качества часто затруднено из-за вышеупомянутых характеристик палео-ДНК и, следовательно,

требует специальной обработки образцов. Например, когда остатки U древней ДНК, полученные в результате посмертного дезаминирования C, могут быть полностью [32] или частично [111] быть вырезанными из молекул палео-ДНК с использованием фермента урацил-ДНК-гликозилаза (UDG), чтобы избежать их вмешательства.

Все полученные нами библиотеки палео-ДНК удовлетворяли вышеназванным критериям.

3.3 Полногеномный анализ

Секвенирование полных древних геномов археологических либо палеонтологических материалов, является непростой задачей в силу обусловленной временем химической модификации и деградации ДНК. Однако, это единственный способ получить информацию о структуре геномов древних организмов, реконструировать историю их миграций и эволюции.

Как уже говорилось ранее, при работе с древней ДНК мы часто сталкиваемся с проблемами, связанными с сохранностью образцов, так как палео-ДНК с течением времени подвергается деградации, которой во многом способствуют микроорганизмы внешней и внутренней среды. Взаимодействуя с костными останками, микроорганизмы окружающей среды (почва, вода, воздух и др.) не только способствуют химической модификации и деградации ДНК, но и контаминируют костные останки своей ДНК/РНК. В этой связи процесс выделения палео-ДНК и последующий ее биоинформатический анализ усложняется, особенно при наличии древних патогенных микроорганизмов. Но за счёт возможности полногеномного анализа палео-ДНК с помощью секвенирования нового поколения и интенсивно разрабатываемого программного обеспечения, позволяющего по химическим модификациям дифференцировать древние ДНК от современных, оценить уровень контаминации, с использованием баз данных бактерий и вирусов классифицировать находящиеся в палео-ДНК микроорганизмы, оценить их копийность и патогенность.

3.3.1 Количественная оценка просеквенированных библиотек

Для количественной оценки просеквенированных библиотек образцов палео-ДНК был проведен количественный реал-тайм ПЦР (qPCR). Результаты qPCR для последующих шагов для индексирования использовали для расчёта концентрации. Для постановки реал-тайм ПЦР был использован DyNAmo HS SYBER Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) в соответствии с инструкцией производителя вместе с праймерами IS7 и IS8 (Приложение Б). Библиотеки были дважды проиндексированы [126]. При этом обязательно ставили по 2 отрицательных контроля (Приложение В) на каждую библиотеку индексирования (всего 17 библиотек индексирования, в каждой представлено максимально по 21 палео-ДНК). Проиндексированные библиотеки амплифицировали, чтобы получить максимум 1024 копий на реакцию. Для очистки фрагментов ДНК во всех случаях использовали колонки MinElute

(QIAGEN). Концентрацию (нг/мл) амплифицированных библиотек измеряли на приборе 4200 Agilent Tape Station (Agilent Technology, USA) с использованием чипа Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 (Agilent Technology, USA). Конечные концентрации библиотек палео-ДНК были в пределах 200-400 нг/мл. Все библиотеки образцов были обогащены с использованием ДНК-зондов, охватывающих 1237207 полногеномных SNP, являющихся вариабельными в человеческих популяциях. Секвенирование эквимольных пулов библиотек палео-ДНК проведено методом дробовика с применением MPI-SHH на платформе Illumina HiSeq 4000 с использованием одностороннего набора для секвенирования с 76 циклами.

В итоге было сделано 17 наборов библиотек (максимальное количество образцов в одном наборе: 21 образец палео-ДНК, 1 положительный контроль, 2 отрицательных контроля).

Для проверки контаминации готовили пулы отрицательных контролей (Приложение Д) и всех образцов, из которых были сделаны библиотеки. Анализ контаминации проводили путем сравнительного анализа, который позволил исключить наличие контаминации наших образцов палео-ДНК. В итоге для секвенирования получились 2 пула из библиотек с образцов, первый из 143 (Приложение Е), и второй из 183 образцов (Приложение Ж).

3.4 Скрининг образцов палео-ДНК на наличие древних бактерий *Yersinia pestis*

Чума - это пандемическое инвазивное заболевание человека, вызываемое бактериальным агентом *Yersinia pestis*. Исследования показывают, что первые случаи заболевания чумой датируются около 5000 лет назад [23]. Антисанитарные условия и скопление людей и животных сделали чуму опасной болезнью. Легочную и септическую форму чумы может вызвать инфекция бубонной чумы. Распространение чумы подвергло народы эпидемиям и характеризовались высоким уровнем смертности. Юстинианская чума (541-767 гг.) унесла жизни более ста миллионов человек [71]. «Чёрная смерть» (1346-1353 гг.) привела к гибели трети населения Европы [127, 128]. Третья пандемия чумы, распространившаяся по всему миру всего за несколько десятилетий, вспыхнула в Китае в 1894 году, распространившись из провинции Юньнань в Гонконг, а затем морским путем в различные мировые направления, включая Индию, Европу, Африку и Америку [129].

Большинство первичных хозяев *Y. pestis* - это грызуны различных видов, у которых сylvaticкие циклы заболевания зависят от передачи специфических для вида блох-переносчиков.

Y. pestis по питательным свойствам подразделяется на биовары *Orientalis*, *Medievalis*, *Antiqua* и *Pestoides* [29, 79]. Генетически *Y. pestis* является мономорфным клоном более разнообразных родительских видов - *Yersinia pseudotuberculosis*.

Генетический анализ ДНК древних штаммов *Yersinia pestis* и её вероятного предка *Yersinia pseudotuberculosis* показал возможность дивергенции этих видов

микроорганизмов путем того, что почвенная условно-патогенная бактерия *Y. pseudotuberculosis* приобрела несколько генов, позволивших ей проникать в легкие человека. Ключевая мутация в гене *pla*, способствующая проникновению в клетки человека и распространению бактерий посредством лимфатической системы, могла быть передана от другого микроорганизма путем горизонтального переноса генами [66]. После своего расхождения с *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* приобрел высокую патогенность и отличную нишу, главным образом за счет потери хромосомного гена [130], а также приобретения двух плазмид, связанных с вирулентностью, *pMT1* и *pPCP1* [39, 80]. Возникновение более опасной, летальной мутации, связанной с бубонной чумой, датировано рубежом второго и первого тысячелетия до нашей эры [23].

Исследования образцов зубов 101 индивида с территории Евразии от Сибири до Польши, датированных бронзовым веком, показали наличие следов ДНК *Y. pestis* в 7 образцах возрастом до 5783 лет. Причем, в 6 образцах отсутствовал ген вирулентности *ymt* и мутации в гене активации *pla* [66].

Древние исследования ДНК позволили восстановить геномы *Y. pestis* жертв первой и второй пандемий [75, 83, 89], подтвердив, что бактерия является биологическим агентом болезни. Более того, недавние исследования показали, что *Y. pestis* поражает людей с позднего неолита [82, 131, 132], задолго до первой пандемии. Геномы *Y. pestis* из позднего неолита и бронзового века (LNBA) позволили понять раннюю эволюцию этого патогена, и была выдвинута гипотеза, что повышенная мобильность человека в этот период сыграла роль в его раннем распространении по Евразии [94, 137, 138]. Однако остаются открытыми вопросы относительно проявления болезни и экологии на этой ранней стадии ее эволюции. Чума LNBA представляет собой генетический фон, который интерпретируется как несовместимый с ее текущим основным способом передачи, который происходит через переносчика блох [90, 131, 132]. Современные знания об экологии *Y. pestis* указывают на то, что патоген поддерживается посредством ферментативной передачи, опосредованной блохами, в популяциях диких грызунов, которые представляют собой его основные резервуары [133]. Самый старый древний геном *Y. pestis*, содержащий все приспособления, необходимые для эффективной передачи блох, был идентифицирован у человека из Самарской области (Россия), возраст которого составил 3800 лет до н.э. [47, 134], что позволяет предположить, что бронзовый век, возможно, был решающим периодом для развития эпидемии. патоген, который мы знаем сегодня. Как люди заразились более ранними и современными формами, не имеющими генетической схемы эффективной передачи вируса от блох, все еще остается нерешенным. Примечательно, что передача через блох - не единственная задокументированная форма распространения чумы: легочная чума, передаваемая при прямом контакте с инфекционной мокротой, может передаваться при прямом контакте от человека к человеку, хотя в этом отношении зарегистрировано лишь несколько зарегистрированных вспышек, где обычными характеристиками были тесный контакт с инфицированными людьми и плохая вентиляция [81, 135]. Напротив,

известно, что случаи чумы были вызваны обращением с инфицированными животными или их употреблением в пищу [136], что может лучше соответствовать моделям инфекции, совместимым с ранней историей человечества.

Напротив, известно, что случаи чумы были вызваны обращением с инфицированными животными или их употреблением в пищу [136], что может лучше соответствовать моделям инфекции, совместимым с ранней историей человечества. Более того, связывая геномные данные с доступным археологическим контекстом, мы получаем представление о развитии механизмов передачи чумы на раннем этапе ее эволюции.

Стоит отметить, что происхождение средневековой «Черной смерти» (1346–1353 гг. н. э.), было предметом непрерывных исследований на протяжении более века из-за обширного демографического воздействия пандемии и долгосрочных последствий. На сегодняшний день наиболее активно обсуждаемые археологические свидетельства, потенциально связанные с началом пандемии, были обнаружены на кладбищах, расположенных недалеко от озера Иссык-Куль на территории современного Кыргызстана [39, 94, 137]. Предполагается, что в этих местах находятся жертвы эпидемии 1338–1339 гг., что прямо датируется надписями на надгробиях, в которых говорится об «эпидемии» как о причине смерти [94].

Исходя из этих сведений, мы уделили особое внимание анализу палео-ДНК, извлеченных из человеческих останков этих несторианских кладбищ - Кара-Джигач и Бурана.

3.4.1 Оценка ингибирования qPCR в древних образцах ДНК для первичного скрининга *Yersinia pestis*

Являясь очень чувствительной реакцией, qPCR может быть ингибирована наличием в древних образцах ДНК специфических веществ, образовавшихся в результате естественного распада тканей при взаимодействии с почвой и другими компонентами среды. Часто, чувствительность qPCR может быть снижена из-за ингибирования реакции либо компонентами самих образцов, в нашем случае аддуктами древней ДНК, выделенной из зубного порошка, либо контаминацией из внешней среды. В этой связи перед постановкой специфической к ДНК *Y.pestis* qPCR реакции, рекомендуется проведение теста на ингибирование реакции амплификации. Тест на ингибирование выполняется следующим этапом после выделения палео-ДНК из археологических образцов перед тем, как провести скрининг на выявление ДНК *Y.pestis* методом qPCR для того, чтобы исключить ложно-отрицательные результаты qPCR.

Для получения стандартной кривой концентраций амплификатов был использован стандарт - полная последовательность *pla* гена *Y.pestis*, включающую спейсерные межгенные участки с двух концов [97]. Стандарт для qPCR использовали в диапазоне разведений ДНК стандарта от 10 нг/мкл до 0.001 нг/мкл.

Далее тест на ингибирование qPCR (раздел 2.2.4) проводили для 332 выделенных из зубных порошков образцов древней ДНК и 2 контрольных образцов ДНК, выделенных из костных фрагментов плейстоценового пещерного медведя [12], хранящихся в лаборатории Института наук об истории человечества (Йена, Германия).

О наличии или отсутствии факта ингибирования qPCR судили по показателю нормализованного относительного значения амплификации (экспрессии) *pla* гена гена *Y.pestis* - ΔCq . В приложении 4 приведена таблица с результатами теста на ингибирование qPCR для всех проанализированных образцов палео-ДНК.

Два образца были неуспешными по qPCR:

- 1) VIR010.A01 (археол. код – Birlik#21, некрополь Бирлик, Павлодарская обл., культура Коргантас, IV-II до н.э.
- 2) WAR001.B01 (археол. код – 37 Warriors, некрополь «37 воинов», Карагандинская обл., Тасмолинская культура, мужчина, 2451±32 14C years BP; 755-411 cal. BC (2-sigma).

Возможно, эти образцы содержали специфические факторы, тотально ингибировавшие реакцию qPCR.

Факт ингибирования qPCR был достоверно установлен только для 2-х образцов палео ДНК:

- 1) BRE012.B01 (археол. код - Berel 2018_76B, некрополь Берел, ВКО, находки 2018 г., хунно-сяньбийская культура, женщина, 1958±22 14C years BP; 32 cal. BC - 123 cal. AD (2-sigma); $\Delta Cq = 5,545$.
- 2) VIY004.A01 (археол. код – Mountain Bitiya #228/19, некрополь Горная Бития, Омская обл., Россия, III-II век до н.э.; $\Delta Cq = 0,945$.

Остальные 330 образцов палео-ДНК не ингибировали qPCR, они были использованы для дальнейшего скрининга на наличие ДНК *Y. pestis*.

3.4.2 Скрининг на наличие ДНК *Yersinia pestis* в образцах, представляющих древнее население Казахстана и прилегающих территорий России и Кыргызстана

Дальнейший скрининг на наличие ДНК *Y. pestis* с применением специфических праймеров к *pla* гену активатора плазминогена (раздел 2.2.5) проведен в 330 образцах палео-ДНК, представляющих археологические находки с территории Казахстана и приграничных областей России и Киргизии.

Первично, среди всех проанализированных образцов палео-ДНК, определены 16 образцов (KNL007.A01; KNL008.A01; KNL021.A01; BSK001.A01; BSK003.A01; KZL002.A01; BRE017.A01; SRO001.A01; KUS001.A01; KUS005.A01; KUS013.A01; KBU003.A01; ESZ003.B01; TAL003.B01; BDY001.B01; WAR001.B01), которые показали наличие *pla* гена *Y. pestis* при использовании метода qPCR.

Для количественного анализа копийности ДНК *Y. pestis* в позитивных образцах палео-ДНК была сгенерирована стандартная кривая с использованием

синтетических олигонуклеотидных конструкций в диапазоне концентраций от 0 - $2,23E\pm 005$.

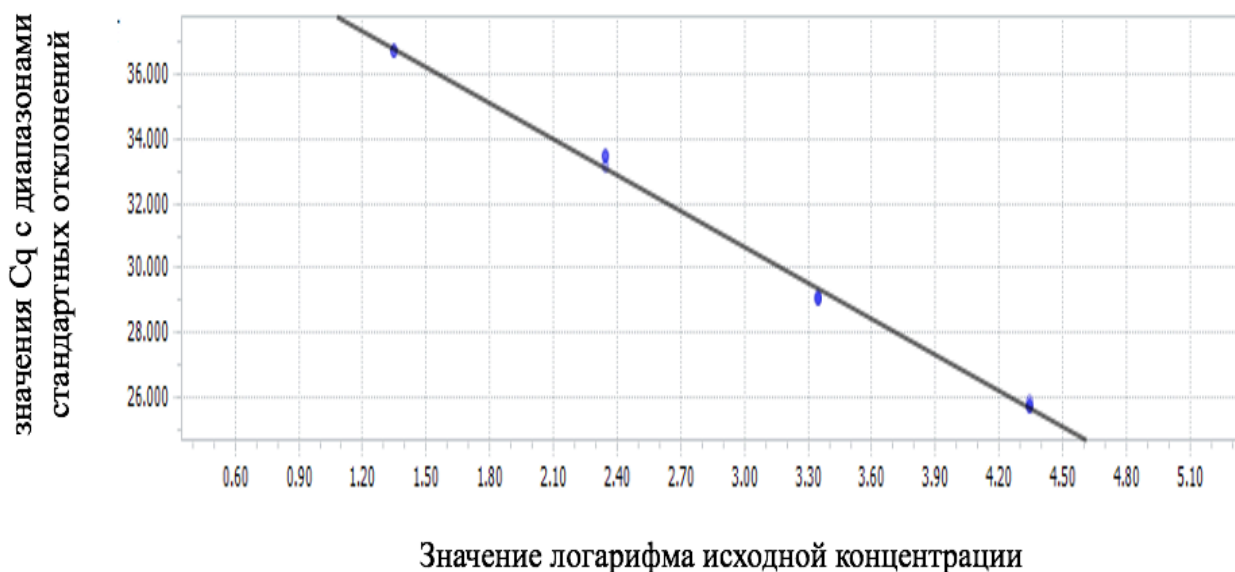


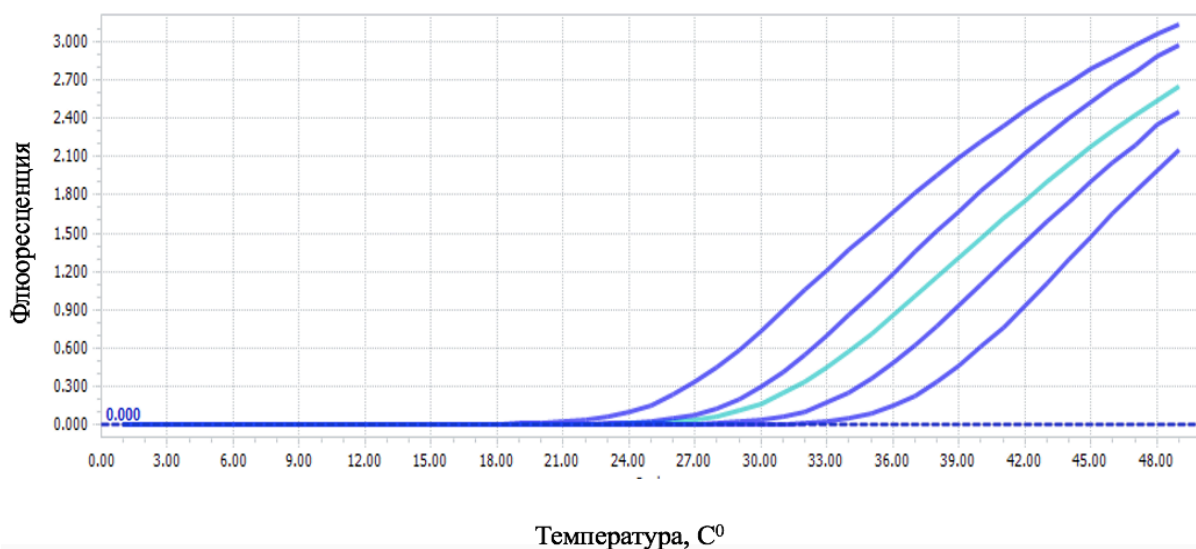
Рисунок 10 - Стандартная кривая ПЦР в реальном времени

Рисунок 10 отображает стандартную кривую зависимости порогового цикла от логарифма начального количества. В данном случае, так как мы использовали стандартный образец, то на рисунке можно увидеть эффективность реакции для каждого флуорофора в лунках со стандартным образцом (рисунок 10). В итоге, низкие вариационные значения C_q и перекрывающиеся кривые ампликона в каждой позиции демонстрировали температурную однородность и равную обработку образца и стандарта независимо от положения блока.

Анализ копийности показал, что 13 позитивных образцов палео-ДНК на *Y. pestis* являются ложноположительными, поскольку количество амплифицированных копий недостаточно для подтверждения чумной болезни у древних индивидов. В этих случаях, наличие в образцах костных останков микробов *Y. pestis* могло быть обусловлено поверхностным загрязнением из почвы или с соседствующих останков людей и животных. Среди 16 образцов, показавших позитивный результат, 13 захоронений были множественными и только 3 (WAR001.A01; SRO001.A01; BDY001.A01) образца представляли единичные захоронения.

С учетом многокопийности ДНК *Y. pestis* положительный результат был установлен для 3 образцов (KZL002.A01; BSK001.A01; BSK003.A01) [138].

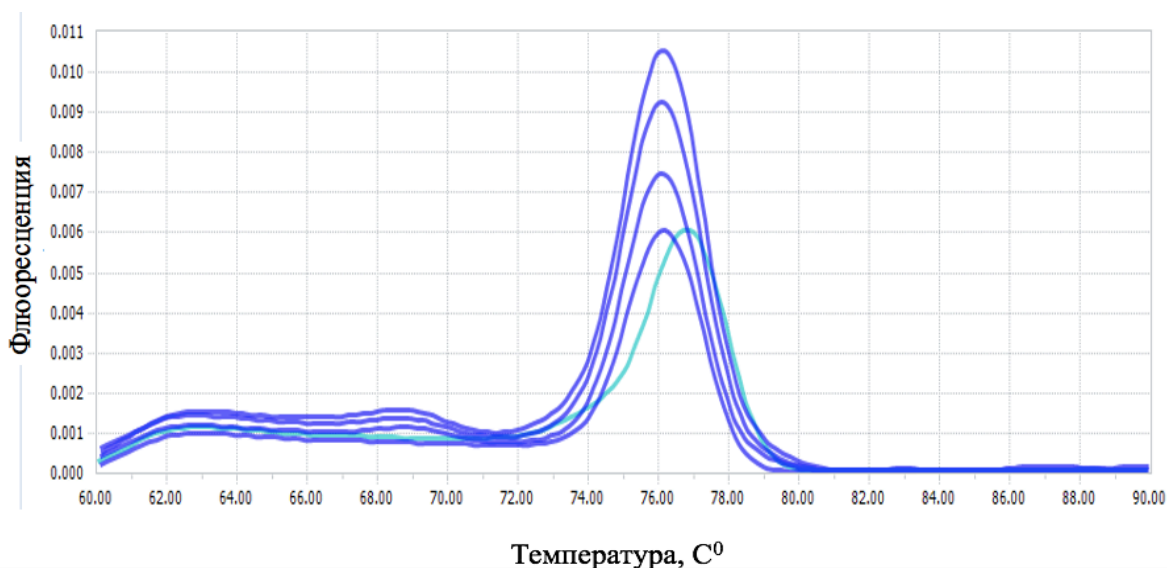
Рисунок 11 демонстрирует накопление количества амплифицированных копий *pla* гена *Y. pestis* в зависимости от количества циклов амплификации у образца KZL002.A01 (некрополь Кызыл, раннежелезный век, тасмолинская культура, Центральный Казахстан).



Примечание - Зеленым цветом отмечен образец KZL002.A01, синим – стандарты, содержащие ДНК *Y.pestis* в диапазоне концентраций 10 нг/мкл; 1 нг/мкл; 0,1 нг/мкл; 0,01 нг/мкл)

Рисунок 11 - Амплификационная кривая положительного на *Y.pestis* образца KZL002.A01 в сравнении со стандартами

Рисунок 12 представляет типичную температуру плавления для положительного по чуме образца.



Примечание: Зеленым цветом отмечен образец KZL002.A01, синим – стандарты, содержащие ДНК *Y.pestis* в диапазоне концентраций 10 нг/мкл; 1 нг/мкл; 0,1 нг/мкл; 0,01 нг/мкл)

Рисунок 12 - Температура плавления положительных на *Y.pestis* образцов, с помощью qPCR

При подтверждении наличия ДНК *Y.pestis* в образцах палео-ДНК ориентировались не на интенсивность флуоресцентного сигнала и концентрации ампликонов, а на амплификационные кривые (рисунок 11) и температуры плавления (рисунок 12). Как показано, в таблице 1, некоторые ложноположительные образцы показали высокий уровень сигнала (Cq) и концентраций. Однако, их температуры плавления не соответствовали варианту *pla* гена *Y.pestis*. Положительный результат амплификации мог быть следствием амплификации вариантов *pla* гена других видов бактерий рода *Yersinia*.

Результаты анализа копийности ДНК *Y.pestis* для qPCR - позитивных образцов суммированы в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты скрининга методом qPCR для обнаружения положительных образцов на *Y.pestis*

Наименование образца	Уровень сигнала, Cq	Концентрация, нг/мкл	Наличие древней <i>Y.pestis</i> подтверждено биоинформационной обработкой
KNL007.A01	37,32	25,90	-
KNL008.A01	38,86	10,00	-
KNL021.A01	39,92	5,19	-
BSK001.A01	35,4	46,10	+
BSK003.A01	34,89	63,10	+
KZL002.A01	29,64	1590,00	+
BRE017.A01	38,73	28,10	-
SRO001.A01	46,41	0,47	-
KUS001.A01	44,8	3,19	-
KUS005.A01	45,46	2,33	-
KUS013.A01	44,3	4,05	-
KBU003.A01	43,51	5,89	-
ESZ003.B01	42,48	4,04	-
TAL003.B01	45,94	0,58	-
BDY001.B01	42,84	3,30	-
WAR001.B01	42,74	0,73	-

По совокупности полученных данных, из 16 *Y.pestis pla* ген - позитивных образцов, 13 (KNL007.A01; KNL008.A01; KNL021.A01; BSK001.A01; BSK003.A01; KZL002.A01; BRE017.A01; SRO001.A01; KUS001.A01; KUS005.A01; KUS013.A01; KBU003.A01; ESZ003.B01; TAL003.B01; BDY001.B01; WAR001.B01) признали ложноположительными и 3 образца (KZL002.A01; BSK001.A01; BSK003.A01) – положительными (Таблица 1).

Таким образом, по результатам скрининга, наличие большого числа копий *Y.pestis*, которое может быть свидетельством чумного заболевания, было однозначно установлено для 3-х древних индивидов:

1) KZL002.A0101 (некрополь Кызыл, Тасмолинская культура, женщина, 2736-2457 до н.э., находка 2008 г., с. Шабанбайбы, Актогайский район, Казахстан)

2) BSK001.A0101 (Бишкекское несторианское кладбище Кара-Джигач, 176/4, могила 19, находки 1885-1886 гг., 1338-1339 н.э., Бишкек, Чуйский район, Чуйская область, Кыргызстан)

3) BSK003.A0101 (Бишкекское несторианское кладбище Кара-Джигач, 176/7 могила 28, находки 1885-1886 гг., 1338-1339 н.э., Бишкек, Чуйский район, Чуйская область, Кыргызстан). Однако, чтобы окончательно убедиться в том, что положительные на *Y.pestis* образцы палео-ДНК являются свидетельством наличия чумной болезни у древних индивидов, а не результатом контаминации из окружающей среды [35, 15], необходимо было провести полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ.

Устанавливая наличие патогенных микроорганизмов в древних останках человека, надо учитывать совокупно степень возможной постсмертной контаминации костного материала колониями микроорганизмов из окружающей среды и копияемость представленных ДНК патогенов в исследуемом материале [139]. При этом надо учитывать возможную частоту встречаемости патогенных микроорганизмов в окружающей среде. Биоинформационный анализ должен обеспечивать качественную обработку данных секвенирования – количественную оценку прочтений, видо- и картографическую специфичность последовательностей ДНК, их генетические расстояния (также называемых расстоянием редактирования). Таким образом, установление патогенов в древних костных останках человека требует тщательного анализа и верификации.

Представленная коллекция древних костных останков (Приложение 3) была антропологически оценена на наличие факторов, указывающих на поражения костного материала, вызванные такими заболеваниями как туберкулез, лепра, бруцеллез и др.

Однако таких свидетельств, не было установлено. Поскольку костные фрагменты были взяты из разных мест скелетов (зубы, височная кость, берцовая кость, другие длинные кости), для обеспечения равнозначности возможной контаминации из внешней среды, только библиотеки ДНК, представляющие образцы зубов древних индивидов, были подвергнуты полногеномному секвенированию (326 качественных библиотек ДНК). Концентрации библиотек палео-ДНК подбирались согласно стандартизированным методам количественной и качественной оценки (данные qPCR и анализа на TapeStation) для пула отрицательных контролей (Приложение Д) и двух пулов исследуемых образцов (Приложения Е и Ж).

В исследованиях древней ДНК (палео-ДНК) часто анализируются миллиарды считываний последовательностей, чтобы определить уровень контаминации и собственно геномную последовательность древних организмов. Проведенное нами полногеномное исследование палео-ДНК с рангом прочтений от 992228 до 20912844 (таблица 2) было проанализировано с

использованием нескольких программных обеспечений, адаптированных к характеристикам древних ДНК [117].

Одним из использованных программных обеспечений была программа EAGER с Она состоит из инструментов, предназначенных для предварительной обработки данных полногеномного секвенирования палео-ДНК, полученных с использованием платформ полногеномного секвенирования (Illumina HiSeq, NevSeq, MiSeq) и позволяет оценивать качество прочтений, картировать чтения, удалять дубликаты ПЦР и др.

Таблица 2 – Результаты полногеномного секвенирования с использованием программного обеспечения – EAGER [10].

Образец	Число прочтений после C&M картирования	Кол-во удаленных дубликатов	Кол-во прочтений RMDup без дубликатов	Содержание эндогенной ДНК (%)	Циклы амплификации для анализа 1240K	Соотношение мт ДНК к ядерной ДНК	Содержание GC пар (%)
1	2	3	4	5	6	7	8
AIG001	10481046	592	10420	0,105	2	18080,9	49,52
AIG002	4494675	1857	30924	0,729	2	1862,01	56,53
AIG003	6401967	3606	60084	0,995	2	219,88	53,48
AIG004	7482806	216	3448	0,049		4142,09	60,32
AIG005	4543898	550	8599	0,201	2	12584,4	58,26
AIG006	10020045	1129	18555	0,196	2	300,37	53,92
AKB002	5266849	59340	811795	16,54	1	81,03	55,52
AKB003	5561046	32533	463186	8,914	1	843,73	54,91
BKB001	3670335	273	4896	0,141	2	11984,9	56,1
BKB002	4645630	27260	366077	8,467	1	381,36	55,29
BKB003	3065400	20164	338916	11,71	1	548,49	55,1
BKB004	4585164	10964	141672	3,329	1	669,98	56,65
BRE016	4796571	10539	163349	3,625	1	2769,83	53,2
BRE017	3863205	50511	841662	23,09	1	162,12	55,55
BRE018	5233177	25414	351129	7,195	1	1313,06	53,7
BRE019	5352765	14136	165045	3,347	1	2304,26	53,03
BRE020	5085120	38922	610563	12,77	1	284,27	55,23
BRE021	3967850	1584	23806	0,64	2	3886,43	53,67
BRE022	4515823	80259	1340295	31,46	1	385,86	59,03
BRE026	4582191	9656	124922	2,937	1	10626,8	55,39
BRE027	7485729	21336	320753	4,57	1	853,33	54,92
BRE028	6348193	26054	431386	7,206	1	6336,02	55,34
BSB001	5712568	15713	206860	3,896	1	3760,32	54,68
BSB002	20912844	16935	239371	1,226	1	262,22	56,95
BSB003	5138699	1330	19509	0,406	2	1874,49	57,01
BSB004	1025530	141	3013	0,308	2	657,55	55,56
BSK002	5823309	118965	1775365	32,53	1	120,14	57,19

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
BSK004	4398472	283	4003	<u>0,097</u>		147,7	59,26
BSK005	4040485	8273	140911	3,692	1	43,03	51,94
BSK006	3570764	453	4871	0,149		0	72,73
BSK007	6948021	601	8514	0,131	2	354,4	50
KNL031	6401904	142	2421	<u>0,04</u>		84302,51	56,52
KNL033	4691065	108	1337	<u>0,031</u>			55,56
KNL034	5291997	2357	33559	0,679	2	2955,06	54,97
KNL035	6453693	44603	715877	11,784	1	584,68	54,45
KUS002	5874120	25	493	<u>0,009</u>		0	33,33
KUS003	9993504	69	997	<u>0,011</u>		0	85,71
KUS004	9599911	33	723	<u>0,008</u>		0	50
KUS005	5143753	102	1642	<u>0,034</u>		1454,98	42,31
KUS006	2920804	32	900	<u>0,032</u>		0	100
KUS007	5790426	33	654	<u>0,012</u>		0	75
KUS008	4033557	32	489	<u>0,013</u>		331,28	66,67
KUS013	5355815	256	4203	<u>0,083</u>		471,68	58,57
KZL001	5979388	174746	2390076	42,894	1	282,59	54,72
CLK001	4909231	726	13783	0,296	2	2319,16	54,95
CLK002	1476335	111	1170	0,087		1901,23	45,45
CPA001	3202569	991	10557	0,361	2	2173,75	62
CPA002	4343900	167197	2487172	61,11	1	85,7	56,02
CSP001	4495938	252	3441	0,082	2	18032,2	56,6
CSP002	3246385	10432	184917	6,017	1	196,14	54,87
CSP003	4831025	61829	806572	17,98	1	254,54	56,4
CSP004	2142674	1036	17797	0,879	2	779,41	59,35
CSP005	4798173	39268	660097	14,58	1	145,94	55,61
KBU001	3535832	10002	178734	5,338	1	850,33	54,76
KBU002	2094240	2624	40961	2,081	1	4109,63	56,93
KBU003	992228	1723	26712	2,866	1	1726,12	57,19
KEN001	4045240	43331	771233	20,14	1	81,75	55,66
KEN002	3741585	1092	17073	0,485	2	2414,4	56,41
KEN003	5167788	4979	77636	1,599	1	3471,03	52,83
KKB001	5320398	23796	359364	7,202	1	1165,43	54,58
KKB002	5580021	3387	54374	1,035	1	2202,89	55,38
KLK001	4271214	76	1587	<u>0,039</u>		2501,09	80,95
KLK002	6131348	140788	2243719	38,89	1	61,44	56,58
KNL005	7624466	85	1282	<u>0,018</u>		1149,88	50
KNL013	10232293	890	12768	0,133	2	13445,9	56,22
KNL014	10127024	101481	1430694	15,13	1	500,8	53,11
KNL017	6424341	114953	1882714	31,095	1	113,14	57,65
KNL018	4509451	10862	209924	4,896	1	831,07	55,89
KZL003	2501337	3074	49435	2,099	1	848,06	55,77
KZL004	6412343	169438	2699039	44,734	1	20,06	56,7

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
KZL005	4280300	88	1472	<u>0,036</u>		3085,97	59,26
NUR003	4628369	2012	25910	0,603	2	3777,44	55,19
NUR004	3144126	254	3354	0,115	2	16882,13	50,98
NUR005	5240511	45068	839801	16,885	1	161,77	55,76
NZR001	5979628	5788	99977	1,769	1	2172,49	59,51
NZR002	3790645	4944	87753	2,445	1	769,01	56,61
SRK002	5273120	5915	93408	1,884		5634,2	55,71
SRK003	5636032	11095	169165	3,198	1	2636,14	53,47
SRK004	19027519	1683	27645	0,154	2	15561,86	57,37
SRK005	3298606	232	4014	0,129	2	25120,3	60
SRO001	4961129	5276	78022	1,679	1	924,38	56,34
WAR001	5493414	9393	161402	3,109	1	1123,45	55,22
ZHR002	3005834	28	580	<u>0,02</u>		520,34	50
ZHR003	1744673	220	3407	0,208	2	11006,14	54

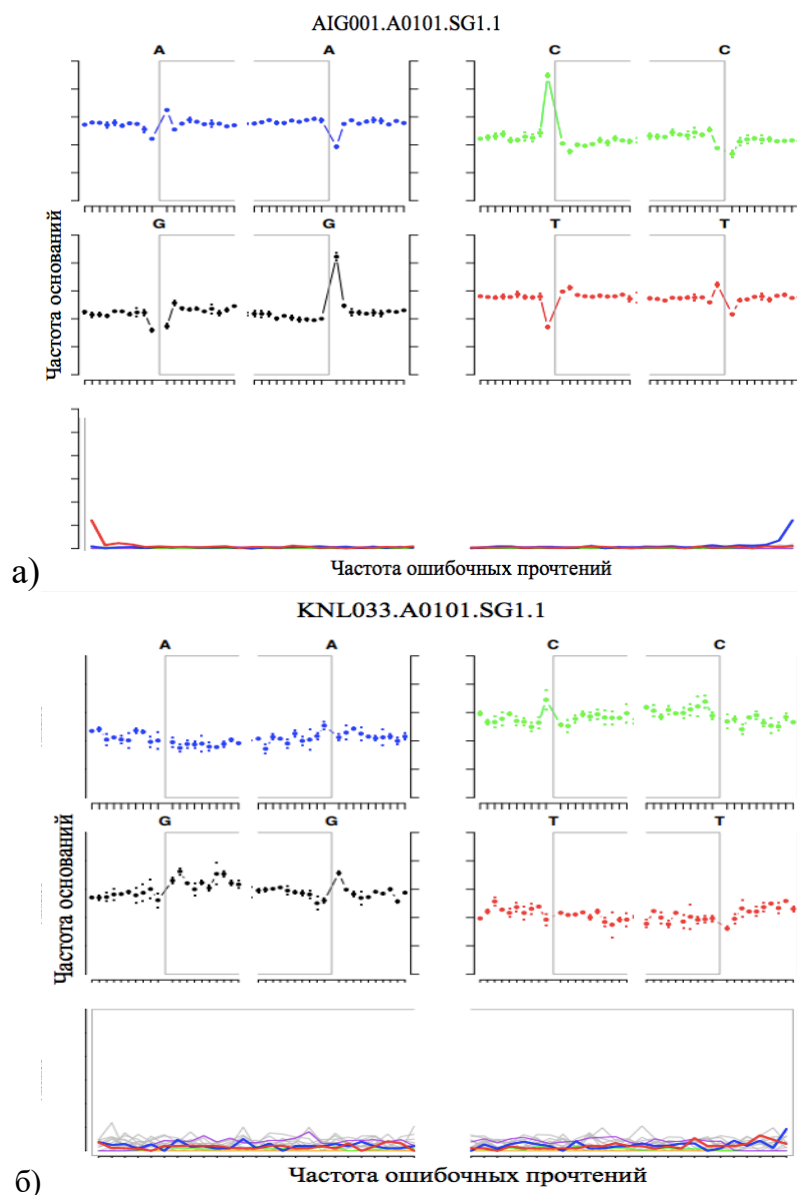
Помимо всего, можно оценить содержание эндогенной ДНК в образцах, что может позволить составить алгоритм действий для последующих шагов анализа данных секвенирования. Из таблицы 2 видно, что некоторые образцы представляли очень высокое содержание эндогенной ДНК: АКВ002, АКВ003, ВКВ002, ВКВ003, ВРЕ017, ВРЕ020, ВРЕ022, ВСК002, ВРЕ028, ВРЕ018, ВСК002, СРА002, CSP005, KZL001, KZL004 и NUR005. Самое высокое содержание эндогенной ДНК было у образца из некрополя Каспан - СРА002 (61,106%), образцы из некрополя Кызыл - KZL001 (42,894%) и KZL004 (44,734%), также характеризовались высоким содержанием эндогенной ДНК.

Вместе с тем отмечено, что несколько образцов (AIG004, BSK004, KKL001, KNL005, KNL031, KNL033, KUS002, KUS003, KUS004, KUS005, KUS006, KUS007, KUS008, KUS013, KZL005, ZHR002) характеризовались очень низким содержанием эндогенной ДНК (0,008%-0,097%). В виду низкого содержания ДНК человека, данные образцы было нецелесообразно включать в популяционный анализ древних людей.

Однако для выявления ДНК патогенных микроорганизмов с применением программного обеспечения HOPS эти образцы можно использовать [28]. При этом надо учитывать, что в случае обнаружения патогенов в этих образцах, требуется верификация, связанная с повторной экстракцией палео-ДНК, приготовлением новых библиотек и повторного полногеномного секвенирования.

Полученные характеристики других образцов представляли достаточное качество, которое позволяло использовать их как для анализа древних популяций человека, так и для анализа патогенов.

Рисунок 13 показывает пример хорошего (а) и плохого (б) качества чтения UDG half - обработанных библиотек палео-ДНК. Очевидно, что на качество чтения библиотеки ДНК образца KNL033 повлияла высокая степень метилирования и дезаминирования древней ДНК. Как было сказано ранее, качество ДНК зависит от естественных процессов химической модификации и деградации ДНК и от условий окружающей среды, в которых хранятся останки. В древней ДНК дезаминирование цитозина со временем накапливается на концах фрагментов ДНК [121].



- а) Хорошее прочтение библиотеки ДНК;
- б) Прочтение библиотеки низкого качества

Рисунок 13 – Сравнительные данные качество библиотек для палеогенетического анализа

3.5 Биоинформационный анализ наличия патогенных микроорганизмов в исследованных образцах ДНК

Высокопроизводительное секвенирование ДНК позволяет проводить крупномасштабные метагеномные анализы сложных биологических систем. Такие анализы не ограничиваются современными экологическими или клиническими образцами, но могут быть плодотворно применены и к молекулярным данным археологических остатков (палео-ДНК), а фокус на древних бактериях может дать ценную информацию о долгосрочной эволюционной связи между хозяевами и их патогенными организмами.

Для таксономии, определения видовой принадлежности и филогенетического анализа древних патогенных микроорганизмов весьма распространенный среди современных бактерий анализ 16S РНК не пригоден, в виду того, что древние ДНК микроорганизмов и вирусов подвергаются времязависимой деградации и химической модификации, как и ДНК высших организмов (раздел 1.2). При работе с археологическим материалом, выделяются и секвенируются все присутствующие в образце фрагменты ДНК. Дальнейшая обработка полученных данных лабораторного исследования проводится с помощью специализированного к анализу древних ДНК программного обеспечения (EAGER, HOPS, MEGAN и другие, см. раздел 2.3), которое базируясь на свойствах древних ДНК, позволяет разделить современные и древние ДНК последовательности. Поэтому первым этапом идет оценка древности (“mapdamage”) ДНК. В дальнейший анализ включаются только древние фрагменты ДНК. Для поиска необходимых последовательностей ведется сравнение с полногеномными референсными последовательностями или отдельными уникальными участками ДНК микроорганизмов, вирусов и человека. Мы сопоставляли наши данные с пользовательской базой данных RefSeq Genome, включающей все полные геномы вирусов и бактерий (по состоянию на 2017 г.), присутствующей в программном обеспечении HOPS.

Данные полногеномного секвенирования исследованных образцов палео-ДНК (326 древних индивидов) были проскринированы на наличие ДНК основных референсных таксономических классов патогенных бактерий и вирусов с помощью программного обеспечения HOPS которое обеспечивает универсальный и быстрый скрининг микробной ДНК из археологического материала с целью выявления кандидатов для последующего анализа на уровне генома [28].

Успешное обнаружение древних патогенов зависит от трех критериев:

- 1) специфичность обнаружения до видового уровня на разнообразном метагеномном фоне;
- 2) высокая чувствительность, которая позволяет обнаруживать ДНК патогенов даже при слабом сигнале, когда присутствуют только следовые количества видоспецифической ДНК;
- 3) подтверждение его древнего происхождения на основе анализа генетических дистанций между древними и современными штаммами патогенов.

HOPS удовлетворяет всем этим критериям и позволяет получить метагеномные профили древних образцов. Рисунки 14 и 15 представляют данные метагеномного скрининга наших древних образцов.

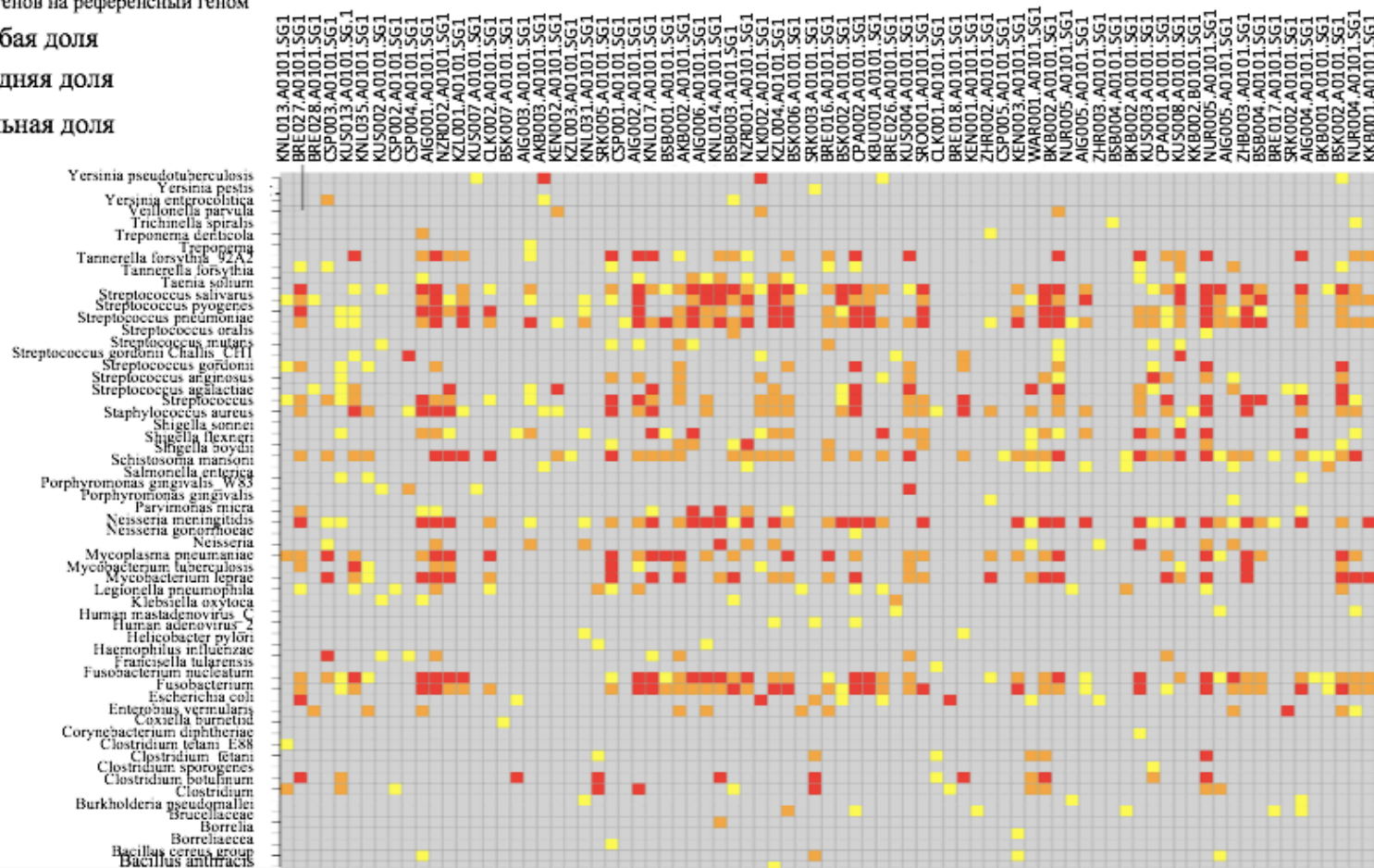


Примечание - Красный (большая), оранжевый (средняя) и желтый (слабая) – доля смоделированных считываний ДНК патогенов на референсный геном (ось y), назначенная конкретному патогенному микроорганизму к образцам (ось x). Уровни таксономии, не определенные для вида, показаны серым цветом.

Рисунок 14 – Скрининг методом HOPS бактериальной и вирусной ДНК из оставшихся археологических останков

Доля смоделированных считываний
ДНК патогенов на референсный геном

- слабая доля
- средняя доля
- сильная доля



Примечание - Красный (сильная), оранжевый (средняя) и желтый (слабая) – доля смоделированных считываний ДНК патогенов на референсный геном (ось y), назначенная конкретному патогенному микроорганизму к образцам (ось x). Уровни таксономии, не определенные для вида, показаны серым цветом.

Рисунок 15 – Скрининг методом HOPS бактериальной и вирусной ДНК из археологических останков

Таксономическое назначение зависит от структуры базовой справочной базы данных, и очень важно понимать ожидаемое таксономическое размещение секвенированных считываний от каждого микробного патогена, чтобы успешно их идентифицировать. Результаты этого теста дают представление об уровнях таксономической идентификации, которые следует учитывать при поиске любого из 63 запрошенных видов бактерий и вирусов в экспериментальных наборах древних данных.

Очень важно отличать древние бактерии от современных загрязнителей уже на начальном этапе скрининга [140]. Древние ДНК патогенных бактерий обычно присутствуют в образцах ДНК древних людей в небольшой копияности. Это отличает случаи контаминации древних ДНК современными штаммами патогенов, когда они представлены очень большим числом копий. Применяя набор критериев аутентичности [141], важное место в которых занимает оценка повреждения ДНК (метилование, дезаминирование, депуринизация) и оценка копияности, можно отличить факт наличия древнего патогена в костных останках и контаминацию современными ДНК. Оценка дополнительных критериев аутентичности, таких как расстояние редактирования (количество несоответствий между результатами считывания и референсным геномом) и распределение сопоставленных считываний по референсному геному, также рекомендуется для обхода артефактов смещения базы данных и для дальнейшей проверки таксономических назначений. Если секвенированные считывания относятся к правильным эталонным видам, распределение расстояний редактирования должно постоянно снижаться, при этом большинство считываний не демонстрируют или показывают лишь несколько несоответствий, которые в основном являются результатом повреждения палео-ДНК или эволюционного отклонения современного референсного генома от древнего генома патогена.

В частности, повреждение ДНК, проявляющееся в виде неправильного кодирования повреждений в последовательностях, может привести к увеличению количества несоответствий, а обширное повреждение может предотвратить выравнивание или изменить таксономическое назначение. Потеря считываемых данных в результате повреждения ДНК может помешать обнаружению видов, поскольку исследования ДНК обычно начинаются с поверхностных данных о последовательности в ходе первоначальной оценки качества образцов. Кроме того, исследование археологических костных останков подразумевают низкий выход палео-ДНК, а усиление библиотеки может привести к появлению большого числа дубликатов ПЦР, что может привести к ложному количественному раздуванию оценки таксонов.

Для учета таких недостатков мы использовали модифицированную версию MALT, специально разработанную для анализа данных палео-ДНК [24]. В этой модифицированной версии дубликаты ПЦР удаляются путем устранения показаний, идентичных уже выровненным. Кроме того, чтобы учесть повреждения ДНК во время выравнивания, замены C>T игнорируются в первых пяти позициях из 5'-конца, а замены G>A игнорируются в первых пяти позициях из 3'-конца. Используя программу MaltExtract (программное обеспечение

НOPS) [28, 142], можно получить информацию о расстоянии редактирования, распределении длины считывания, распределении покрытия и схеме несовпадения выравнивания с целью выявления и подтверждения наличия древней ДНК, характерной для данного вида.

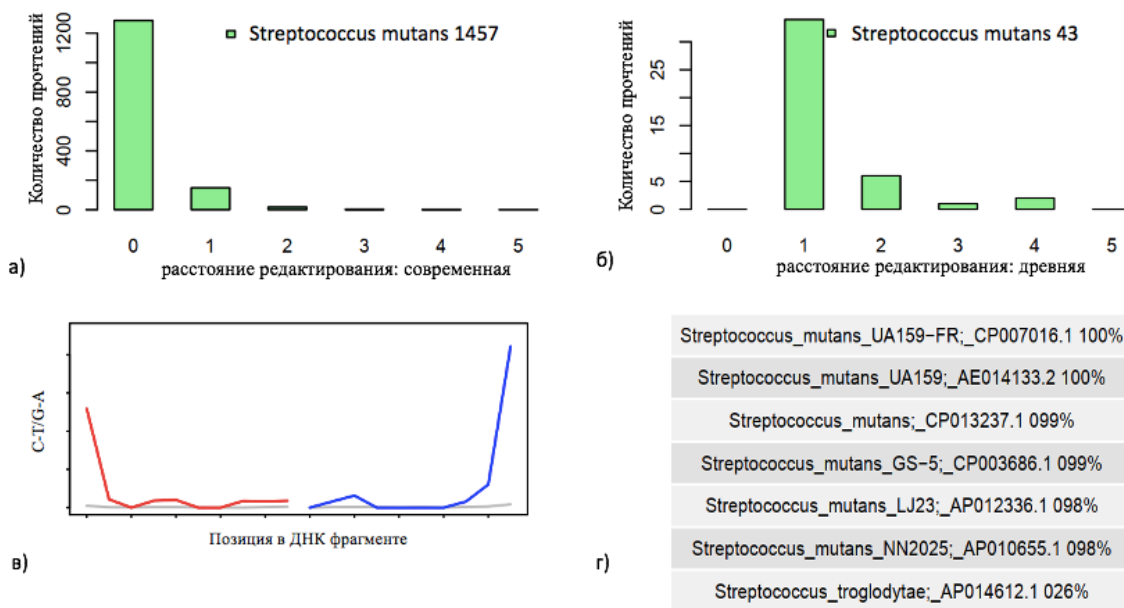
Неправильное считывание может произойти, когда базы данных неполные: многие виды в метагеномной выборке могут не иметь репрезентативного эталонного генома в базе данных, и, следовательно, могут быть ошибочно отнесены к ближайшему генетическому совпадению, которое может принадлежать к другому виду или даже роду. Картирование на неправильный вид, как правило, приводит к увеличению количества несоответствий в чтении, что проявляется в распределении расстояний редактирования.

Напротив, если последовательное считывание приписывается правильному эталонному виду, распределение расстояний редактирования должно непрерывно снижаться, при этом большинство чтений отсутствуют, либо содержат несколько несоответствий, в основном в результате повреждения ДНК или эволюционное отличие современных от древнего генома. Программа суммирует форму распределения расстояния редактирования по очкам, которые мы называем отрицательными: пропорция разницы ($-\Delta\%$), использующая в считывании последовательности. Для $-\Delta\%$ берутся значения между 0 и 1, где 1 указывает на строгое сокращение расстояния редактирования. В то время как истинные положительные значения имеют $-\Delta\%$ от 1, когда достаточно эндогенных видов.

Древнее происхождение ДНК оценивается путем анализа ДНК неправильное кодирование повреждений. Наиболее заметной из наблюдаемых модификаций является дезаминирование цитозина в урацил, который считывается полимеразой как тимин. Это приводит к перепредставленности С>Т-замещений в конце 5', и соответственно G>A замены в конце 3' [127]. Параметры постобработки требуют наличия только одного ошибочного кодирования, по крайней мере, в одном чтении, чтобы квалифицироваться как проявление повреждений. Это увеличивает до максимума чувствительность и позволяет авторизации функционировать в значительной степени независимо от глубины чтения.

Наш дальнейший анализ был связан с оценкой палео-ДНК специфичной модификации считанных последовательностей ДНК патогенов, генетических расстояний от референсных геномов древних и современных штаммов, исключении дубликатов, оценке копийности. На основании этих данных был определен уровень контаминации из окружающей среды и установлено наличие древних патогенов в костных останках. Примеры позитивного анализа древних патогенов в исследуемых образцах представлены на рисунке 16 (*Streptococcus mutans*).

KB004.A0101.SG1.1_SO_L006_R1_001.fastq



- а) Расстояния редактирования референтных образцов по умолчанию;
- б) Расстояния редактирования для древних образцов;
- в) Участок повреждений;
- г) Сравнение с базой референтных организмов в BLAST

Рисунок 16 – Положительный образец на *Streptococcus mutans*, выявленный скринингом с помощью программного обеспечения HOPS

Для оценки точности таксономического распределения всех выровненных показаний, свидетельствующих о повреждении ДНК, мы еще раз оценивали расстояние редактирования, распределение с использованием показателя $-\Delta\%$, но теперь это выполняли только для образцов, в которых по уровню повреждения ДНК очевидны обусловленные древностью химические изменения.

На этом этапе требуется большее количество назначенных считываний (>100), чтобы надежно оценить расстояния редактирования, поскольку ожидается, что не все чтения подразумевают наличие древних организмов. Современные геномы микроорганизмов также будут считываться. Однако степень повреждения их ДНК будет весьма низкой (близкой или равной нулю), в соответствии к референсным геномам.

Поскольку в базе представлены сразу все референсные геномы, HOPS-анализ позволяет определять несколько патогенов в одном образце палео-ДНК. Мы выявили 111 образцов, характеризующихся наличием нескольких древних патогенов (мультипатогенные, количество патогенов указано в скобках: AIG001 (7), AIG002 (2), AIG005 (7), AIG006 (5), АКВ002 (7), АКВ003 (3), ВКВ002 (7), ВКВ003 (6), ВКВ002 (10), BRE016 (4), BRE020 (8), BRE022 (10), BRE026 (3), BRE027 (8), BRE028 (2), BSB001 (6), BSB003 (6), BSK002 (9), BSK006 (2), CLK001 (7), CLK002 (2), CPA001 (13), CPA002 (11), CSP001 (8), CSP003 (4),

KBL001 (2), KBU001 (6), KBU002 (5) KBU003 (5), KBT001 (2), KEN001 (4), KKB001 (4), KKB002 (3), KNL014 (5), KNL017 (10), KNL018 (4), KNL025 (2), KNL026 (14), KNL027 (27), KNL028 (3), KNL030 (3), KNL035 (2), KNL037 (3), KNT001 (6), KNT004 (10), KNT005 (2), KRM001 (10), KRL001 (3), KUS016 (5), KSK001 (4), KSH002 (5), KSH003 (8), KSH004 (5), KSH005 (8), KSZ006 (11), KTS001 (14), KZB001 (6), KZK001 (4), KZL001 (8), KZL003 (8), KZL004 (8), KZL005 (8), KSZ001 (2), KSZ003 (5), KSZ004 (7), KSZ007 (2), MBL001 (11), MER001 (9), MER002 (2), NUR003 (4), NUR004 (5), NUR005 (5), NTK001 (6), NZR001 (7), NZR002(12), TAL003 (10), TAL004 (10), TGP001 (10), PRR001 (5), PRR002 (5), PRR004 (5), UCH001 (3), UCH003 (7), UCH004 (9), USH004 (2), SBT001 (2), SGZ001 (10), SGZ002 (6), SHS001 (2), SHS002 (7), SHS005 (2), SHS003 (8), SHS004 (8), SMY002 (8), SMY003 (9), SMY005 (9), SMY006 (5), SMY007 (10), SMY008 (6), SMY009 (7), SMY010 (6), SRK002 (6), SRK003 (4), SRK004 (6), SRK005 (7), SRO001 (2), TRG001 (7), TRG002 (11), TND001 (8), WAR001 (4), ZHR003 (5).

Среди них мультипатогенностью наиболее отличались индивиды с некрополей Кенколь (сакско-массагетская культура, эпоха бронзы и раннего железа, Таласская долина, Кыргызстан), Айгырлы (сарматская культура, VI-V век до н.э. - II-IV век н.э., Мангышлак, Казахстан), Берел (сакская культура, IV-III до н.э., Алтай, Казахстан), Карашоки (Тасмолинская культура, IX-VI век до н.э., Карагандинская область, Казахстан), Самсы (раннее средневековье, Алматинская область, Казахстан. Так, например, причиной смерти одного древнего индивида с некрополя Кенколь (KNL027) мог быть широкий спектр воспалительных заболеваний, ботулизм или менингит, поскольку у него найдено 27 древних патогенов. Другой индивид с этого могильника характеризовался наличием 14 древних патогенов, вероятно, что причиной его смерти мог быть сальмонеллез, рак кишечника, либо менингит.

28 древних индивидов характеризовались наличием только одного древнего патогена, представленного хорошо выраженным титром: PPR002 - *Borrelia recurrentis*; BSK001 и SRK001 - *Clostridium botulinum*; PRO001 - *Clostridium sporogenes*, KLLK002 и KNL004 - *Enterobius vermicularis*; KNL033 - *Escherichia coli*; CPA002 - *Haemophilus influenzae*; BRE008 - *Hepatitis B*, KCH004 - *Neisseria gonorrhoeae*; BRE019, KGZ001, TAL005 - *Neisseria meningitidis*; CHB002, KNL001, KNL019, KNL022 и KSZ005 - *Salmonella enterica*; KRY001 - *Salmonella mansoni*, KRG002- *Streptococcus anginosus*; KSZ002 - *Streptococcus mutans*; KEN003 - *Streptococcus oralis*; CSP004 - *Streptococcus pyogenes*; KUS014, KYY001 - *Tannerella forsythia*; NUR002 - *Treponema denticola*; KGZ002 - *Veillonella parvula*; BSK007 - *Yersinia pseudotuberculosis*.

Это свидетельствует о том, что они могли болеть следующими инфекционными заболеваниями: *Borrelia recurrentis* – тиф; *Clostridium botulinum* и *Clostridium sporogenes* – ботулизм; *Enterobius vermicularis* – гельминтоз (острицы); *Haemophilus influenzae* - гемофильная инфекция, *Hepatitis B* – гепатит В, *Neisseria gonorrhoeae* – гонорея, *Neisseria meningitidis* - менингококковый менингит, *Salmonella enterica* и *Salmonella mansoni* – сальмонеллез, *Streptococcus*

anginosus, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pyogenes* – стафилококковые и стрептококковые инфекции воспалительного характера, включая кариес; *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* – парадонтоз; *Veillonella parvula* – воспалительные инфекции гнойного характера (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты скрининга патогенных микроорганизмов с использованием программного обеспечения – HOPS.

Наименование микроорганизма	Образцы	Кол-во
1	2	3
<i>Borrelia recurrentis</i>	PPR002	1
<i>Clostridium chauvoei</i>	KNT001, KNL027, TAL003, KZB001, PRR004, TGP001	6
<i>Clostridium botulinum</i>	BSK001, KNL030, KNL027, KSH002, KSH003, KTS001, SRK001, TAL003, TGP001	9
<i>Clostridium sporogenes</i>	CPA001, PRO001, BSK006, KNL027, KSH004, TAL003, TGP001	7
<i>Clostridium tetani</i>	MER002	1
<i>Enterobius vermicularis</i>	AKB002, BRE017, BRE028, BSK002, MER002, KLB002, KNL004, KNL017, KNL035, KZL004, NUR005	11
<i>Escherichia coli</i>	BSK006, BRE027, KNL014, KNL027, KNL028, KNL033, KNL037, KNT004, TAL003	9
<i>Fusobacterium hwasookii</i>	KNL026, KNT004, KRM001, KSH003, KSH005, KSZ003, KSZ004, KTS001, KZK001, NTK001, MBL001, MER001, PRR002, SBT001, SGZ001, SHS002, SHS003, SMY003, SMY004, SMY005, SMY007, SMY008, TND001, TRG002	24
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	AIG001, AIG005, AIG006, AKB002, BRE016, BRE022, BRE027, BKB002, BKB004, BSB001, BSB003, CLK001, CPA001, CPA002, CSP001, CSP003, KBU002, KBU003, KKB001, KNL017, KNL026, KNT004, KRM001, KSH004, KSH005, KTS001, KZL001, KZL003, KZL004, KZL005, NTK001, NZR002, NUR004, NUR005, NZR001, SGZ001, SGZ002, SHS003, SHS004, SMY003, SMY004, SMY005, SMY010, SRK002, SRK003, SRK004, SRK005, TAL003, TRG001, USH004, ZHR003	49
<i>Neisseria meningitidis</i>	AIG002, AIG005, AIG006, AKB002, BKB004, BRE019, BRE020, BRE022, BRE027, CLK001, CLK002, CPA001, CPA002, CSP001, CSP003, KBL001, KBU001, KBU002, KBU003, KBT001, KGZ001, KNL017, KNL026, KNL027, KNT004, KRM001, KSZ003, KTS001, KZL001, KZL003, KZL004, MER001, NUR004, NTK001, NZR002, SHS003, SHS004, SHS005, SMY001, SMY003, SMY005, SMY007, SRK005, TAL004, TAL005, TGP001, TND001, TRG002, WAR001, ZHR003	50

Продолжение таблицы 3

1	2	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	CPA002, CSP003, NZR002	3
<i>Hepatitis B</i>	BRE026, BRE028, BRE008, AKB003	4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NZR002	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AIG005, BRE027, BSK002, CPA002, KCH004, KNL017, KSZ006, KTS001, KZL001, KZL003, MBL001, UCH004	12
<i>Neisseria sicca</i>	KNL026, KNL027, KRM001, KSH004, KSH005, KSZ006, KTS001, KUS016, MER001, SGZ001, SMY003, SMY005, SMY007, TAL003, TAL004, TRG002, UCH004	17
<i>Streptococcus anginosus</i>	AIG001, BKB002, BKB003, BKB004, BSB001, BRE016, BRE020, CLK001, CPA001, CPA002, KBU001, KEN001, KNL026, KNL030, KNL037, KNT001, KNT004, KRG002, KRL001, KRM001, KSH002, KSZ004, KTS001, MBL001, NUR003, NZR001, NZR002, PRR001, SGZ002, SRK002, SHS001, SHS002, SHS004, SMY001, SMY002, SMY008, SMY009, SMY010, TAL004	39
<i>Parvimonas micra</i>	AKB003, BKB003, BSB003, CPA001, KNL037, KNT001, KNT004, KNT005, KSH002, KSH003, KSH005, KSZ006, NUR003, NZR001, NZR002, PRR002, SMY002, SMY009, SMY010, SRK004, TAL004, UCH004	22
<i>Salmonella enterica</i>	CHB002, CPA002, KNL001, KNL019, KNL022, KNL025, KNL026, KNL028, KNL037, KSZ005, SGZ001	11
<i>Salmonella mansonii</i>	KNL026, KRY001, SGZ002, SMY002, SMY003, TND001	6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	BSB001, BSB003, CPA001, KNL037, SHS002, SMY003, SMY007, SMY009	8
<i>Streptococcus aureus</i>	SMY006	1
<i>Streptococcus dysgalactia</i>	BKB002	1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AIG001, AIG005, AKB002, BRE022, BRE027, BKB002, BKB003, BKB004, BRE020, BSB001, BSB003, BSK002, CLK001, CPA001, CSP001, CSP003, KBT001, KBU001, KBU003, KEN001, KKB001, KNL017, KNL018, KNL025, KNL026, KNL027, KNL037, KNT004, KRM001, KSK001, KUS016, KZB001, KSH004, KSH005, KSZ003, KSZ004, KTS001, KZL001, KZL003, KZL004, MBL001, MER001, NTK001, NZR001, NZR002, PRR001, PRR002, PRR004, SGZ001, SGZ002, SHS002, SHS003, SHS004, SMY001, SMY002, SMY003, SMY004, SMY005, SMY006, SMY007, SMY008, SMY009, SMY010, SRK003, SRK004, SRK005, TAL003, TAL004, TGP001, TND001, TRG001, UCH003, UCH004, ZHR003	74

Продолжение таблицы 3

1	2	3
<i>Streptococcus gordonii</i>	AIG001, AIG005, AKB002, BKB003, BKB004, BRE020, BRE022, BRE026, BRE027, BSK002, CPA001, CPA002, CSP001, KBL001, KBU001, KBU002, KNL014, KNL018, KNL026, KNL027, KNL030, KNL035, KNT005, KSH003, KSH005, KSK001, KSZ003, KSZ004, KSZ006, KSZ007, KTS001, KUS016, KZB001, KZK001, KZL001, KZL003, MER001, NUR004, NZR001, NZR002, SHS002, SHS003, SHS004, SGZ001, SMY002, SMY005, SMY007, SRK002, SRO001, TAL004, TGP001, TND001, TRG001, TRG002, UCH001, UCH003, USH004, WAR001	48
<i>Streptococcus mutans</i>	BKB004, BRE021, BRE022, BSK002, CPA002, CSP001, KNL017, KNL026, KNL028, KSH003, KSZ002, KSZ004, KSZ006, KZL001, NUR005, SHS002, SMY007, SMY009, SRO001, TGP001, TRG002	21
<i>Streptococcus oralis</i>	BSK002, CLK001, CPA001, CPA002, KEN003, KNL014, KNL017, KNL026, KNL027, KRM001, KTS001, KSZ006, KZL003, PRR004, SRK005, TAL004, TRG001, TRG002, UCH001, UCH003, UCH004, WAR001	22
<i>Streptococcus pyogenes</i>	BKB002, CSP004, KNT004, KSZ001, MER001, PRR001, TRG002	7
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	BKB004, BRE020, BRE022, BRE026, BRE027, BSK002, CPA001, CPA002, KNL017, KNL026, KNL027, KNL037, KSZ006, MER001, NZR002, SHS005, SMY002, SMY006, SMY007, TAL003, TRG001, UCH001, UCH003, UCH004	24
<i>Streptococcus salivarius</i>	KSH003, KSZ006, KTS001, KZL004, MBL001, TRG002	6
<i>Tannerella forsythia</i>	AIG001, AIG002, AIG005, AIG006, AKB002, AKB003, BKB002, BKB003, BKB004, BRE016, BRE020, BRE022, BSB001, BSB003, BSK002, CLK001, CLK002, CPA001, CPA002, CSP001, KBU001, KBU002, KBU003, KEN001, KKB001, KKB002, KNL017, KNL018, KNL026, KNL027, KNL037, KNT001, KNT004, KRL001, KRM001, KSH002, KSH003, KSH005, KSK001, KSZ001, KSZ003, KSZ004, KSZ006, KTS001, KUS014, KUS016, KYY001, KZB001, KZK001, KZL004, KZL005, MBL001, MER001, NTK001, NUR003, NUR004, NUR005, NZR001, NZR002, PRR001, PRR002, PRR004, SBT001, SHS001, SHS003, SMY006, TAL003, TAL004, TGP001, TND001, TRG001, TRG002, SGZ001, SGZ002, SHS004, SMY001, SMY002, SMY003, SMY004, SMY005, SMY007, SMY008, SMY009, SMY010, SMY001, SMY001, SMY001, SMY001, SRK002, SRK003, SRK004, SRK005, UCH003, UCH004, ZHR003,	95
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	BSK007, KNL014, MBL001, SGZ001	4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KNL014, MBL001	2

Продолжение таблицы 3

1	2	3
<i>Yersinia pestis</i>	MBL001	1
<i>Treponema denticola</i>	AIG001, AIG005, AIG006, AKB002, BKB002, BKB004, BSB003, BRE016, BRE020, BRE022, BRE027, BSB001, BSK002, CLK001, CPA001, CSP001, KBU001, KBU003, KEN001, KKB002, KNL017, KNL018, KNL027, KNL037, KNT001, KNT004, KRL001, KRM001, KSH002, KSH003, KSH004, KSH005, KSK001, KSZ006, KSZ007, KTS001, KZB001, KZK001, KZL001, KZL003, KZL004, KZL005, MBL001, MER001, NTK001, NUR002, NUR003, NZR001, NZR002, PRR001, PRR002, PRR004, SGZ001, SGZ002, SHS003, SHS004, SMY001, SMY002, SMY003, SMY004, SMY005, SMY006, SMY007, SMY008, SMY009, SMY010, SRK002, SRK003, SRK005, SRK004, TAL003, TAL004, TGP001, TND001, TRG001, TRG002, UCH0003, UCH004, ZHR003	79
<i>Trichinella spiralis</i>	BRE022, KNT001, NUR005, TND001	4
<i>Veillonella parvula</i>	AIG001, AIG006, BKB003, BKB004, BRE020, BRE022, CPA001, CPA002, CSP001, KBU002, KGZ002, KKB001, KKB002, KNL026, KNL027, KRM001, KTS001, KUS016, KSZ004, KSZ006, KZB001, KZL001, KZL003, KZL004, MBL001, NUR004, NZR002, SGZ001, SHS002, SHS003, SHS004, SMY005, SMY008, SRK002, SRK004, SRK005, TAL004, TGP001, TRG002, UCH0003, UCH004, WAR001	42

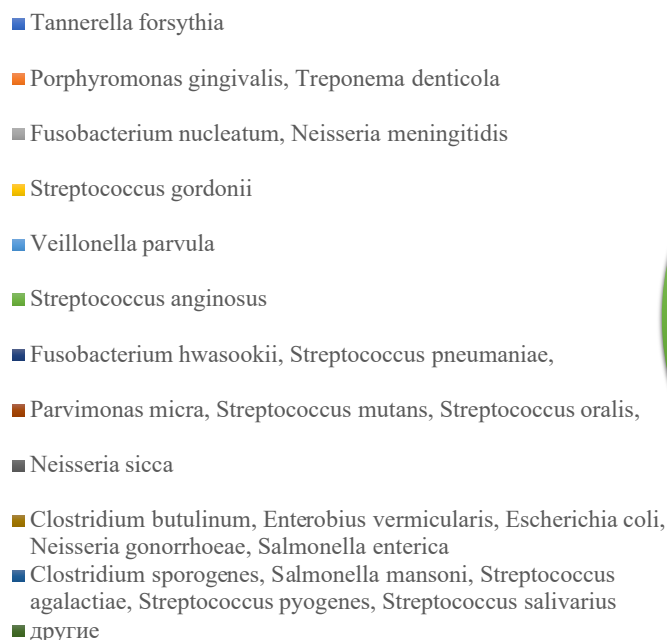


Рисунок 17 – Спектр наиболее часто встречающихся патогенных микроорганизмов в изученной выборке древних индивидов, выявленных с помощью программного обеспечения – HOPS [148]

На рисунке 17 представлена диаграмма, показывающая, что самое большое процентное соотношение патогенных микроорганизмов по итогам скрининга патогенных микроорганизмов с использованием программного обеспечения – HOPS [28], приходит на *Tannerella forsythia* и составляет 27%, затем *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* – 22%. *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus gordonii*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus anginosus* составляет от 14-11%. Самое низкое значение, до 1% приходит на такие патогенные микроорганизмы, как *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Trichinella spiralis*, *Streptococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Hepatitis B*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium chauvoei* и *Borrelia recurrentis*.

Очевидно, что самыми распространенными патогенами древнего мира эпохи бронзы и железного века были микроорганизмы, вызывающие кариес, заболевания десен и других мягких тканей ротовой полости (*Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Tannerella forsythia*, *Veillonella parvula* и др.). Кариес известен с древних времен в связи с переходом цивилизации к земледелию и возрастанием роли сельскохозяйственных культур в продуктах питания.

Весьма распространенными были инфекционные воспалительные заболевания разных органов, включая заболевания крови, мозга (менингит), грудной клетки, лёгких, печени, кишечника, суставов и других органов брюшной полости. Зачастую эти заболевания могли носить гнойный характер.

Передаваемые животными паразитарные заболевания, такие как гельминтоз, сальмонеллез, брюшной тиф также отмечены у отдельных индивидов, представляющих разные некрополи. Частыми были случаи венерических заболеваний.

География таких заболеваний, как сальмонеллез, весьма специфична. Так, это заболевание весьма часто встречалось на территории современного Кыргызстана: могильники Кенкольский, Чеш-Тюбе, Кара-Саз. Наверняка, это связано с теплым климатом, при котором продукты животного происхождения быстро портились. Так, 2 из 3-х случаев обнаружения *Salmonella enterica* в древних образцах с территории современного Казахстана, относятся к Алматинской области (Орикты, Таргап). Один случай сальмонеллеза отмечен в Центральном Казахстане (Коба) и один – в Западном Казахстане (Сегизсай). Положительные образцы на *Salmonella enterica*, выявленные скринингом HOPS:

1) СНВ002 (могильник Чеш-Тюбе, объект #622, I-V века, Таласская долина, Кыргызстан)

2) KNL001 (могильник Кенкольский, объект #679, курган 9, I-II века, VII-VIII века, Таласская долина, Кыргызстан)

3) KNL019 (могильник Кенкольский, объект #697, курган 7, I-II века, VII-VIII века, Таласская долина, Кыргызстан)

4) KNL022 (могильник Кенкольский, объект #701, I-II века, VII-VIII века, Таласская долина, Кыргызстан,)

- 5) KNL025 (могильник Кенкольский, объект #704, курган 32, I-II века, VII-VIII века, Таласская долина Кыргызстан)
- 6) KNL026 (могильник Кенкольский, объект #705, курган 32, I-II века, VII-VIII века, Таласская долина, Кыргызстан)
- 7) KNL028 (могильник Кенкольский, Кыргызстан, объект #706, курган 28, VII-VIII века)
- 8) KSZ005 (некрополь Кара-Саз, объект #602, IV век, Кошкорская область, Кыргызстан)
- 9) CPA002 (некрополь Копа, курган 4, Тасмолинская культура, VIII-IV век до н.э., Карагандинская область, Каркаралинский район, село Нуркен, Казахстан)
- 10) ORI003 (могильник Орикти, могила №3, IX—VII века до н. э., Енбекшиказахский район, Алматинская область, Казахстан)
- 11) SGZ001 (могильник Сегизсай, курган 2, захоронение 4, Савромосарматский период, V-IV век до н.э., Актюбинская область, Казахстан)
- 12) TGP001 (могильник Таргап, курган 1, Жамбылский район, Алматинская область, Казахстан).

Такие опасные заболевания, как чума, отмечены только у единичных индивидов. Это означает, что распространенные на территории Центральной Евразии древние штаммы *Yersinia* не вызывали заболеваний, имеющих характер эпидемий.

При этом стоит отметить различие в выявляемости штаммов *Yersinia* разными методами анализа. Так, по результатам НОПС анализа, чумная палочка *Yersinia pestis* обнаружена только у индивида MBL001 из некрополя Майкубель-2 (Тасмолинская культура, VIII-IV века до н.э., Павлодарская область, Казахстан). Этот факт не подтвердился результатами скрининга методом qPCR. Более детальный анализ обусловленных временем химических повреждений ДНК показал, что штамм *Yersinia pestis* у индивида MBL001 не древний, а мог быть результатом почвенной контаминации современными штаммами. В отличие от него образец BSK007 (Бишкекское Несторианское кладбище Кара-Джигач, 1338-1339 гг., Кыргызстан), который также не показал наличие *Y. pestis* при скрининге методом qPCR, при детальном анализе характера повреждений ДНК позволил выявить наличие древнего штамма чумной палочки. Однако, образец KZL002 (некрополь Кызыл, Тасмолинская культура, женщина, 2736-2457 лет до н.э., Карагандинская область, Казахстан) при первичном скрининге методом qPCR сразу показал наличие древнего штамма *Y. pestis* в очень высоких концентрациях.

Возможно, обнаружение чумной палочки на позднесредневековых кладбищах Кара-Джигач и Бурана, расположенных в Чуйской долине, недалеко от озера Иссык-Куль в современном Кыргызстане (рисунок 18) имеет отношение к ранней истории Второй пандемии чумы.

Раскопки данных кладбищ проводились российским археологом, этнографом Пантусовым Н.Н. ещё в конце XIX века (1885-1886 гг.). Позже они были переданы в Кунсткамеру в Санкт-Петербурге, где и был собран материал.

Благодаря глубокому анализу и изучению материалов по данным кладбищам, британским историком, профессором Филипп Славиним было предложено изучить эти образцы.



Рисунок 18 – Карта расположения несторианских кладбищ Кара-Джигач и Бурана в Кыргызстане

С момента их первого описания в 1890-х годах [3, 27], эти памятники вызвали многочисленные дискуссии относительно их возможной связи с европейской «Черной смертью» [19, 137]. В частности, надписи на надгробных плитах, обнаруженные в Кара-Джигаче, показывают непропорционально большое количество захоронений, датируемых 1338–1339 гг. н.э [94, 142], с надписями, конкретно указывающими причину смерти от «эпидемии». (на сирийском языке *mawt'ān'ā*) [94, 142]. Эти результаты были расценены как свидетельство эпидемии чумы и, как таковые, породили гипотезы относительно связи этого события с началом Второй пандемии чумы [39, 94, 142].

Три индивида (BSK001, BSK003 и BSK007), обнаруженные на кладбище Кара-Джигач, демонстрировали потенциальные доказательства наличия древней ДНК *Y. pestis*, что подтверждается малым расстоянием редактирования до современных эталонных последовательностей и наличием дезаминирования, связанного с палео-ДНК.

Для того, чтобы проверить гипотезу о связи штаммов *Y. pestis* из несторианских кладбищ Кыргызстана, мы рассмотрели их разнообразие. Рисунок 19 демонстрирует наличие штаммов *Yersinia* в исследованных образцах из Бишкекского Несторианского кладбища, включая опасный штамм *Y. pestis* и его филогенетических предшественников (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*).

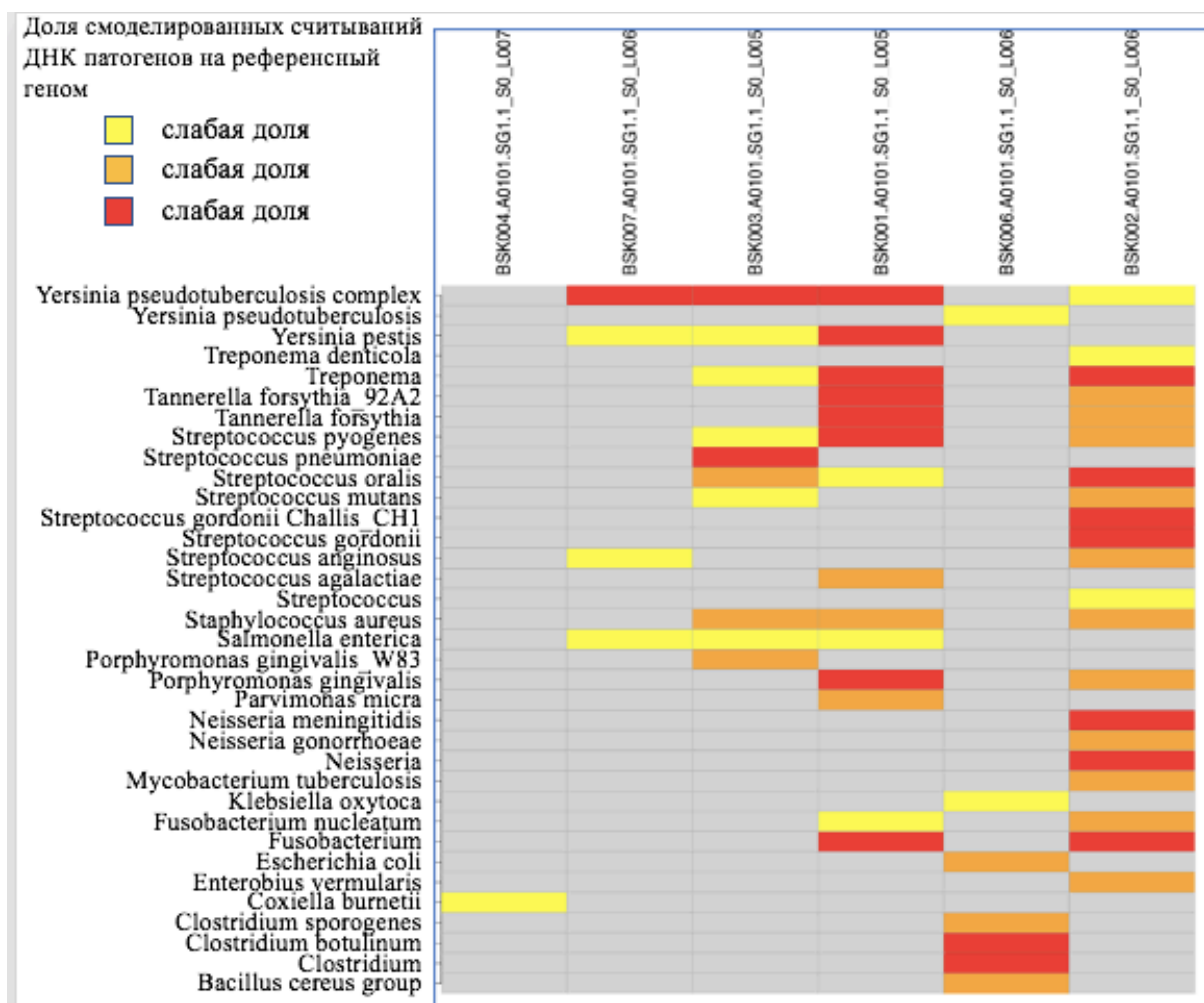


Рисунок 19 - Скрининг образцов из Бишкекского Несторианского кладбища (BSK) на наличие патогенов, включая штаммы *Yersinia*, методом HOPS

Используя синтез археологических, исторических и древних геномных данных, мы демонстрируем явное участие бактерии чумы *Yersinia pestis* в этом событии 1338–1339 гг. Филогенетический анализ реконструированных древних геномов *Y. pestis* показывает, что они являются ближайшими предшественниками крупного события диверсификации, обычно связанного с возникновением пандемии, которое здесь датируется первой половиной 14 века.

Сравнение с современным генетическим разнообразием современных резервуаров *Y. pestis* в расширенном регионе Тянь-Шаня подтверждает местное происхождение восстановленного генотипа. Наши данные предоставляют доказательства *Y. pestis* начала XIV века из Центральной Евразии, обращаясь к давно выдвигавшимся гипотезам относительно источника второй пандемии чумы.

Среди вирусных заболеваний, отдельного обсуждения заслуживает обнаружение вируса гепатита В [143] в Горном Алтае и в степях Центрального Казахстана.

Методом HOPS мы обнаружили 4 положительных на вирус гепатита В древних образца:

1) BRE008.A0101 (некрополь Берел, хунно-сяньбийский пласт, 252-378 н.э., женщина, находка 2017 г., Катон-Карагайский район Восточно-Казахстанской области, Казахстан);

2) BRE026.A0101 (некрополь Берел, хунно-сяньбийский пласт, находка 2008 г., Катон-Карагайский район Восточно-Казахстанской области, Казахстан);

3) BRE028.A0101; (некрополь Берел, пласт Пазырыкской культуры, IV-II век до н.э., находка 2008 г., Катон-Карагайский район Восточно-Казахстанской области, Казахстан);

4) АКВ003.A0101 – (Могильник Акбеит, курган 7, Тасмолинская культура, VIII-V вв. до н. э., Карагандинская область, Казахстан).

Первые раскопки на некрополе Берел [144, 145] относятся к 2003 г. С тех пор на Берел обнаружено около 50 курганов, большинство из них относятся к пазырыкской культуре IV-II век до н.э. (Долина царей). Однако, находки 2008, 2013 и 2017 годов, не относящиеся к элитным курганам ранних саков, принадлежат к более позднему хунно-сяньбийскому пласту, который укладывается в широкие рамки так называемой эпохи Великого переселения народов (II в. до н.э. - VI век н.э.). Эти различные структуры захоронений вместе с разной ориентацией умерших и случайным включением лошадей в погребения указывают на этнокультурное разнообразие этого пласта Берел. В частности, некоторые материалы хунно-сяньбийского периода, обнаруженные на стоянке, имеют прямые аналогии с гуннскими могильниками Забайкалья.

Стоит отметить, что вирус гепатита В, появился в Казахстанской части Алтая еще до нашей эры (образец BRE028 Пазырыкской культуры). Два более поздних, положительных на вирус гепатита В образца, с некрополя Берел свидетельствуют о широком распространении этого вируса в хунно-сяньбийской популяции Горного Алтая. Этно-культурное разнообразие этой популяции и ее высокая миграционная активность может объяснить вспышки гепатита в других популяциях Восточной, Центральной Евразии, вплоть до Европы [145].

Тот факт, что в Центральном Казахстане, еще до нашей эры, зафиксировано появление вируса гепатита В (некрополь Акбеит) свидетельствует о необходимости анализа филогенетических связей древних штаммов этого вируса с учетом широкой географической локализации [146].

3.6 Полногеномный гибридизационный захват ДНК наиболее важных древних патогенов: микроорганизмов *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica* и вируса гепатита В

Однако, чтобы окончательно удостовериться в том, что найденные с помощью NOPS древние опасные патогены, действительно присутствуют в зубах древних людей, мы использовали полногеномный гибридизационный захват на патоген (Capture) с использованием специфических зондов к *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica* и *Hepatitis B virus*, как описано в разделе 2.4.

3.6.1 *Yersinia pestis*

Применение данного подхода (вторичный скрининг на *Yersinia pestis*) позволило подтвердить наличие эндогенных древних штаммов *Yersinia pestis* для 4-х образцов:

1) KZL002.A0101 (некрополь Кызыл, Тасмолинская культура, женщина, 2736-2457 до н.э., находка 2008 г., с. Шабанбайбы, Актогайский район, Казахстан)

2) BSK001.A0101 (Бишкекское несторианское кладбище Кара-Джигач, 176/4 могила 19, находки 1885-1886 гг., 1338-1339 н.э., Бишкек, Чуйский район, Чуйская область, Кыргызстан)

3) BSK003.A0101 (Бишкекское несторианское кладбище Кара-Джигач, 176/7 могила 28, находки 1885-1886 гг., 1338-1339 н.э., Бишкек, Чуйский район, Чуйская область, Кыргызстан)

4) BSK007.A0101 (Бишкекское несторианское кладбище Кара-Джигач, 5559/2 могила 9, находки 1885-1886 гг., 1338-1339 н.э., Бишкек, Чуйский район, Чуйская область, Кыргызстан).

Рассматривая объекты из Бишкекского несторианского кладбища Кара-Джигач, стоит отметить, что для палео-ДНК образцов BSK001 и BSK003 данные Capture анализа полного генома *Y. pestis* показали 6,87х- и 2,60х-кратное среднее покрытие, соответственно, а также охват всеми тремя плазмидами *Y. pestis* в диапазоне от 1,2 до 14,8 раз. Для образца BSK007, в результате более низкого уровня сохранности палео-ДНК, геномный охват ДНК *Y. pestis* оказался ниже, ~ 0,12 раза.

Напомним, что для одного образца - MBL001 из некрополя Майкубель-2 (Тасмолинская культура, VIII-IV века до н.э., Павлодарская область, Казахстан), методом HOPS было ранее установлено наличие современного штамма, который мог быть результатом контаминации из почвы. Этот образец мы не включали в Capture.

Подтверждение результатов наличия древнего штамма *Yersinia pestis* у образца Тасмолинской культуры KZL002 (некрополь Кызыл, 2736-2457 лет до н.э.) очень важно, поскольку ранее в литературе не было свидетельств о наличии чумной палочки в эпоху раннего железного века на территории современного Казахстана. Единственный случай чумной палочки в Центральной Евразии был детектирован у образца эпохи бронзы из Самарской области [66]. В то время как, в Европе чумная палочка в древних образцах обнаруживалась, начиная с эпохи бронзы [47]. Центральный степной регион, по-видимому, играл значительную роль в качестве миграционного коридора на протяжении всего бронзового века, и как таковой, вероятно, способствовал распространению связанных с человеческими патогенами, таких как *Y. pestis*, по всей Евразии. Обнаружение чумных штаммов в Центрально-Казахстанской степи ранне-железного века помогает восполнить временные пробелы, связанные с распространением *Y. pestis* по Евразийскому континенту. Эпидемичность этого штамма и его отличие от европейских штаммов бронзового века можно будет оценить только после

дополнительных исследований последовательности *Y.pestis* в этом образце и филогенетическом анализе.

Первые вспышки Юстинианской чумы датируются 541 годом н.э. [71]. Вторая пандемия эпохи средневековья связана с «Черной смертью», пик которой пришёлся на 1346—1353 годы, а повторные вспышки продолжались вплоть до XIX века [127, 128]. Показавшие наличие древних штаммов *Yersinia pestis*, образцы из средневекового Бишкекского несторианского кладбища (кладбище Кара-Джигач: образцы BSK001, BSK003, BSK007), находящегося в Чуйской области (Кыргызстан), подтверждают гипотезы о том, что несторианцы, миссионеры христианства в Центральной и Южной Азии, могли быть носителями штамма, являющегося предшественником второй эпидемии чумы в Европе – Черная смерть. Могильные надгробия, датированные 1338-1339 гг. (до появления «Черной смерти» в Европе) подтверждают, что чума носила характер эпидемии и являлась причиной смерти многих индивидов этого несторианского поселения [39, 137, 142].

Известно, что усилиями миссионеров несторианство было широко распространено среди иранских, тюркских и монгольских народов Центральной Азии, Великой степи и Кавказа, в том числе осетин, хорезмийцев, согдийцев, хазар, каракеитов, меркитов, найманов, уйгуров [147], карлуков и кыргызов [148]. Несторианство в 635 году дошло до Китая, даже императоры позволяли несторианцам строить свои церкви в Китае. Есть сведения, что миссионеры проникли даже в Японию [149]. Эти обстоятельства связи несторианцев с народами Востока и Запада Евразии, предполагают искать источники возникновения и распространения эпидемичных штаммов не только в предгорьях Тянь-Шаня, но и гораздо восточнее. Тем не менее открыть секреты возникновения «Черной смерти» можно только с помощью анализа мутаций и филогенетического анализа всех древних и современных штаммов *Yersinia pestis*.

3.6.2 *Salmonella enterica*

Относительно распространения условно патогенных организмов известна гипотеза, что переход от неолита к сельскохозяйственной и скотоводческой деятельности способствовал появлению адаптированных к человеку патогенов, которые были обнаружены ранее из Западной Евразии возрастом до 6500 лет [45]. Условный патоген желудочно-кишечного тракта *Salmonella enterica* относится как раз к таким микроорганизмам.

Несмотря на высокое генетическое разнообразие *Salmonella enterica*, все древние бактериальные геномы сгруппированы в единую ранее не охарактеризованную ветвь, содержащую *S. enterica*, адаптированную к множеству видов млекопитающих. Понимание диапазона хозяев древней *S. enterica* дает информацию о различных эволюционных траекториях в направлении адаптации человека и млекопитающих в разных регионах.

Результат Capture для *Salmonella enterica* однозначно подтвержден для образцов CRA002.A0101; KNL026.A0101; TGP001.A0101; KSZ005.A0101.

Образец CPA002.A0101 из сакского некрополя Коба (курган 4, Тасмолинская культура, VIII-IV век до н.э., Карагандинская область, Каркаралинский район, село Нуркен, Казахстан) [13].

Образец KNL026.A0101 из могильника Кенкольский, объект #705, курган 32, I-II века, VII-VIII века, Таласская долина, Кыргызстан;

Образец TGP001.A0101 из могильника Таргап, курган 1, Жамбылский район, Алматинская область, Казахстан ;

Образец KSZ005.A0101 из некрополь Кара-Саз, объект #602, IV век, Кошкорская область, Кыргызстан

Остальные образцы, характеризующиеся более слабым сигналом, находятся в процессе обработки. Условный патогенный микроорганизм желудочно-кишечного тракта *Salmonella enterica* был обнаружен у образца CPA002.A0101, KNL026.A0101; TGP001.A0101; KSZ005.A0101.

3.6.3 Hepatitis B virus (HBV)

Применение специфических зондов на основе современного референсного генома HBV (Capture) позволило достоверно установить наличие древних линий HBV для всех ранее выявленных образцов (BRE008.A0101; BRE026.A0101; BRE028.A0101 и АКВ003.A0101), что подтверждает результаты ранее проведенного HOPS анализа. Напомним, что 3 из этих образцов из некрополя Берел (Катон-Карагайский район Восточно-Казахстанской области), причем относящиеся к разным археолого-культурным пластам – 1 образец Пазырыкской культуры (IV-II век до н.э.) и 2 образца хунну-сяньбийской культуры (II в. до н.э. - VI век н.э.). Факт, что в Горном Алтае и Центральном Казахстане (некрополь Акбеит, курган 7, Тасмолинская культура, VIII-V вв. до н. э., Карагандинская область, Казахстан), еще до нашей эры, зафиксировано появление вируса гепатита В очень важен, поскольку может пролить свет на возникновение пандемичных штаммов HBV.

Возможность выделения ДНК HBV из археологических человеческих останков была показана только недавно [46]. До настоящего времени реконструировано только 19 древних ДНК HBV с ограниченным временным и географическим распределением, в результате чего большая часть древнего разнообразия этого вируса остается неизвестной. Наши данные являются хорошим дополнением к общим сведениям о предковых линиях современных эпидемичных штаммов HBV.

3.7 Филогенетический и статистический анализ

Для определения филогенетических предшественников обнаруженных патогенных организмов, их связи с древними и современными штаммами патогенов, оценки их эпидемичности и географического распространения, необходимо было провести филогенетический анализ, используя все доступные литературные источники и базы данных.

Филогенетический анализ проводили для *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica* и HBV (раздел 2.6) с учетом вновь обнаруженных древних линий

патогенных организмов и ранее опубликованных данных по древним и современным линиям патогенов.

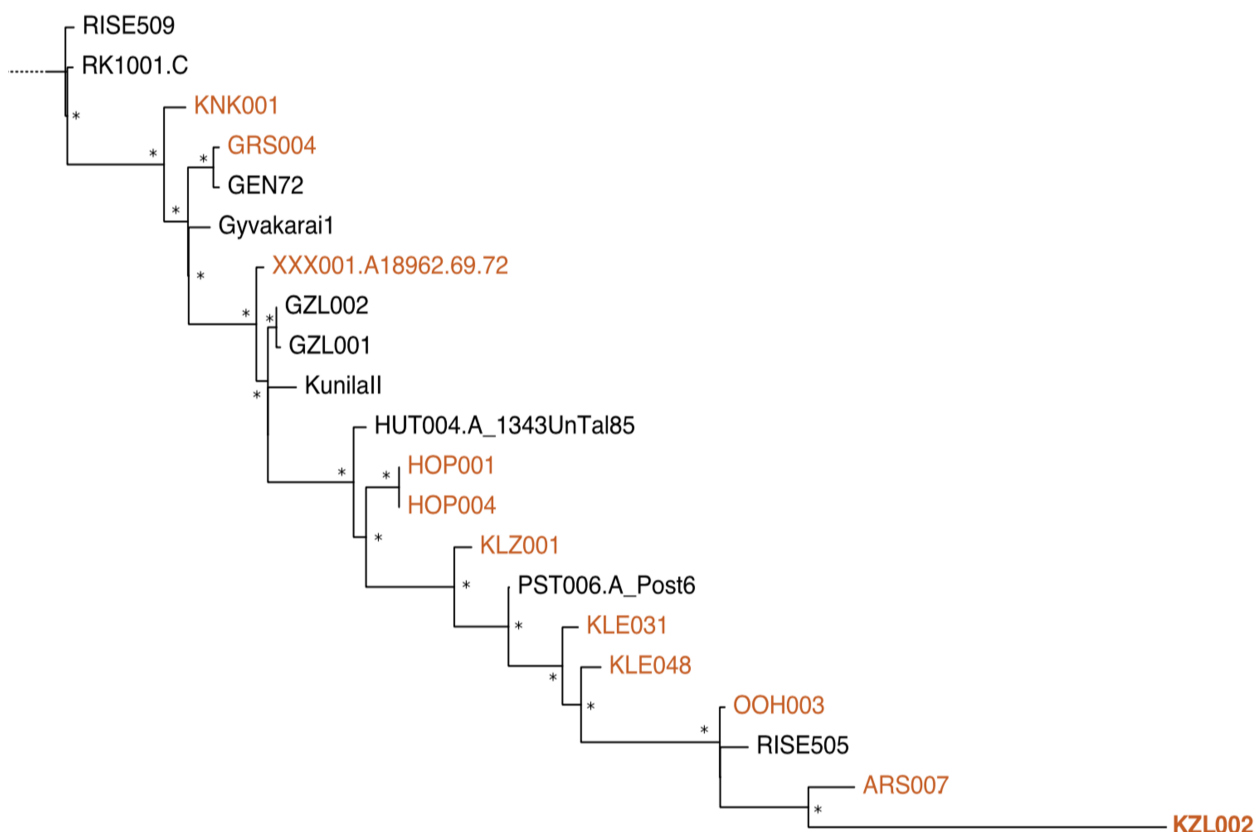
Для анализа были использованы базы данных Макс Планк Института наук изучения истории человечества (Max Planck Institute for the Science of Human History) Йена, Германия, который является лидером в изучении истории древних патогенов. Большую помощь в проведении биоинформационного анализа и филогении оказали члены исследовательской группы моего научного руководителя Йоханнеса Крауза: Мария Спироу, Аида Андрадес, Гуннар Нейман и Александр Хербиг (*Yersinia pestis*), Гуннар Нейман и Александр Хербиг (*Salmonella enterica*), Артур Кочер, Родриго Баргуэро и Александр Хербиг (HBV).

3.7.1 Результаты филогенетического анализа выявленных древних штаммов *Yersinia pestis*

Для оценки филогенетического родства выявленных в данной работе древних штаммов *Y. pestis* использовано 280 геномов, включая 233 современных представителей *Y. pestis*, а также ранее определенных 47 древних геномов, датированных от периода неолита до средневековья. В анализ также были включены три штамма *Y. pseudotuberculosis* типа ST16, имеющих наивысшую геномную идентичность с референсной последовательностью *Y. pestis* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=214092>), а также эталонный геном *Y. pseudotuberculosis* IP32953, который использовался в качестве внешней группы для построения филогенетического дерева.

При первичном скрининге, 30 современных геномов *Y. pestis* было исключено из анализа по причине обнаружения в них непооследовательных мутаций, отражающихся на филогенетическом дереве длинными ветвями. Такой эффект в бактериальных филогениях может быть результатом либо истинного биологического разнообразия, либо технических артефактов, связанных с ложным включением SNP при реконструкции генома.

Хотя теоретически мы не можем исключить существование штаммов *Y. pestis* с чрезвычайно высокой частотой мутаций, анализ литературных данных показывает, что современные штаммы *Y. pestis* с "мутаторными" профилями являются редкостью [41]. Поскольку потенциально неправильные сборки или ложноположительные SNP могут повлиять на эволюционные выводы и оценки разнообразия, 30 линий были исключены, дальнейший анализ проводили на основе 203 геномов *Y. pestis*. Филогенетический анализ *Y. pestis* проводили с учетом 1,894 SNP и 100 итераций (многократных повторов) начальной загрузки (рисунок 20).



Примечание - Красным обозначены неопубликованные ранее образцы бронзового века, которые использовались в данном исследовании: KNK001 – Красногвардейское, Россия; GRS004 – Грошсторквитц, Германия; XXX001 – Дерейвка I, Украина; HOP001 – Хостивис-Палюки, Чехия; HOP004 - Хостивис-Палюки, Чехия; KLZ001 - Калужный I, Россия; KLE048 – Клейнайтинген, Германия; OOH003 – Оберотмашаузен, Германия; ARS007 – Арбулак сум, Монголия; KZL002 – Кызыл, Казахстан

Рисунок 20 - Филогенетическое дерево *Y. pestis* образцов бронзового века с образцом из Казахстана KZL002

На основе всех древних геномов *Y. pestis* от периода неолита до эпохи бронзы с включением нашего образца KZL002 (некрополь Кызыл, Казахстан), датированного ранним железным веком, с помощью BEAST v1.1028 программы [104, 114] было исследовано время расхождения между *Y. pestis* и его ближайшим родственником *Y. pseudotuberculosis* (рисунок 21). Демографическая модель выявила широкие интервалы дат дивергенции, показывающие периоды от 5019 до 7923 лет. Более того, время появления патогенного штамма *Y. pestis* от его филогенетического предшественника, условнопатогенного штамма *Y. pseudotuberculosis* было оценено датой 28110 лет назад. Время разделения совокупности линий поздненеолитического периода, бронзового и раннежелезного века совпадает со временем разделения наиболее сильно расходящихся современных линий *Y. pestis*.

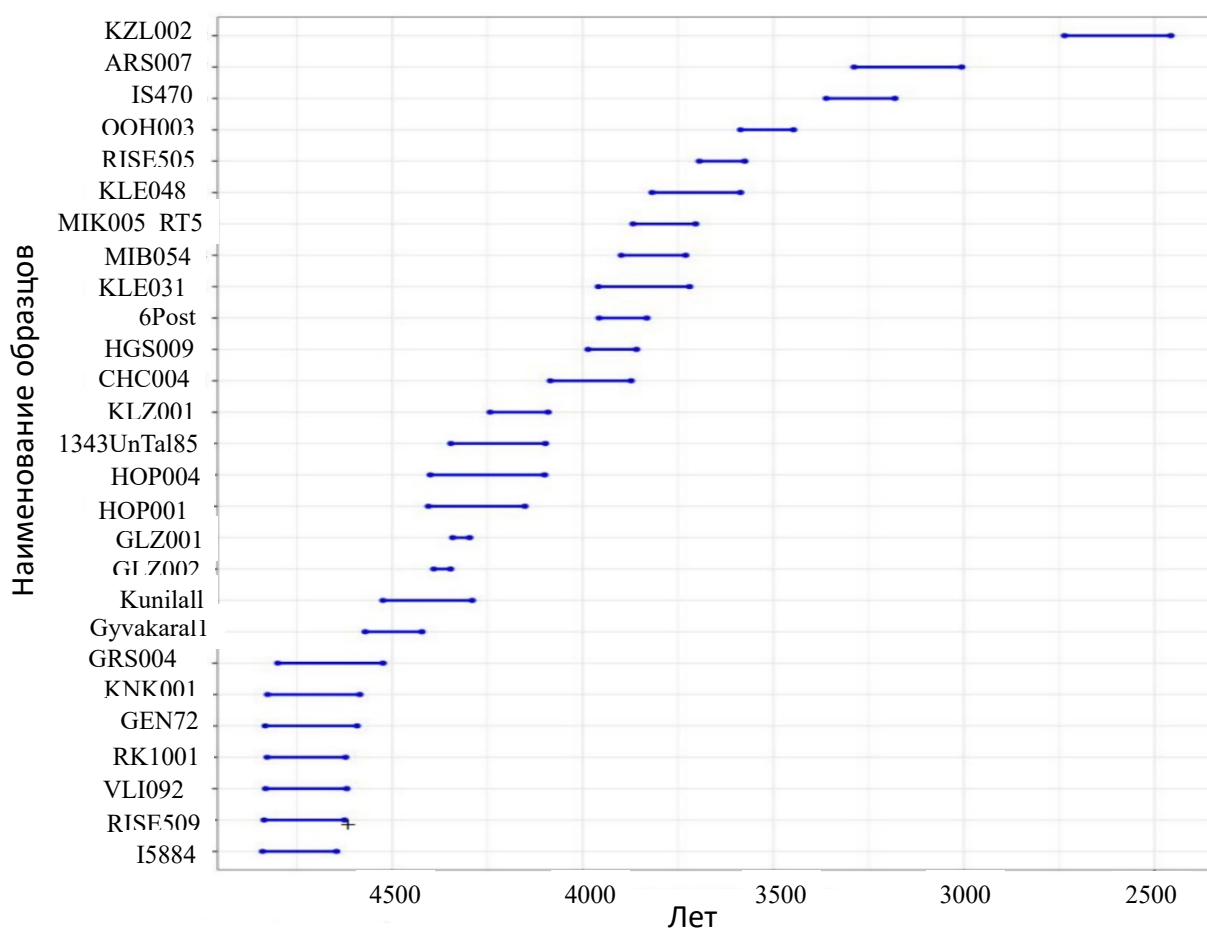


Рисунок 21 – Датировка образцов из филогенетического древо *Y. pestis*

Современное разнообразие и геномный состав геномов LNBA-демонстрирует иные характеристики по сравнению с линиями, адаптированными к блохам, которые ответственны за более поздние эпидемии чумы.

Чтобы проверить, произошли ли геномы монофилетической ветви LNBA-от одной популяции, которая обеспечивала постоянный источник патогена без параллельной диверсификации, мы изучили потенциальную корреляцию между генетическим и географическим расстоянием и генетическим и временным расстоянием. Это указывает на параллельную диверсификацию нескольких клад *Y. pestis*, которые могут быть обусловлены разными историями миграций и разными путями передачи инфекции, возможно, через разных животных. Наконец, время разделения недавно опубликованных [150] и недавно секвенированных древних, адаптированных к блохам штаммов (RT5 и I2470), датировано периодом 3728-4476 лет до н.э., что соответствует предыдущим оценкам и подтверждает их параллельное появление с линией чумы бронзового века.

Древние геномы *Y. pestis*, полученные от людей, живших 5000-2000 лет назад, выявили ключевые эволюционные особенности в ранней эволюции этого патогена. На сегодняшний день самые ранние свидетельства чумы у людей датируются примерно 5000 лет назад, когда в Евразии были обнаружены два

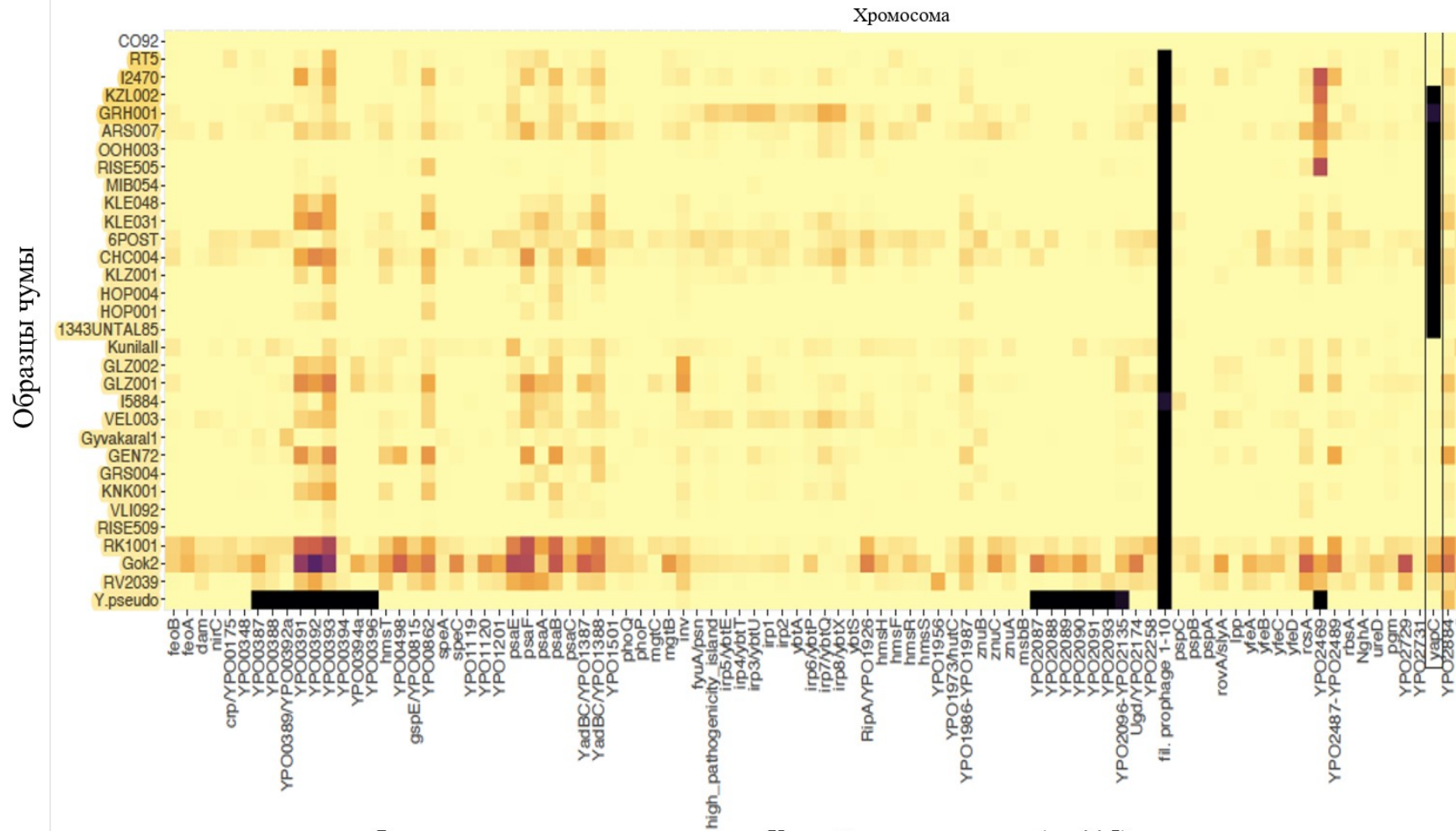
разных штамма: линия, идентифицированная в Швеции, которая хронологически близка к базальным штаммам *Y. pestis*, обнаруженных в популяциях LNBA из Кавказа и Горного Алтая. У этих ранних клонов отсутствовали генетические адаптации, которые необходимы для эффективной передачи *Y. pestis* через блох, а именно ген *ymt* (фактор трансмиссии), подавление генов регуляторов (*rcaA*, *ureD*, *PDE2*, *PDE3*) образования необходимой для трансмиссии биопленки в кишечнике блох, активизация которых определяется в штаммах, вызывающих бубонную форму чумы. Это привело к первоначальной гипотезе о том, что передача бактерии от блох возникла в результате генетических изменений, приобретенных во время железного века. Полностью адаптированный к блохам штамм (RT5) из России с возрастом 3800 лет назад, таким образом, временно сосуществующий с линией LNBA, опроверг это предположение, подтверждая это путем идентификации формы бактерии чумы у человека из Испании (I2470), который старше RT5 на 500 лет, свидетельствующим о широком распространении данной формы в Евразии. Результаты показывают, что большое разнообразие линий *Y. pestis* присутствовало в Евразии вскоре после появления всех известных штаммов *Y. pestis*.

В виду того, что определяемый специфическими мутациями потенциал вирулентности является базовым для географического распространения и его временных рамок, мы оценили статус (наличие/отсутствие) известных факторов вирулентности *Y. pestis* в древних штаммах. У некоторых геномов было отмечено присутствие полного набора известных факторов вирулентности как в бактериальной хромосоме, так и в плаزمиде, специфичных для *Y. pestis*, что свидетельствует о полной адаптации к организму блох, как переносчиков чумной палочки.

Также для всех штаммов подтверждено присутствие предкового, менее инфекционного варианта *pla* гена. Установлено, что некоторые древние линии, в том числе казахстанский образец раннежелезного времени KZL002 (некрополь Кызыл), лишены генов *ymt* и *YPM1*, играющих важную роль в эффективной передаче чумной палочки от блох [150, 151]. Чтобы определить, связано ли это явление с более существенной потерей генетического материала, мы провели тщательный поиск отсутствующих участков в хромосоме CO92 *Y. pestis* (рисунки 22 и 23).

Тепловые карты 159 известных факторов вирулентности генах *Y. pestis* были получены с помощью пакетов *ggplot2* и в R v.3.6 [102, 105].

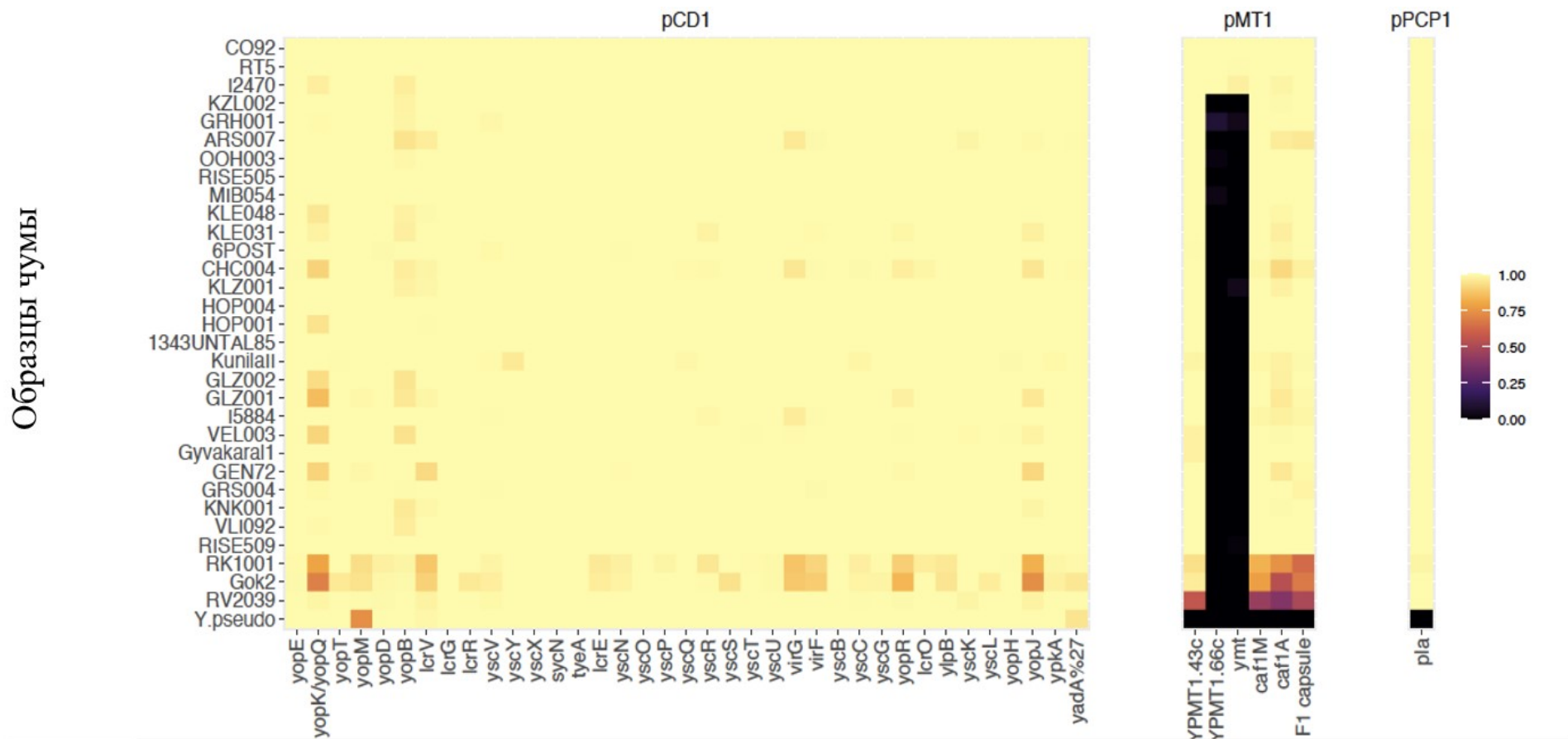
В результате были обнаружены множественные делеции размером более 500 пар оснований в совокупности линий позднеэолитического периода, бронзового и раннежелезного века, которые можно сгруппировать в пять событий в хронологическом порядке.



Факторы вирулентности генов *Y. pestis* в хромосоме (n=115)

Примечание - Желтый цвет обозначает 100 процентов гена, покрытого по крайней мере 1х, а черный - 0. Геномы упорядочены в соответствии с их филогенетическим расположением, аутгруппа *Y. pseudo* (*Y. pseudotuberculosis* IP32593) находится внизу

Рисунок 22 - Факторы вирулентности *Y. pestis* в хромосоме [152]



Факторы вирулентности генов *Y. pestis* в плаزمидах pCD1 (n=37), pMT1 (n=6) и pPCP1 (n=1)

Примечание - Желтый цвет обозначает 100 процентов гена, покрытого по крайней мере 1x, а черный - 0. Геномы упорядочены в соответствии с их филогенетическим расположением, аутгруппа *Y. pseudo* (*Y. pseudotuberculosis* IP32593) находится внизу

Рисунок 23 - Факторы вирулентности *Y. pestis* в плазмидах [152]

Первым событием стала потеря 35 kb области, в которую входит ген *varC*, у предковой линии 1343UnTal85 (могильник Тамула, каменный век, Эстония). За этим последовала потеря участка размером 1,5 kb, отмеченная у предка СНС004 (RISE139) (могильник Хоцивель, ранний бронзовый век, Польша). Далее была потеряна область размером 2 kb, что отмечено у предковых штаммов линий ООН003 (Погребение Обероттмарсхаузен, средний бронзовый век, Германия) и RISE505(Кытманово, бронзовый век, Россия). Делеция размером 37 kb, включающая гены *ymt* и *YPMТ1* обнаружена в геномах RISE505, ARS007 (курган Арбулаг, бронзовый век, Монголия), GRH001(погребение из городище Грушевское, поздний бронзовый век, Россия) и KZL002 (некрополь Кызыл, раннежелезный век, Центральный Казахстан). Наконец, самая большая делеция, включающая различные области генома СО92, которые в сумме составили более 83 kb обнаружена в линиях GRH001 и KZL002 [152].

Таким образом, определяется взаимосвязь геномов ООН003, RISE505, ARS007, GRH001 и KZL002. Используемый алгоритм филогении определяет кладу ООН003 и RISE505 предковой для ARS007, GRH001 и KZL002 (рисунок 24). Это значит, что потеря области 37 kb произошла после отделения от общей предковой для ООН003 и RISE505 линии. Детальный анализ содержания групп генов в делециях, сделанный на основе реконструкции по *vasK*-мутантному штамму, показал, что делеция размером 37 kb включает исключительно гены флагеллина. А более обширная делеция 83 kb содержит гены, связанные с системой секреции типа VI (Т6SS), в частности системы секреции Т6SS-G, потеря которых была связана с ослаблением вирулентности *Y. pestis*. Ген *vasK* присутствовал у штаммов LNBA. Отсутствие генов флагеллинов (*flgB* и *fliZ*) у этих штаммов LNBA может свидетельствовать об адаптивном уклонении *Y. pestis* от иммунной системы носителей штаммов (хозяина).

Для оценки потенциального эффекта однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), характерных для линий LNBA, на вирулентность *Y. pestis* мы выполнили анализ 892 SNP. Из них 444 SNP являются нейтральными (межгенные или синонимичные), 429 несинонимичных SNP могут влиять на функцию белка за счет аминокислотных изменений. Было определено 19 замен приводящих к псевдогенизации (1 потерянный стоп-кодон, 3 потерянных стартовых кодона и появление 15 стоп-кодонов). Было отмечено, что псевдогенизация, как и делетирование последовательностей, с большей скоростью проходили в линиях LNBA, чем в остальных базальных ветвях филогенетического дерева *Y. pestis*. Интересно, что два затронутых псевдогенизацией и делециями гена (*flgB* и *fliZ*) участвуют в синтезе жгутиков. Жгутиковая система инактивирована у всех существующих штаммов *Y. pestis*, что может также быть связано с адаптацией ее генома для уклонения от иммунного ответа хозяина.

Существующее разнообразие и генный состав линий LNBA показывают разные характеристики по сравнению с адаптированными к блохам линиями, которые ответственны за более поздние эпидемии чумы. Была исследована потенциальная корреляция между генетическими и географическими расстояниями по сравнению с временным расстоянием. Было определено, что линии LNBA происходят от одной линии, отличной от более поздних,

адаптированных к блохам линиям, в том числе клона, ответственного за «Черную смерть» в Европе [86, 153]. Таким образом, распространение и эволюция *Yersinia pestis* в Центральной Евразии и Европе осуществлялось параллельными путями.

Циркулировавшие в Центральной Евразии штаммы LNBA, вероятно, не вызывали тяжелых заболеваний и могли широко распространяться. Мы предполагаем, что люди не были единственными носителями болезни, поскольку мы не наблюдаем ни палеоэпидемиологических закономерностей, соответствующих крупным вспышкам заболевания среди людей, ни изменений в практике использования множественных захоронений. Напротив, все люди с положительным диагнозом на чуму в данном исследовании были похоронены в соответствии с местными погребальными обычаями, что указывает на то, что причина смерти не воспринималась как необычная.

Учитывая, что евразийская степь служила коридором связи между географически далекими человеческими популяциями, особенно в сочетании с усилением и расширением скотоводства в этот период [154-158], предполагается повышенный контакт или пересечение мест обитания между дикими животными (грызуны), людьми и их домашним скотом. Известны частые случаи чумы у животных [81, 135, 159] и редкие случаи, когда животные выступают промежуточными хозяевами при чуме у человека. Широкое географическое распространение линии LNBA- и тот факт, что она также достигла регионов за пределами степи (например, зоны смешанных лесов умеренного пояса в Центральной Европе, Алтай и Байкал), говорит об усиленной мобильности среди диких животных и/или людей с их домашними питомцами.

Основываясь на структуре филогенетического древа, мы предполагаем, что люди были не единственными поддерживающими хозяевами болезни, поскольку мы не наблюдаем палеоэпидемиологических закономерностей, соответствующих крупным человеческим вспышкам. Напротив, все люди были похоронены с большой осторожностью в соответствии с местными похоронными обычаями, что указывает на то, что причина смерти не считалась необычной. Кроме того, мы показали, что геномы LNBA образуют единую линию, которая не претерпевает параллельной диверсификации во времени, что потенциально указывает на единый резервуар болезни в экогеографической зоне, в которой зоонозные явления должны происходить часто. Мы предполагаем, что евразийский степной пояс мог быть одновременно зоной, в которой ареалы пересекаются, а также коридором мобильности, охватывающим огромные географические расстояния. Широкое географическое распространение LNBA и тот факт, что он также охватил регионы за пределами степи (например, зоны смешанных лесов с умеренным климатом в Центральной Европе, регионах Алтая и озера Байкал), говорит о том, что дикие животные и домашние животные участвовали в процессе трансмиссии *Yersinia pestis*. Фактически, современные исследования *Y. pestis* показали, что тибетские овцы могут выступать в качестве промежуточных хозяев между инфицированными сурками и людьми [23].

Формулировка гипотез о способах передачи *Y. pestis* LNBA форм является сложной. Одним из ограничений для такого вывода является отсутствие в настоящее время близких современных родственников с аналогичными генетическими характеристиками, что дает основание полагать, что эти линии уже вымерли. Кроме того, все древние геномы *Y. pestis* были получены от людей, что ограничивает наши интерпретации в отношении диапазона хозяев прошлых штаммов. Понимание того, какие виды хозяев и переносчиков были вовлечены в экологию LNBA- *Y. pestis*, становится фундаментальным для выводов о передаче этих штаммов. *Y. pestis* может инфицировать широкий спектр млекопитающих, при этом грызуны являются основным резервуаром заболевания. Однако другие виды, такие как плотоядные, домашние животные или птицы, могут потенциально распространять болезнь в другие регионы [160].

С геномной точки зрения, мы наблюдаем увеличение псевдогенизации и генетических потерь в ходе эволюции линии LNBA-, начиная примерно с 4200 лет назад. Это может быть признаком сильного давления отбора в популяции бактерий [161] или признаком адаптации к новым хозяевам [162]. Механизм блокирования блохи, используемый *Y. pestis*, требует генетической адаптации, которая позволяет ему колонизировать и блокировать переднюю кишку блохи, что приводит к увеличению частоты укусов и усилению передачи бактерии. Штаммы LNBA- не обладают необходимыми адаптациями для такого типа передачи. Однако эти штаммы все же могли передаваться блохами, хотя и неэффективно, поскольку недавно описанная "раннефазовая передача" также допускает опосредованную блохами инфекцию в отсутствие блокировки [163]. Более того, недавнее исследование показало, что ген *ymt* является необходимым для выживания в кишечнике блохи в зависимости от происхождения крови [164]. Авторы предполагают, что штаммы, лишенные *ymt*, имели более ограниченный ареал обитания, что согласуется с низким уровнем параллельной диверсификации, на что указывает сильная корреляция между генетическим и временным расстоянием у LNBA-штаммов. Переток штаммов LNBA- в других хозяев мог бы привести к эволюционному тупику, учитывая их потенциально ограниченный круг хозяев. С другой стороны, штаммы *Y. pestis*, несущие ген *ymt* (LNBA+), были бы способны создавать новые резервуары в более широком диапазоне хозяев, таким образом, будучи более конкурентоспособными, чем штаммы LNBA-. Это может быть возможным объяснением исчезновения линии LNBA-.

Другим потенциальным путем передачи является орально-фекальный путь, который является основным путем передачи предка *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis*. Сообщения о передаче *Y. pestis* этим путем существуют через употребление в пищу инфицированных животных (например, верблюдов [165, 159], коз [165], сурков [166]). Однако штаммы *Y. pestis* с LNBA, вероятно, обладали большей способностью вызывать системное заболевание, чем его предок *Y. pseudotuberculosis*, поскольку ген *pla*, участвующий в распространении бактерии в организме млекопитающего хозяина [167], уже был приобретен. Наконец, ранее было высказано предположение, что

первоначальная форма чумы была пневмонической по своей природе [168]. На сегодняшний день это самая редкая форма чумы [169, 134], но случаи заражения легочной чумой через вдыхание капель крови в процессе снятия шкур с туш зараженных чумой животных были зафиксированы [170]. Хотя все эти сценарии передачи возможны, для решения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

В целом, мы наблюдаем длительное сосуществование в Западной Евразии двух форм *Y. pestis* (полностью адаптированной к блохам и неадаптированной к блохам формы), которое, вероятно, продолжалось не менее 2500 лет. Вопрос о том, конкурировали ли эти формы в одной экологической нише, сосуществовали ли они среди одних и тех же хозяев или занимали совершенно разные ниши, требует дальнейшего изучения. Кроме того, остаются вопросы об истории распространения и полном географическом охвате адаптированной к блохам формы. Что касается неадаптированной формы, то дальнейшие древние геномы из периода LNBA, особенно те, которые были извлечены из останков животных, в сочетании с функциональными исследованиями, оценивающими их генетические характеристики, будут плодотворными направлениями будущих исследований для лучшей характеристики механизмов передачи ранних форм чумы.

Существует гипотеза, что штамм *Y. pestis*, ставший причиной второй пандемии чумы проник в Европу через юго-западную часть современной России (средне-Волжский регион, Самарская область, Россия) [86, 88, 171]. Известно, что «Черная смерть» была обусловлена распространением одного штамма чумной палочки по Западной Европе во время «Черной смерти» [21, 86, 88]. Кроме того, была охарактеризована линия *Y. pestis*, распространившаяся по Западной Евразии и ее окрестностям между XIV и XVIII веками [74-77, 163, 164] и определена связь между эпидемиями чумы XIV века и разнообразием современных штаммов *Y. pestis* [75]. Тем не менее географическое происхождение Второй пандемии чумы остается неуловимым. С генетической точки зрения это событие было связано со звездной диверсификацией четырех линий *Y. pestis*, потомки которых в настоящее время разбросаны по Евразии, Африке и Америке. Хотя современные линии *Y. pestis*, являющиеся предками этого события, сегодня идентифицированы в Центральной и Восточной Азии [90, 91, 150], прямые данные о палео-ДНК из Центрально-Евразийского пространства отсутствовали. Обращаясь к ранней истории второй пандемии чумы в Европе («Черная смерть»), нами тщательно были рассмотрены средневековые геномы *Y. pestis* из Европы и установленные по результатам данной работы древние штаммы *Y. pestis* с Бишкекских Несторианских кладбищ.

Как уже говорилось выше, полногеномные данные от 7 человек из Бишкекских Несторианских кладбищ Кара-Джигач и Бурана, имеющие косвенные свидетельства наличия эпидемии в 1338–1339 гг. (надписи на надгробиях) были тщательно исследованы на наличие ДНК *Y. pestis*, с применением разных подходов (qPCR, HOPS анализ данных метагеномного

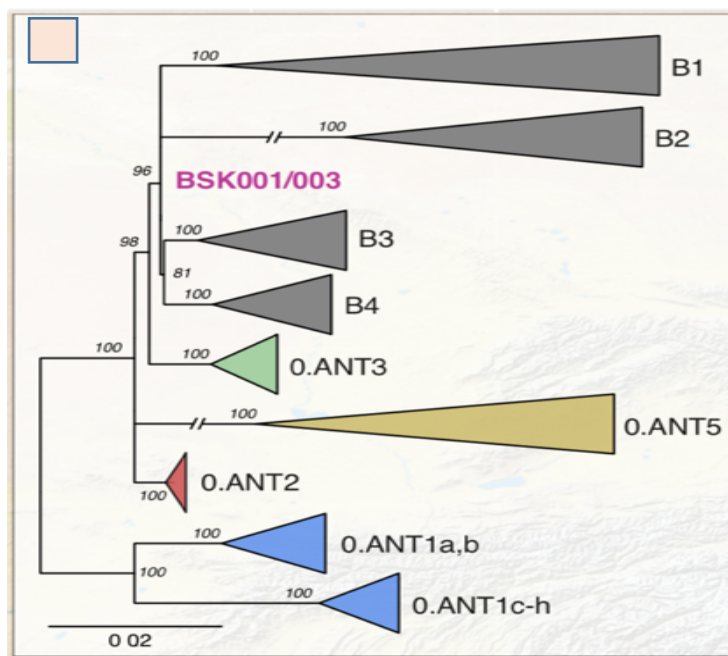
секвенирования палео-ДНК древних индивидов, гибридизационному захвату *Y. pestis*). В результате установлено, что 3 индивида (BSK001, BSK003 и BSK007) с кладбища Кара-Джигач действительно, являлись носителями древних штаммов чумной палочки. Стоит отметить, что в отличие от BSK001 и BSK003, результаты по BSK007 были не столь убедительны в виду плохой сохранности ДНК этого объекта. Поэтому этот образец мы не включили в дальнейший анализ, хотя и считаем его положительным на наличие древнего штамма *Y. pestis* в виду равномерного распределения считываний карт относительно эталонной хромосомы CO92 и наличия обусловленных временем повреждений ДНК.

От изолятов, ассоциированных с «Черной смертью», BSK001/003 штамм отличается по двум SNP [21, 86, 88]. В частности, он расположен на узле, ранее обозначенном как N0729, который предшествовал множественному ветвлению 1–4. Для уточнения являются ли BSK001 и BSK003 разными бактериальными штаммами, сравнивали их профили SNP [86], определили, что все такие варианты согласуются с остатками экзогенного загрязнения и / или повреждения аднк, предполагая, что эти два генома, вероятно, идентичны. Идентификация одного и того же штамма у обоих индивидуумов также подтверждается опубликованными данными, свидетельствующими об отсутствии разнообразия *Y. pestis* в геномах, выделенных из одного эпидемического сайта [150]. Судя по надгробиям, BSK001, BSK003 и BSK007 были захоронены в 1338-1339 н.э., что свидетельствует о причастности *Y. pestis* к возникновению «Чёрной смерти».

Мы провели сравнительный анализ SNP между геномом Кара-Джигач и ранее опубликованным историческим и циркулирующим в настоящее время разнообразием *Y. pestis*. Для этого наборы данных BSK001 и BSK003 были объединены для достижения повышенного геномного разрешения. Наш анализ выявил три уникальных SNP для BSK001/003 по сравнению с 203 современными и 47 историческими геномами *Y. pestis*: CO92 позиция - 2332255_{RefC/A}_{BSK001/003}; CO92 позиция - 3103976_{RefG/A}_{BSK001/003}; CO92 позиция - 4512914_{RefT/G}_{BSK001/003}. Два из трех идентифицированных вариантов SNP локализованы в районах с высоким числом мультиаллельных сайтов [140], а третий соответствует повреждению аднк. Эти вариации расценены нами как ложно-положительные и в дальнейшем они исключены из анализа.

Чтобы оценить, представляют ли BSK001 и BSK003 разные штаммы *Y. pestis*, мы сравнили профили их SNP. В результате чего было идентифицировано 32 SNP, различающиеся между двумя геномами, 28 из которых уникальны для BSK003 и 4 полиморфизма уникальны для BSK001. Анализ показал, что все эти варианты согласуются с остатками экзогенного загрязнения и/или повреждения палео-ДНК. Основываясь на этом и том факте, что, как правило, штаммы *Y. pestis*, выделенные из одного эпидемического контекста характеризуются отсутствием разнообразия геномов [21, 86-88, 171], мы считаем, что эти два генома, определенные у объектов BSK001 и BSK003, захороненных в течение одного эпидемического года 1338-1339, вероятно, идентичны, а различия обусловлены деградацией ДНК. Полученная нами филогения с максимальной

вероятностью помещает BSK001/003 в качестве предковой линии для опубликованных геномов *Y. pestis* из второй пандемии чумы (рисунок 24). Стоит учесть, что на рисунке 24 современные ветви свернуты для повышения четкости филогенетического дерева.



98 – филогенетический узел N07 [2, 98, 100];
96 – филогенетический узел N0729 [2, 98, 100]

Рисунок 24 – Филогенетическое дерево, построенное с помощью RaXML73, на основе 2351 позиции геномных вариантов древних штаммов *Y. pestis*, отражающее позицию BSK001/003 по отношению к O.ANT ветвям, характерным для первой пандемии чумы [172].

Филогения максимального правдоподобия поместила BSK001/003 штаммы в предковую форму для опубликованных геномов Второй пандемии чумы (рисунок 24), отделяя его одним SNP от предыдущего исследованного изолята начала пандемии из Поволжья [86], и двумя SNP от изолятов, связанных с Черной смертью, из Западной Европы [21, 86, 88]. В частности, он расположен на узле, ранее обозначенном как N0729 [86] (рисунок 24 – узел 96), который предшествовал политомии ветвей 1-4. Поскольку отсутствующие данные, которых много в древних геномных наборах данных, могут повлиять на филогенетическое размещение, мы проанализировали все SNP BSK001 и BSK003 на предмет общих позиций с линиями, происходящими из узла N07 и непосредственно предшествующими ему. Мы обнаружили, что для BSK001/003 штаммов определяется предковое состояние по всем покрытым секвенированием диагностическим SNP, определяющим ветви 1-4 и O.ANT3, а также производное состояние во всех позициях SNP, ведущих от O.ANT3 к N07

(рисунок 24). Таким образом, мы пришли к выводу, что BSK001/003 представляет собой штамм, являющийся прямым прародителем политомии ветви 1-4 (рисунок 24– В1-В4 ветви).

Политомия ветвей 1-4 считается важным событием в эволюции *Y. pestis*, учитывая ее связь с «Черной смертью» [173]. Чтобы количественно оценить долю современного генетического разнообразия *Y. pestis*, которое возникло в результате этой политомии, мы вычислили средние попарные расстояния (MPD) и индексы филогенетического разнообразия среди 203 геномов, составляющих весь наш современный набор данных, как и 130 геномов, содержащих ветви 1-4. В нашем наборе данных 64% (130/203) современных штаммов *Y. pestis* принадлежали к ветвям 1-4, что отражает высокую распространенность и географическое распространение этих линий во всем мире [90, 37]. По нашим оценкам, ветви 1-4 представляют ~ 40% от общего филогенетического разнообразия современного *Y. pestis* на основе нашего полного набора данных, и аналогично ~ 37% на основе подвыборочного набора геномов из ветвей 1–4 в равной пропорции с таковыми из ветви 0. Учитывая, что история бактерии насчитывает не менее 5000 лет [75], примечательно, что значительная часть ее сохранившегося генетического разнообразия произошла от BSK001/003 и, следовательно, возникла в течение последних 650 лет.

Гипотезы о происхождении «Черной смерти» предполагают ряд предполагаемых мест происхождения, таких как Кавказ [174], Причерноморско-Каспийский степной регион [39, 174], восточная Анатолия / северный Ирак, Центральная Азия [84, 94, 173], а также современные северный и южный Китай [90, 92]. Чтобы ответить на эти гипотезы, мы исследовали возможность местного появления по сравнению с занесением штамма BSK001/003 в долину Чу в регионе Тянь-Шаня из другого района. Для этого мы оценили географическое распределение наиболее близких к BSK001/003 линий предкового ветвления и идентифицировали 158 генотипированных изолятов из линий 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3 и 0.ANT5 с указанием местоположения их выделения [88]. Мы обнаружили, что все такие штаммы были изолированы от очагов *Y. pestis* соседних территорий, включающих современный восточный Казахстан, восточный Кыргызстан и северо-западный Китай.

Хотя мы не можем исключить другой географический диапазон для этих линий в прошлом, наши текущие данные согласуются с местным происхождением BSK001/003 в пределах расширенного региона Тянь-Шаня. Интересно, что большинство штаммов, составляющих линии 0.ANT, были выделены от сурков и их эктопаразитов, известных как основные резервуары *Y. pestis* в этих районах [175-177]. Таким образом, эти виды-резервуары могут представлять возможных кандидатов на вторичное явление, которое привело к эпидемии Кара-Джигач.

Есть предположение, что появление ветвей 1-4 произошло более чем за столетие до начала пандемии, как часть военного расширения Монгольской империи через Евразию в начале 13 века н.э. [92]. Здесь мы оспариваем эти

взгляды, предоставляя прямые доказательства в поддержку места рождения в регионе Тянь-Шаня в начале XIV века нашей эры. Хотя динамика, вызвавшая появление бактерии, в настоящее время неизвестна, предыдущие исследования показали, что факторы окружающей среды, такие как стихийные бедствия, а также внезапные изменения температуры и осадки, могут потенциально влиять на динамику *Y. pestis* и вспышки заболеваний среди людей [178-180]. Палеосейсмологические исследования установили серию землетрясений, которые произошли неподалеку от озера Иссык-Куля в XIV веке [181, 182], а подводная археология определила поселения, затопленные в западной части озера из-за сильного сейсмического события в тот же период [181]. Хотя на данный момент эти события не могут быть напрямую связаны с эпидемией Кара-Джигача, мы предполагаем, что наша дата 1338–1339 гг. н.э. будет служить точной точкой отсчета для будущих экологических, археологических и исторических исследований.

Кроме того, неизвестны точные способы, посредством которых *Y. pestis* был перемещен в регион западной Евразии в 1346 году н.э., через восемь лет после эпидемии Кара-Джигача, в первую очередь из-за большой неопределенности, связанной с историческим и экологическим контекстом этого процесса. В то время как предыдущие исследования предполагали участие как военных, так и торговых сетей в распространении болезни [28, 92, 171, 173], связанные исследования до сих пор были сосредоточены либо на военных экспедициях, которые имели место в более ранние периоды времени, такие как XIII век [92], либо имели в основном исследовали распространение чумы через торговые сети в ограниченных районах Западной Евразии [21]. Размещение поселения Кара-Джигач в непосредственной близости от трансзиатских сетей и различные клады монет, выявленные на участке, оказывают определенную поддержку сценариям, связанным с торговлей распространением *Y. pestis*. Следовательно, подробная реконструкция торговых сетей начала и середины XIV- века по всей Евразии в сочетании с дополнительными геномными доказательствами будет иметь важное значение для распутывания теорий пути распространения чумы на запад.

3.7.2 Результаты филогенетического анализа выявленных древних штаммов HBV

HBV является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире, вызывая около миллиона смертей ежегодно. Недавние исследования древней ДНК показали, что HBV заражал людей на протяжении тысячелетий, но его прошлое разнообразие и пути распространения остаются практически неизвестными. Новое исследование, проведенное большой группой исследователей со всего мира, позволяет понять эволюционную историю HBV, изучив геномы вируса у 137 древних евразийцев и коренных американцев, датированные периодом от ~10 500 до ~400 лет назад.

Результаты исследования показывают пути распространения и сдвиги в вирусном разнообразии, которые отражают известные миграции людей и демографические события, а также неожиданные закономерности и связи с современностью.

Современные штаммы HBV делятся на девять генотипов, два из которых встречаются преимущественно в популяциях коренных американцев. Исследование предоставляет убедительные доказательства того, что эти штаммы происходят от линии вируса гепатита В, которая возникла примерно в конце плейстоцена и была перенесена одними из первых жителей Америки. Исследование также показывает, что вирус присутствовал в больших частях Европы еще 10 000 лет назад, до распространения сельского хозяйства на континенте.

После неолита в Европе штаммы HBV, носителями которых были охотники-собиратели, были заменены новыми штаммами, которые, вероятно, были распространены первыми фермерами континента, что отражает большой генетический приток, связанный с расширением земледельческих групп в регионе. Эти новые вирусные линии продолжали преобладать на территории западной Евразии в течение почти 4 000 лет. Доминирование этих штаммов продолжалось до экспансии западных степняков около 5 000 лет назад, которая резко изменила генетический профиль европейцев, но, что примечательно, не была связана с распространением новых вариантов HBV. Одним из самых удивительных результатов исследования является внезапное снижение разнообразия вируса гепатита В в западной Евразии во второй половине II тысячелетия до н.э., в период крупных культурных сдвигов, включая распад крупных государственных обществ бронзового века в восточной части Средиземноморья.

Древние штаммы из западной Евразии были либо сгруппированы с современными генотипами А или D, либо образовали отдельные клады, которые соответствовали их пространственно-временному распределению: мезолитические клады 1 и 2. Расположение современных евразийских генотипов по отношению к древним линиям также оказалось неопределенным: в то время как генотипы А, В, С, D, Е и I образовали кладу, разветвляющуюся между мезолитом 1 и более поздними древними линиями при использовании полного набора данных, они оказались сестринской группой для всех древних линий, которая по отношению ко всем древним линиям, если исключить современные данные или геномы полученных от людей с признаками смешанных инфекций, и размещение этого клада не было поддержано ни в одном анализе. Более того, клада, образованная генотипами D и E, была восстановлена (рисунок 25). Чтобы оценить надежность наших результатов в отношении различных аспектов набора данных и допущений модели, мы провели серию анализов чувствительности. Во-первых, поскольку генетическая рекомбинация может мешать филогенетическим выводам, мы выполнили анализ с использованием выравнивания, в котором рекомбинантные области были сделаны из рекомбинантных геномов [54]. Во-вторых, поскольку смешанные инфекции

HBV могут привести к проблемам сборки генома, таким как реконструкция искусственных гибридов, группой был сделан анализ, исключив все древние геномы, полученные от людей, у которых были обнаружены смешанные инфекции HBV. Из включенных в данное исследование образцов, представляющих Центрально-Евразийский регион, положительными на HBV оказалось 4 образца, 2 из них относятся к раннему железному веку (AKB003 – объект тасмолинской культуры, некрополь Акбеит, Центральный Казахстан и BRE026 – объект пазырыкской культуры, некрополь Берел, Восточный Казахстан) и 2 образца железного века хунну-сяньбийской культуры с Восточного Казахстана, из некрополя Берел (BRE008 и BRE028). Опубликованные данные свидетельствуют, что еще 3 казахстанских образца более поздних периодов характеризуются древними штаммами HBV [118]. У всех древних индивидов определена принадлежность к D генотипу, к которому относятся современные инфекционные штаммы HBV.

На сегодняшний день большинство штаммов HBV в Евразии относятся к генотипам A и D [41]. Мы собрали набор современных геномов HBV, включающий в себя описанное в настоящее время разнообразие вируса, добавив ранее опубликованные древние геномы HBV [44, 49]. Наши результаты показывают, что эти генотипы распространились на запад по Европе в железные и средние века, в конечном итоге достигнув географических границ, ранее занятых другими штаммами. Оценка генетических взаимоотношений между древними и современными патогенами часто проводится путем прямого полногеномного или полногеномного сравнения SNP бактерий [118, 57, 115, 91] и вирусов [79, 120, 58] или митохондриальных геномов и данных ядерного генома из эукариотических микроорганизмов [178]. Значение для получения надежных эволюционных выводов, несмотря на то, что процесс часто является проблемой при работе с наборами данных, полученными из образцов с высокой степенью фрагментации ДНК, низким содержанием эндогенной ДНК и высоким уровнем ДНК повреждение. В этих случаях повышенная точность лучше всего достигается за счет строгих параметров отображения чтения NGS и посредством визуального контроля последовательностей, перекрывающих исследуемые SNP [183]. Кроме того, гистограммы частот аллелей SNP, используемые для оценки частоты гетерозигот у гаплоидных организмов [31], часто могут демонстрировать влияние загрязнения окружающей среды на наборы древних микробных данных [137].

На рисунке 25 представлена калиброванное по времени филогенетическое древо HBV с генотипами A и D [183]. Казахские образцы охватывали 2500-3000 лет, тогда как ранние известные формы HBV были обнаружены 10 000 лет назад [42].

Для изучения возможной миграционной истории обнаруженных патогенов в древних образцах с территории Казахстана и прилегающих территорий России и Кыргызстан мы провели популяционный анализ наших археологических материалов.

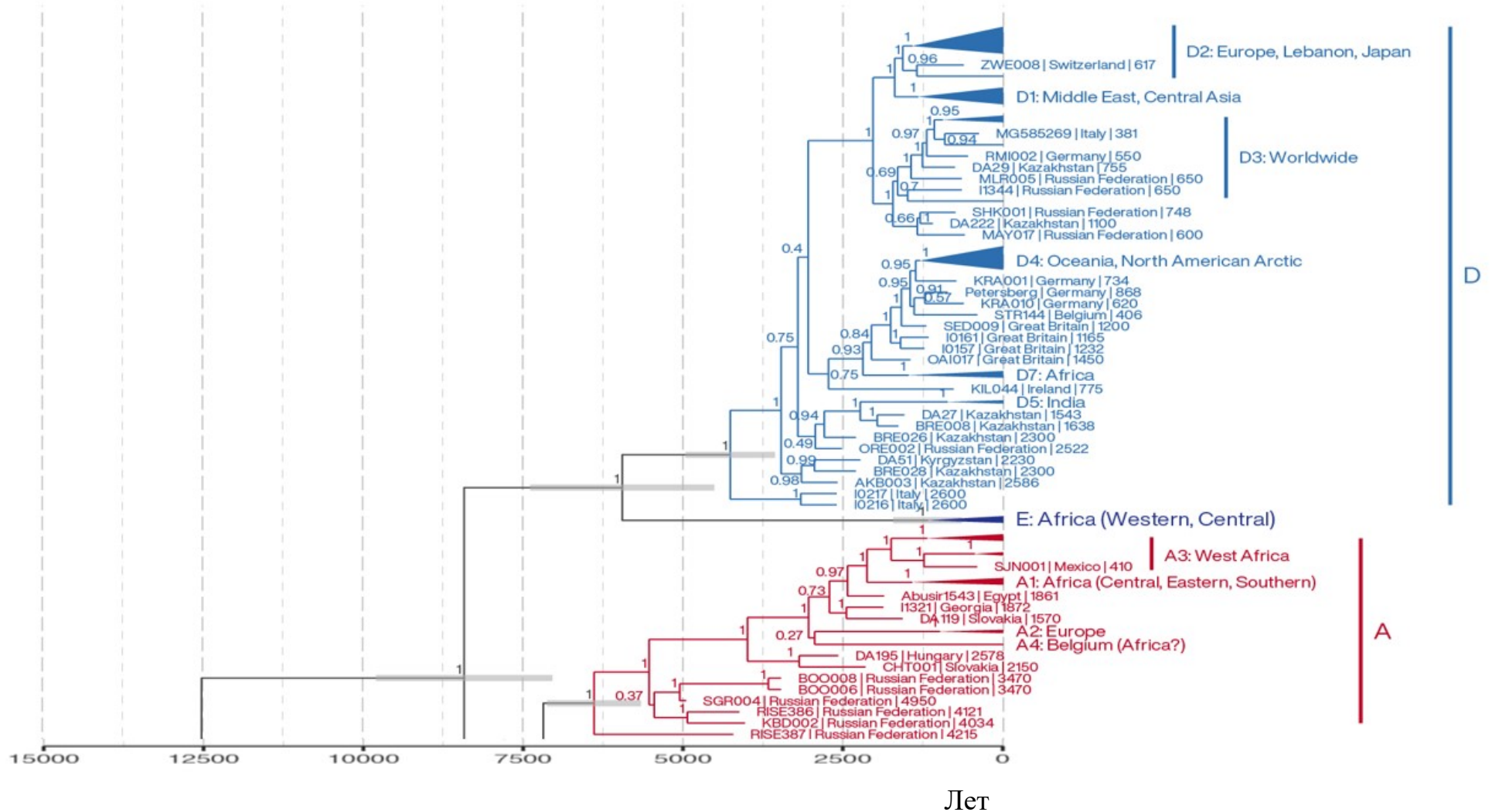


Рисунок 25 – Калиброванное по времени филогенетическое древо HBV с генотипам A и D [182]

3.8 Популяционный анализ древних людей, оцененный методом 1240К

Во многих археогенетических исследованиях основное внимание по-прежнему уделяется восстановлению больших объемов данных о последовательностях ДНК и использованию таких данных для описания взаимоотношений между популяциями. Кроме того, многие исследователи продолжают собирать геномные данные, а затем, составлять повествования, как правило, о путях и времени миграции и предполагают, что такие повествования объясняют данные [2]. Тем не менее мы полагаем, что существует необходимость в том, чтобы исследователи обратили внимание на механизмы/функции и проверили конкретные эволюционные гипотезы.

Для изучения истории миграции патогенных микроорганизмов в связи с миграциями населения по Евразийскому континенту, мы провели популяционный анализ методом захвата 1240 К.

Преимущество захвата 1240К заключается в том, что он дает доступ к общегеномным данным из древних образцов с небольшими фракциями ДНК человека и повышает эффективность за счет нацеливания на сайты в геноме человека, которые будут фактически анализироваться.

Все образцы, за исключением образцов с низким содержанием эндогенной ДНК древних индивидов, были подвергнуты популяционному анализу. ДНК было достаточным для дальнейшего исследования, для них были сделаны 1240К анализы популяций по изучению человеческой ДНК.

Анализ главных компонент, который широко используется в археогенетике популяций человека, был применен для анализа связей и миграций древних популяций, включенных в данное исследование, с древними и современными популяциями Евразии [184].

Древние индивиды с территории современного Казахстана и близлежащих территорий России и Кыргызстана характеризуются генетической неоднородностью и географической структуризацией. Образцы сакской элиты кластеризуются вместе с большинством других древних образцов с Северного, Восточного и Центрального Казахстана эпохи РЖВ (Елеке Сазы, Берел, Талды, Акбейт, Бектаута, Кара-Коба, Каракемер, Карашоки, Кызылшилик, Нуркен, Серекты, Байдаик, 37 Воинов) и опубликованными данными по сакам Центральной Евразии. Это основной генный пул Железного века, присутствующий в этом регионе, хотя есть несколько «выпадов». В общем сакском генофонде также выделяются: древняя «ирано-кавказская» (курган 9, Елеке Сазы) родословная, связанная с опубликованными данными по Тянь-Шанским сакам, «западно-евразийская» родословная (некрополь Нуркен), указывающая на типичный генофонд степи бронзового века.

Преимущественный вклад восточно-евразийских предков характеризует образцы «хунну-сяньбийской» культуры (Берел, находки 2017 г., 4 в. н.э.), и более поздние образцы из восточного и юго-восточного Казахстана (Каракаба, Каялык, 7-11 вв. н.э.).

Древнее население территории Центрально-Евразийского региона имело очень сложную демографическую историю, наполненную детерминированными

во времени многочисленными миграциями древнего населения с Востока и Запада Евразии. Полученные нами данные о генофонде представителей хунну-сяньбийской культуры с Казахской части Алтая свидетельствуют, что новый приток генов с Востока Евразии мог начаться в раннем железном веке и продолжаться по крайней мере в течение первых веков 1-го тысячелетия н.э.

В этой связи представляется интересной идея о возможности выделения промежуточного культурно-хронологического горизонта - «сяньбийского» или «сяньбийско-жужанского», между эпохами хунну и древних тюрков. Находясь в центре Евразии, горная система Алтай была перекрестком миграционных путей древних популяций человека.

Это определяет то обстоятельство, что в настоящее время Алтай является уникальной сокровищницей древнего исторического наследия человечества от каменного века до раннего средневековья, которое в эпоху сенсационных археологических находок и геномных исследований только начинает открывать тайны генетических вкладов древних популяций в современное население Евразии.

Согласно историческим данным, 1-е тысячелетие нашей эры характеризуется движением на запад восточных кочевых империй, например, таких как сяньбей-хунны.

Поскольку включенные в данный анализ, датированные разным временем, древние индивиды с некрополя Берел (таблица 4) демонстрируют разнообразие древних патогенов (рисунок 26), это может свидетельствовать об активном общении разных популяций и богатой миграционной истории горного Алтая.

Таблица 4 – Информация об отобранных образцах в результате отбора.

#	Наименование	Курган	Год раскопок	Культура	Период (¹⁴ C, 2-sigma)/век
1	2	3	4	5	6
1	Берел	курган 2	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
2	Берел	курган 9	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
3	Берел	курган 13	2005	Пазырыкская	2197±22 год; 360-175 год д.н.э.
4	Берел	курган 16	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
5	Берел	курган 32	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
6	Берел	курган 34	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
7	Берел	курган 37	2003	Пазырыкская	IV-III вв д.н.э.
8	Берел	курган 41	2012	Пазырыкская	IV-III вв д.н.э.
9	Берел	курган 42	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
10	Берел	курган 72	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
11	Берел	курган 81	2016	Пазырыкская	IV-III вв д.н.э.
12	Берел	курган 82С	2016	Пазырыкская	IV-III вв д.н.э.
13	Берел	курган 82	2016	Пазырыкская	IV-III вв д.н.э.
14	Берел 2017 67А	курган	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.

Продолжение таблицы 4

15	Берел 2017_90А	курган 90А	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
16	Берел 2013/44	курган 44.	2013	Хунну-Сяньби	2179±13 год; 354-182 год д.н.э.
17	Берел 2017_80А/80Е	курган 80А/80Е	2017	Хунну-Сяньби	IV-III вв д.н.э.
18	Берел 2017_69	курган 69	2017	Хунну-Сяньби	1728±13 год; 254-380 год н.э.
19	Берел 2018_90	курган 90	2018	Хунну-Сяньби	1720±25 год; 252-409 год н.э.
20	Берел 2018_76В	курган 76В	2018	Хунну-Сяньби	1958±22 год; 32–123 д.н.э.
21	Берел	курган 68/2	2018	Хунну-Сяньби	1821±21 год; 131-241 год н.э.
22	Берел	курган 68/1	2018	Хунну-Сяньби	1733±18 год; 248-380 год н.э.

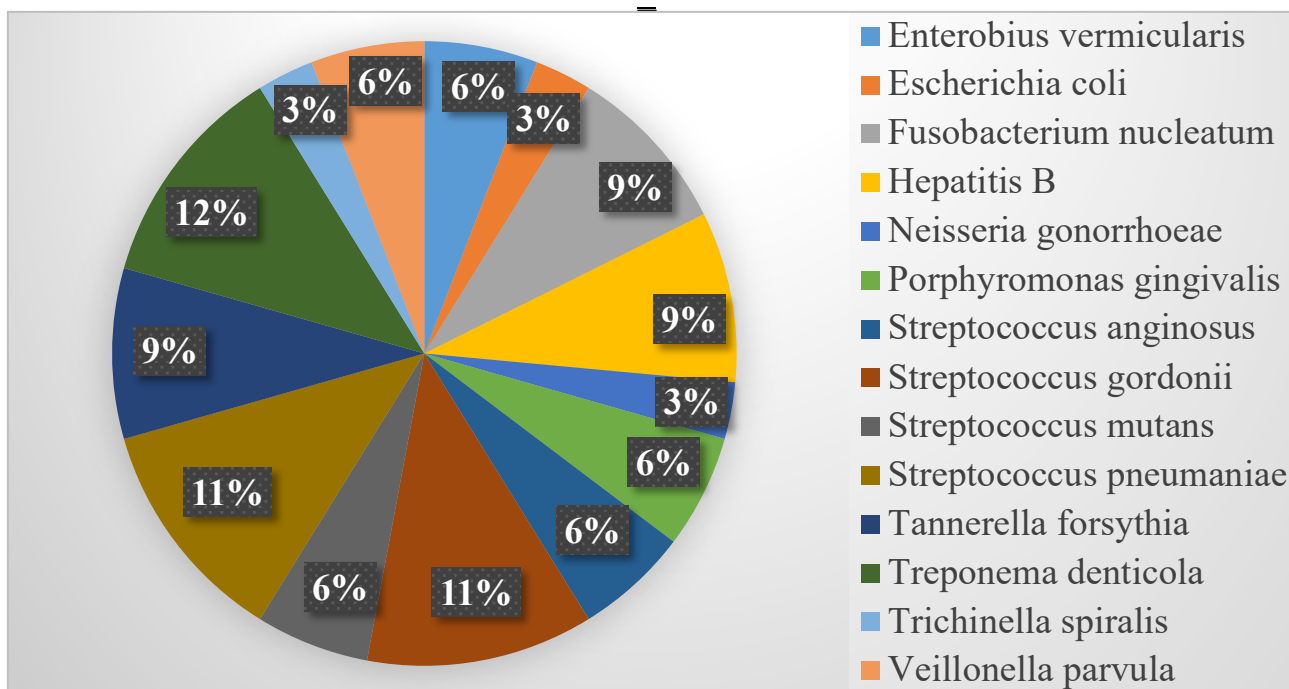


Рисунок 26– Разнообразие патогенных микроорганизмов и вирусов в костных останках человека с некрополя Берел.

Масштабные перемещения гуннских племен, приведшие к значительным изменениям этнической и политической карты Евразии, начались еще с I-II вв. н.э. Вопрос об этнической принадлежности гуннов до сих пор не ясен. Хунну представляли собой племена монголоидного облика, говорившие на одном из языков алтайской языковой семьи, ветвью которой являются тюркские языки. Этнический состав Алтая с конца I тыс. до н.э. до середины I тыс. н.э. представлял собой, с одной стороны, потомков пазырыкцев, с другой, это было

время появления на этой территории родоплеменных групп центрально-азиатского и восточного происхождения – теле и тюрков.

Стоит отметить, что древние штаммы гепатита В обнаружены у представителей разных временных периодов (ранний железный век, железный век, раннее и позднее средневековье) и культур (тасмолинская культура, пазырыкская культура, хунно-сяньбийская культуры, хунну-сарматская культура, карлукская культура) (таблица 4). Это свидетельствует о том, что распространение вируса гепатита В на территории современного Казахстана началось уже в эпоху раннего железа, в сакский период. Причем, наверняка, сакские племена из географически отдаленных регионов (Центральный и Восточный Казахстан) благодаря кочевому образу жизни могли общаться между собой и даже с европейскими группами населения. Принадлежность всех древних штаммов HBV с территории Казахстана к филогенетической группе D определяет возможность проникновения вируса гепатита В в Центрально-Евразийские степи из Европы. Тот факт, что генотип D HBV был определен у представителей разных культур от эпохи раннего железного века до эпохи средневековья определяет активную социально-экономическую деятельность кочевых народов, населявших Великую Степь, а также возможность распространения данного вируса в центре Евразии и родственность современным инфекционным штаммам гепатита В. Известно, что современные инфекционные штаммы HBV относятся к двум генотипам (А и D) [50, 58].

Комбинируя результаты генетических исследований древних патогенов с данными из других дисциплин, таких как археология, история и палеопатология, а также генетика человеческих популяций можно появилось возможность построить более полную картину взаимоотношений между людьми и опасными патогенами.

В этой связи хотим рассмотреть популяционную историю образцов в которых обнаружены древние штаммы *Y. pestis*: образец ранне-железного века KZL002 (некрополь Кызыл, Тасмолинская культура, объект датирован 2736-2457 до н.э., Центральный Казахстан) и образцы эпохи средневековья - BSK001, BSK003 и BSK007, датированные 1338-1339 гг. н.э. из несторианского кладбища Кара-Джигач (Чуйская долина, Кыргызстан). Обогащение ДНК человека дало охват > 30 000 SNP для индивидуумов KZL002, BSK001 и BSK003, что позволило определить популяционные связи этих древних индивидов. В то время как BSK007 предоставил недостаточно данных для включения в анализы по истории популяций.

Согласно анализу главных компонент на основе ядерных SNP, проведенному с учетом современных и древних популяций Евразии, образец раннего железного века из Центрального Казахстана KZL002 (тасмолинская культура, некрополь Кызыл) хотя и имеет отношение к основному генному пулу сакской элиты, однако показывает более тесную связь с опубликованными данными по Тянь-Шанским сакам («юго-западный выпад») [183]. В отношении современного населения этот образец раннего железного века демонстрирует генетическую связь с разнообразием северно-европейских популяций и не

показывает связи с современными этническими группами из Казахстана. Тем не менее предыдущие исследования показали высокий уровень генетической гетерогенности среди народов Центральной Азии в исторические периоды [167], это позволяет предположить, что наблюдаемая однородность современных групп сформировалась в течение последних 500 лет [184]. Филогенетический анализ и реконструкция древних геномов *Y. pestis* у образца KZL002 свидетельствует о генетической связи с распространенными в бронзовом веке в Европе образцами *Y. pestis*, которые эволюционно близки к условно патогенному штамму *Y. pseudotuberculosis*. Популяционная история образца KZL002 подтверждает гипотезу о связях древнего населения Европы с населением Центрально-Евразийского региона в эпоху бронзы.

РСА-анализ определил родство средневековых образцов BSK001 и BSK003 с несторианского кладбища Кара-Джигач с разнообразием среднеазиатских популяций. Прямой связи с современными этническими группами из Кыргызстана нет. Возможно это определяется тем, что однородность большинства среднеазиатских этнических групп сложилась относительно недавно, в пределах последних 500 лет. Данных по полногеномным исследованиям средне-азиатских народностей пока тоже мало. Однако есть исторические данные о связях между кара-джигачской общиной и несколькими регионами по всей Евразии, подкрепленные богатыми нумизматическими свидетельствами, обнаруженными на этом участке [89, 90]. Возможно, более детальные анализы населения Чуйской долины Кыргызстана смогут показать, являются ли идентифицированные здесь генетические профили BSK001 и BSK003 частью местного генофонда начала XIV века. Реконструкции штаммов *Y. pestis* и проведенный филогенетический анализ показал, что обнаруженные у индивидов из кладбища Кара-Джигач древние штаммы являются генетическими предшественниками штамма, вызывавшего вторую пандемию чумы в Европе, так называемую «Черную смерть». Возможно, широкие социально-экономические связи средневекового населения Центрально-Евразийского региона способствовали появлению массовой эпидемии чумы в Европе.

Таким образом, проведенные нами сопоставления филогении наиболее значимых патогенов, таких как HBV и *Yersinia pestis*, с популяционной историей древних индивидов, эндогенных носителей патогенов, в принципе согласуются. Обобщая генетические данные по эволюции патогенных организмов с данными популяционной генетики и историей миграций человеческих популяций, археологическими и историческими сведениями можно получить ценные сведения о социально-экономической жизни древнего населения и воссоздать полную картину взаимоотношений между людьми и опасными патогенами. Это поможет определить потенциальные очаги возникновения опасных инфекций и предотвращать пути их распространения в человеческих популяциях.

Сопоставления филогении наиболее значимых патогенов, таких как HBV и *Yersinia pestis*, с популяционной историей древних индивидов-носителей патогенов согласуется с историей связанных человеческих сообществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многовековая общая история между людьми и инфекционными заболеваниями ставит изучение древних патогенов в круг интересов нескольких дисциплин, таких как микробиология, вирусология, эволюционная биология, генетика, история и антропология. Междисциплинарные исследования направлены на то, чтобы лучше понять взаимодействие между патогенами и их хозяевами в эволюционном масштабе, раскрыть происхождение патогенов, определить генетические процессы, связанные с их появлением и распространением среди людей, прояснить вопросы эволюции современных патогенных штаммов микроорганизмов и вирусов, конкретизировать связи между миграционной историей патогенов и человеческих популяций.

Диссертационная работа посвящена анализу древних патогенных организмов в костном материале людей, представляющих археологические находки с территории Центрально-Евразийской степи. В работе представлены данные по сбору археологических материалов с территории современного Казахстана, России и Кыргызстана, данные по выделению и анализу палео-ДНК, определению в них наличия ДНК древних патогенных организмов, филогении и реконструкции геномов наиболее значимых древних патогенов, таких как вирус гепатита В и *Yersinia pestis*.

Для создания репрезентативной выборки исследования был собран большой массив археологических артефактов (костные фрагменты древних индивидов), дающих представление о ранних периодах истории заселения и развития Центрально-Евразийского региона (территория современного Казахстана и близлежащих районов России и Кыргызстана). Проведен комплекс работ, включающий изучение исторических и археологических данных, формирование коллекции материалов для палеогенетического анализа. Таким образом, создана коллекция костных останков и палео-ДНК, представляющая 360 древних индивидов (333 зуба и 27 костных фрагментов) из 110 некрополей, датированных от VII века до н.э. по XIV век н.э. с территории современного Казахстана (81 сайт, 205 древних индивидов), Кыргызстана (22 сайта, 120 древних индивидов) и России (7 сайтов, 35 древних индивидов).

Получено 360 качественных образцов палео-ДНК и созданы соответствующие библиотеки для полногеномного секвенирования. 95,18% библиотек характеризуются концентрациями палео-ДНК в пределах 6,23-19,9 нг/мкл, 4,82% имеют низкие концентрации палео-ДНК (до 5,63 нг/мкл). Самое высокое содержание эндогенной ДНК было у образца CPA002 (61,106%) из некрополя Каспан (находка сакского периода, Казахстан, Алматинская область, Кербулакский район). Образцы KZL001 (42,894%) и KZL004 (44,734%) из некрополя Кызыл (находка тасмолинской культуры, Казахстан, Карагандинская область, Актогайский район) также характеризовались высоким содержанием эндогенной палео-ДНК. Данные полногеномного секвенирования образцов палео-ДНК интегрированы в мировую базу данных PANDORA (Макс Планк Институт эволюционной антропологии, Лейпциг, Германия). Они доступны для

анализа древних патогенных организмов и ДНК древних людей.

Скрининг на патогенные организмы выявил наличие 36 древних штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов в изученных палео-ДНК. Самыми распространенными патогенами древнего мира эпохи бронзы и железного века были микроорганизмы, вызывающие кариес, заболевания десен и других мягких тканей ротовой полости (*Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Tannerella forsythia*, *Veillonella parvula* и др.). Передаваемые животными паразитарные и инфекционные заболевания, такие как гельминтоз, сальмонеллез, брюшной тиф отмечены у отдельных индивидов, представляющих разные некрополи. Частыми были случаи венерических заболеваний. Такие опасные заболевания, как гепатит В (HBV), чума (*Yersinia pestis*), сальмонеллез (*Salmonella enterica*) отмечены только у единичных индивидов.

Наиболее часто встречаемым патогеном Центрально-Евразийского региона в период от эпохи бронзы до средневековья является *Tannerella forsythia* (27%). Такие патогенные микроорганизмы, как *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Trichinella spiralis*, *Streptococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Hepatitis B*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium chauvoei* и *Borrelia recurrentis* в общей исследованной выборке характеризуются частотой встречаемости до 1%.

Эндогенное наличие множественных патогенов установлено для 111 образцов. Наибольшее количество патогенов обнаружено в образцах из Кенкольского захоронения (сакско-массагетская культура, эпоха бронзы и раннего железа, Таласская долина, Кыргызстан), Айгырлы (сарматская культура, VI-V век до н.э. - II-IV век н.э., Мангышлак, Казахстан), Берел (IV-III до н.э., Горный Алтай, Казахстан), Карашоки (Тасмолинская культура, IX-VI век до н.э., Карагандинская область, Казахстан), Самсы (раннее средневековье, Алматинская область, Казахстан). Так, например, причиной смерти одного древнего индивида с некрополя Кенколь (KNL027) мог быть широкий спектр воспалительных заболеваний, ботулизм или менингит, поскольку у него найдено 27 древних патогенов.

Наличие древних штаммов гепатита В установлено для 3 индивидов пазырыкской и хунно-ксяньбийской культур (BRE008, BRE026, BRE028) из некрополя Берел (Казахстан, Восточно-Казахстанская область) и 1 образце тасмолинской культуры (AKB003) из некрополя Акбеит (Казахстан, Карагандинская область). Филогенетический анализ с учетом всех известных на сегодняшний день данных по идентифицированным у древних людей (137 объектов) штаммам HBV, датированных периодом от ~10 500 до ~400 лет назад показал, что казахстанские древние штаммы HBV характеризуются генотипом D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современным штаммам HBV (A и D генотипы).

Наличие древних штаммов *Yersinia pestis* установлено для одного древнего индивида раннего железного века (KZL002) из некрополя Кызыл (тасмолинская культура, Казахстан, Карагандинская область) и 3 средневековых индивидов

(BSK001, BSK003, BSK007) из несторианского кладбища Кара-Джигач и Бурана (Кыргызстан, Чуйская область). Реконструкция древних геномов *Y. pestis* и филогенетический анализ показали, что штамм *Y. pestis* из некрополя Кызыл имеет генетическое родство с распространенными в бронзовом веке в Европе образцами *Y. pestis* (LNBA), для которых подтверждено присутствие предкового, менее инфекционного варианта *pla* гена. Установлено, что некоторые древние линии, в том числе образец из некрополя Кызыл, в результате протяженных делеций лишены генов, ответственных за вирулентность (ген адгезии *yapC*), уклонение от иммунной системы хозяина (гены флагеллинов *flgB* и *fliZ*) и эффективную трансмиссию чумной палочки от блох (гены *ymt* и *YPM1*). При этом наиболее обширная делеция (~83 kb), включающая потерю генов системы секреции типа VI (T6SS), в частности T6SS-G, характеризует штамм *Y. pestis* из некрополя Кызыл, что связано с ослаблением его вирулентности.

Таким образом, распространение и эволюция *Yersinia pestis* в Центральной Евразии и Европе осуществлялось параллельными путями. Широкое географическое распространение линий LNBA- и тот факт, что *Yersinia pestis* также достигла регионов за пределами степи (например, зоны смешанных лесов умеренного пояса в Центральной Европе, Алтай и Байкал), говорит об усиленной мобильности среди диких животных и/или людей с их домашними питомцами.

Другим важным открытием стало то, что средневековые штаммы *Yersinia pestis* из несторианских кладбищ Кара-Джигач и Бурана (Кыргызстан) являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы («Черная смерть») в Европе. Филогения определяет эти штаммы, как предковую форму для опубликованных геномов Второй пандемии чумы, отделяя его одним SNP от изолята начала пандемии из Поволжья, и двумя SNP от изолятов, связанных с «Черной смертью» из Западной Европы.

РСА-анализ древних популяций человека, у представителей которых определено носительство множественных и значимых патогенов, позволяет отметить богатство детерминированных во времени миграций древнего населения с Востока и Запада в Центрально-Евразийский регион и социально-экономических связей, при этом особое значение имеет система Горного Алтая как перекрестка миграционных путей. Сопоставления филогении наиболее значимых патогенов, таких как HBV и *Yersinia pestis*, с популяционной историей древних индивидов-носителей патогенов согласуется с историей связанных человеческих сообществ.

Данные полногеномного секвенирования образцов палео-ДНК интегрированы в мировые базы данных. В общем доступе опубликованные данные по 73 древним индивидам бронзового и железного века, охарактеризованным в отношении истории популяций, 4 древним индивидам, охарактеризованным в отношении гепатита В; 1 индивида –носителя штамма *Yersinia pestis*. Данные полногеномного секвенирования 281 образца введены в базу PANDORA (Институт эволюционной антропологии сообщества Макса Планка, Лейпциг, Германия).

Выводы:

1. Для анализа древних патогенов и геномов насельников Центрально-Евразийского региона создана коллекция костных останков и палео-ДНК, представляющая 360 древних индивидов (333 зуба и 27 костных фрагментов) из 110 некрополей, датированных от VII века до н.э. по XIV век н.э. с территории современного Казахстана (81 сайт, 205 древних индивидов), Кыргызстана (22 сайта, 120 древних индивидов) и России (7 сайтов, 35 древних индивидов).

2. Скрининг на патогенные организмы выявил наличие 36 древних штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов в изученных палео-ДНК. Самыми распространенными патогенами древнего мира эпохи бронзы и железного века были микроорганизмы, вызывающие кариес, заболевания десен и других мягких тканей ротовой полости (*Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Tannerella forsythia*, *Veillonella parvula* и др.). Передаваемые животными паразитарные заболевания, такие как гельминтоз, сальмонеллез, брюшной тиф отмечены у отдельных индивидов, представляющих разные некрополи. Частыми были случаи венерических заболеваний. Такие опасные заболевания, как гепатит В (HBV), чума (*Yersinia pestis*), сальмонеллез (*Salmonella enterica*) отмечены только у единичных индивидов.

3. Филогенетический анализ с учетом всех известных на сегодняшний день данных по идентифицированным у древних людей (137 объектов) штаммам HBV, датированных периодом от ~10 500 до ~400 лет назад показал, что древние штаммы вируса гепатита В с территории Казахстана (3 индивида пазырыкской и хунно-ксяньбийской культур из некрополя Берел и 1 образец тасмолинской культуры из некрополя Акбеит) характеризуются генотипом D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современным штаммам HBV (A и D генотипы).

4. Штамм *Yersinia pestis* раннежелезного века из некрополя Кызыл кластеризуется с другими образцами LNBA, для которых подтверждено присутствие предкового, менее инфекционного варианта *pla* гена. Некоторые древние линии, в том числе образец из некрополя Кызыл, в результате протяженных делеций и псевдогенизации лишены генов, ответственных за вирулентность (ген адгезии *yarC*), уклонение от иммунной системы хозяина (гены флагеллинов *flgB* и *fliZ*) и эффективную трансмиссию чумной палочки от блох (гены *ymt* и *YPM1*). При этом наиболее обширная делеция (~83 kb), включающая потерю генов системы секреции типа VI (T6SS), в частности T6SS-G, характеризует штамм *Y. pestis* из некрополя Кызыл, что связано с ослаблением его вирулентности.

5. Средневековые штаммы *Yersinia pestis* из несторианских кладбищ Кыргызстана (BSK001 и BSK003) являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы («Черная смерть») в Европе. Филогения определяет эти штаммы, как предковую форму для опубликованных геномов Второй пандемии чумы, отделяя их одним SNP от изолята начала пандемии из Поволжья, и двумя SNP от изолятов, связанных с «Черной смертью» из Западной Европы.

6. Анализ древних популяций человека, у представителей которых определено носительство множественных и значимых патогенов, позволяет отметить богатство детерминированных во времени миграций древнего населения с Востока и Запада в Центрально-Евразийский регион и социально-экономических связей. При этом особое значение имеет система Горного Алтая как перекрестка миграционных путей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sokal R.R. Archaeogenetics: DNA and the Population Prehistory of Europe // *American Journal of Human Genetics*. -2001. -Vol. 69 (1). -P. 243–244.
2. Salo W.L., Aufderheide A.C., Buikstra J., Holcomb T.A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1994. -Vol.91. -P. 2091-2094.
3. Green R.E., Krause J., Ptak S. E., Briggs A. W., Ronan M.T., Simons J. F., Du L., Egholm M., Rothberg J.M., Paunovic M., Pääbo S. Analysis of One Million Base Pairs of Neanderthal DNA // *Nature*. -2006. -Vol.7117. -P. 330–336.
4. Allentoft M.E., Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C.L., Hale M.L., Campos P.F., Samaniego J.A., Gilbert M.T., Willerslev E. et al. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils // *Proc. Biol. Sci.* – 2012/ - Vol. 279. – P. 4724–4733.
5. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* -1989. -Vol.86. -P.1939-1943.
6. Richards M., Cort Bergeron B. *Bioinformatics Computing* Upper Saddle River // NJ: Prentice Hall. -2003.-Vol. 59. -P.185–203.
7. Underhill P.A., Shen P., Lin A.A., Jin L., Passarino G., Yang W.H., Kauffman E., Bonn -Tamir B., Bertranpetit J., Francalacci P., Ibrahim M., Jenkins T., Kidd J.R., Mehdi S.Q., Seielstad M.T., Wells R.S., Piazza A., Davis R.W., Feldman M.W., Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J. Y chromosome sequence variation and the history of human populations // *Nat Genet.* -2000. -Vol.26 Is.3. -P.358-361.
8. Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Despr s V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M. Genetic analyses from ancient DNA // *Annu. Rev. Genet.*, - 2004. -Vol. 38. -P. 645-679.
9. Shapiro B., Rambaut A., Thomas M., Gilbert P. No proof that typhoid caused the Plague of Athens (a reply to Papagrigrorakis *et al.*) // *Int. J. Infect. Dis.*, -2006. -Vol.10. -P.334-335.
10. Drancourt M., Raoult D. Molecular detection of *Yersinia pestis* in dental pulp // *Microbiology*. -2004. -Vol. 150. -P.263-264.
11. Meyer M., Fu Q., Aximu-Petri A., Glocke I., Nickel B., Arsuaga J.L., Martinez I., Gracia A., de Castro J.M., Carbonell E., Pääbo S. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos // *Nature*. -2014 -Vol.505. -P.403–406.
12. Noonan J.P., Hofreiter M., Smith D., Priest J.R., Rohland N., Rabeder G., Krause J., Detter J.C., Pääbo S., Rubin E.M. Genomic sequencing of Pleistocene cave bears // *Science*. -2005. -Vol.309. -P.597–599.
13. Prüfer K., Stenzel U., Hofreiter M., Pääbo S., Kelso J., Green R.E. Computational challenges in the analysis of ancient DNA // *Genome Biol.* -2010. -Vol.11. R47.
14. Krause J., Briggs A.W., Kircher M., Marićić T., Zwyns N., Derevianko A., Pääbo S. A complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia // *Curr Biol*. -2010. -Vol.20. -P.231–236.

15. Malmstrom H., Stora J., Dalen L., Holmlund G., Gotherstrom A. Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth // *Mol Biol Evol.* -2005. -Vol.22. -P.2040–2047.
16. Green R.E., Krause J., Briggs A.W., Maricic T., Stenzel U., Kircher M., Patterson N., Li H., Zhai W., His M. Fritz Y., Hansen N.F., Durand E.Y., Sapfo A.M., Jensen J.D., Marques-Bonet T., Alkan C., Prüfer K., Meyer M., Burbano H.A., Jeffrey M.G., Schultz R., Aximu-Petri A., Butthof A., Höber B., Höffner B., Siegemund M., Weihmann A., Nusbaum C, Lander E.S., Russ C., Novod N., Affourtit J., Egholm M., Verna C., Rudan P., Brajkovic D., Kucan Z., Gušić I., Doronichev V.B., Golovanova L.V., Lalueza-Fox C., De La Rasilla M., Fortea J, Rosas A., Schmitz R.W., Philip L.F. Johnson, Eichler E.E., Falush D., Birney E., Mullikin J.C., Slatkin M., Nielsen R., Kelso J., Lachmann M., Reich D., Pääbo S. A draft sequence of the Neandertal genome *Science.* -2010. -Vol.328. -P. 710-722.
17. Meyer M., Kircher M., Gansauge M.-T., Li H., Racimo F., Mallick S., Schraiber J.G., Jay F., Prüfer K., de Filippo C., Sudmant P.H., Alkan C., Fu Q., Do R., Rohland N., Tandon A., Siebauer M., Green R.E., Bryc K., Briggs A.W., Stenzel U., Dabney J., Shendure J., Kitzman J., Hammer M. F., Shunkov M.V., Derevianko A.P., Patterson N., Andrés A.M., Eichler E.E., Slatkin M., Reich D., Kelso J., Pääbo S. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual // *Science.* -2012. - Vol. 338. -P. 222-226.
18. Lazaridis I., Patterson N., Mittnik A., Renaud G., Mallick S., Kirsanow K., Sudmant P. H., et al. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans // *Nature.* -2014. -Vol. 513. Is.7518. -P. 409-413.
19. Craig D. Millar, David M. Lambert Archaeogenetics and human evolution: the ontogeny of a biological discipline // *World Archaeology.* -2014. -Vol. 51. Is.4. - P. 546-559.
20. Pardoe C. The Eye of the Storm: The Study of Aboriginal Human Remains in Australia // *Journal of Indigenous Studies.* -1991. -Vol. 2. -P.16–23.
21. Bos K., Schuenemann V., Golding G. et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death // *Nature.* -2011. -Vol. 478, -P. 506–510.
22. Bos K., Harkins K., Herbig A. et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis // *Nature.* -2014. -Vol. 514. - P. 494–497.
23. Rasmussen S., Allentoft M.E., Nielsen K., Orlando L., Sikora M., Sjögren K.G., Pedersen A.G., Schubert M., Dam A.V., Kapel C.M.O., Nielsen H.B., Brunak S., Avetisyan P., Epimakhov A., Khalyapin M.V., Gnuni A., Kriiska A., Lasak I., Metspalu M., Moiseyev V., Gromov A., Pokutta D., Saag L., Varul L., Yepiskoposyan L., Sicheritz-Pontén T., Foley R.A., Lahr M.M., Nielsen R., Kristiansen K., Willerslev E. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago // *Cell* -2015. - Vol.163. -P. 571-582.
24. Herbig A., Maixner F., Bos K.I., Zink A., Krause J., Huson D. MALT: fast alignment and analysis of metagenomic DNA sequence data applied to the Tyrolean Iceman // *bioRxiv.* -2016. -10.1101/050559

25. Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O. A., and Wilson A.C. DNA Sequences from the Quagga, an Extinct Member of the Horse Family // *Nature*. - 1984. -Vol.312. -P.282–284.
26. Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., and Arnheim N. Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia // *Science*. -1985. -Vol. 230. Is 4732. - P.1350–1354.
27. Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T. M., Schultz J., Mileski W., Davey M., Leamon J. H. An Integrated Semiconductor Device Enabling Non-optical Genome Sequencing // *Nature*. -2011. -Vol.475. -P. 348–352.
28. Hübner R., Key F.M., Warinner C. *et al.* HOPS: automated detection and authentication of pathogen DNA in archaeological remains // *Genome Biol*. -2019. - Vol. 20. -P.280.
29. Spyrou M.A., Bos K.I., Herbig A. *et al.* Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research // *Nature Rev Genet*.- 2019. -Vol.20. -P. 323–340.
30. Keller A.A., Graefen M., Ball M., Matzas M. *et al.* New insights into the Tyrolean Iceman’s origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing // *Nature communications*. -2012. -Vol.3. – P. 698.
31. Briggs A. W., Stenzel U., Meyer M., Krause J., Kircher M., Pääbo S., Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA // *Nucleic Acids Res*. -2010. -Vol.38. e87
32. Orlando L., Ginolhac A., Zhang G., Froese D., Albrechtsen A., Stiller M., Schubert M., Cappellini E., Petersen B., Moltke I., *et al.* Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse // *Nature*. – 2013. - Vol.499. -P.74–78.
33. Meyer M., Kircher M. Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing // *Cold Spring Harb. Protoc*. -2010, pdb.prot5448.
34. Allentoft M.E., Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C.L., Hale M.L., Campos P.F., Samaniego J.A., Gilbert M.T., Willerslev E., *et al.* The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils // *Proc Biol Sci*. – 2012. -Vol.279. - P.4724–4733.
35. Peyrégne S., Peter B.M. Authenti CT: a model of ancient DNA damage to estimate the proportion of present-day DNA contamination // *Genome Biol*. -2020. - Vol. 21. -P.246.
36. Dabney J., Meyer M., Pääbo S. Ancient DNA damage // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. -2013. -Vol.5. Is.7 a012567.
37. Morelli G., Song Y., Mazzoni C. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity // *Nat Genet*. -2010. -Vol. 42. -P.1140–1143.
38. Roberts C. A., Buikstra J. E. *The Bioarchaeology of Tuberculosis: a Global Perspective on a Re-Emerging Disease* // Univ. Press of Florida. – 2003.
39. Benedictow O. J. *The Black Death 1346-1353: The Complete History* // Boydell and Brewer, Woodbridge UK, and Rochester N.Y., 2004

40. Ortner D. J. in *Advances in Human Palaeopathology*(eds Pinhasi, R. & Mays, S.) // John Wiley & Sons. – 2008. -P.189–214.
41. Cunha C. B., Cunha B. A. in *Paleomicrobiology: Past Human Infections* (eds Raoult, D., Drancourt M.) // Springer. – 2008. -P. 1–20.
42. Barrett R., Kuzawa C. W., McDade T., Armelagos G. J. Emerging and re-emerging infectious diseases: the third epidemiologic transition // *Annu. Rev. Anthropol.* -1998. -Vol. 27. -P. 247–271.
43. Nerlich A.G., Haas C.J., Zink A., Szeimies U., Hagedorn H.G. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy // *The Lancet.* -1997. -Vol.350. Is 9088.
44. Marciniak S., Poinar H.N. Ancient Pathogens Through Human History: A Paleogenomic Perspective // In: Lindqvist C., Rajora O. (eds) *Paleogenomics. Population Genomics.* Springer. -2018. -P. 115-138.
45. Key F.M, Posth C., Esquivel-Gomez L.R., Hübner R., Spyrou M.A., Neumann G.U., Furtwängler A., Sabin S., Burri M., Wissgott A., Lankapalli A.K., Vågane Å.J., Meyer M., Nagel S., Tikhbatova R., Khokhlov A., Chizhevsky A., Hansen S., Belinsky A.B., Kalmykov A., Kantorovich A.R., Maslov V.E., Stockhammer P.W., Vai S., Zavattaro M., Riga A., Caramelli D., Skeates R., Beckett J., Gradoli M.G., Steuri N., Hafner A., Ramstein M., Siebke I., Lössch S., Erdal Y.S., Alikhan N.F., Zhou Z., Achtman M., Bos K., Reinhold S., Haak W., Kühnert D., Herbig A., Krause J. Emergence of human-adapted *Salmonella enterica* is linked to the Neolithization process // *Nat Ecol Evol.* – 2020. -Vol. 4(3). -P.324-333.
46. Mays S., Taylor G.M, Legge A.J, Young D.B, Turner-Walker G. Paleopathological and biomolecular study of tuberculosis in a medieval skeletal collection from England // *Am J Phys Anthropol.* -2001. -Vol. 114. Is.4. - P.298-311.
47. Spyrou M.A., Tikhbatova R.I., Wang C., Valtueña A.A., Lankapalli A.K., Kondrashin V.V., Tsybin V.A., Khokhlov A., Kühnert D., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Analysis of 3800-year-old *Yersinia pestis* genomes suggests Bronze Age origin for bubonic plague // *Nat Commun.* -2018. -Vol. 9. -P. 2234 -2244.
48. Keller C.B., Husson J.M., Mitchell R.N., Bottke W.F., Gernon T.M., Boehnke P., Bell E.A., Swanson-Hysell N.L., Peters S.E. Neoproterozoic glacial origin of the Great Unconformity // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* -2019. -Vol.116. Is.4. -P. 1136-1145.
49. Schuenemann V.J, Avanzi C., Krause-Kyora B., Seitz A., Herbig A., Inskip S., et al. Ancient genomes reveal a high diversity of *Mycobacterium leprae* in medieval Europe // *PLoS Pathog.* -2018. -Vol. 14. Is.5. e1006997
50. Ben Krause-Kyora et al. Neolithic and Medieval virus genomes reveal complex evolution of Hepatitis B. // *eLife.* - 2018. -Vol.7. e36666
51. Margaryan A., Hansen H.B., Rasmussen S., Sikora M., Moiseyev V., Khoklov A., Epimakhov A., Yepiskoposyan L., Kriiska A., Varul L., Saag L., Lynnerup N., Willerslev E., Allentoft M.E. Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones // *Ecol. Evol.* -2018. -Vol.8. Is.6. -P. 3534–3542.
52. World Health Organization, World Health Organization & Global Hepatitis Programme // *Global hepatitis report.* - 2017.

53. He B., Fan Q., Yang F., Hu T., Qiu W., Feng Y., Li Z., Li Y., Zhang F., Guo H., Zou X., Tu C. Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar // *Emerg Infect Dis.* – 2013. -Vol. 19. Is.4. -P.638-640.
54. Castelhana N., Araujo N.M., Arenas M. Heterogeneous recombination among Hepatitis B virus genotypes // *Infect Genet Evol.* -2017. -Vol. 54. -P.486-490.
55. Simmonds P., Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes // *Virology*. -2005. -Vol.79. Is.24. -P.15467-15476.
56. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes // *World J Gastroenterol.* – 2007. -Vol.13. Is.1. -P.14-21.
57. Souza B.F., Drexler J.F., Lima R.S., Rosário M.de O., Netto E.M. Theories about evolutionary origins of human hepatitis B virus in primates and humans // *Braz J Infect Dis.* – 2014. -Vol.18. Is.5. -P.535-543
58. Zhou Y., Holmes E.C. Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus // *Mol Evol.* – 2007. -Vol. 65. Is.2. -P.197-205.
59. Bouckaert R., Alvarado-Mora M.V., Pinho J.R. Evolutionary rates and HBV: issues of rate estimation with Bayesian molecular methods // *Antivir Ther.* – 2013. -Vol.18. Is.3. -P.497-503.
60. Kahila Bar-Gal G., Kim M.J., Klein A., Shin D.H., Oh C.S., Kim J.W., Kim T.H., Kim S.B., Grant P.R., Pappo O., Spigelman M., Shouval D. Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a Korean mummy // *Hepatology.* -2012. -Vol. 56. Is.5. -P.1671-1680.
61. Patterson Ross Z., Klunk J., Fornaciari G., Giuffra V., Duchêne S., Duggan A.T., Poinar D., Douglas M.W., Eden J.S., Holmes E.C., Poinar H.N. The paradox of HBV evolution as revealed from a 16th century mummy // *PLoS Pathog.* -2018. -Vol.14. Is.1. e1006750
62. Zoulim F., Saputelli J., Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo // *Virology.* -1994. -Vol. 68. Is.3. -P.2026-2030.
63. Lavanchy D., Kane M. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection. in *Hepatitis B Virus in Human Diseases* (eds. Liaw, Y.-F. & Zoulim, F.) // Springer International Publishing. -2016. -P.187–203.
64. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* -1999. -Vol. 96. -P. 14043–14048.
65. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M., Georgescu A.M., Vergez L.M., Land M.L., Motin V.L., Brubaker R.R., Fowler J., Hinnebusch J., Marceau M., Medigue C., Simonet M., Chenal-Francisque V., Souza B., Dacheux D., Elliott J.M., Derbise A., Hauser L.J., Garcia E. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2004. -Vol.101. Is 38. -P.13826-13831.
66. Zimble D. L., Schroeder J. A., Eddy J. L., Latham W. W. Early emergence of *Yersinia pestis* as a severe respiratory pathogen // *Nat. Commun.* -2015. -Vol.6. -P.7487.

67. Hinnebusch J., Cherepanov P., Du Y., Rudolph A., Dixon J.D., Schwan T., Forsberg A. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice // *Int J Med Microbiol.* -2000. -Vol. 290. Is.45. -P.483-487.
68. Hinnebusch B. J, Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector // *Science.* -2002. -Vol.296. Is.5568. -P. 733-745.
69. Sun Y. C., Jarrett C. O., Bosio C. F., Hinnebusch B. J. Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis* // *Cell Host Microbe.* -2014. -Vol. 15. -P. 578–586.
70. Littlejohn M., Locarnini, S., Yuen L. Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* -2016. -Vol.6. a021360.
71. Wagner D.M, Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsall D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541-543 AD: a genomic analysis // *Lancet Infect Dis.* -2014. -Vol.14. Is.4. -P.319-326.
72. Aikimbajev A, Meka-Mechenko T, Temiralieva G, Bekenov J, Sagiye Z, Kaljan K, Mukhambetova AK. Plague in Kazakhstan at the present time. *Przegl Epidemiol.* 2003;57(4):593-8. PMID: 15029833.
73. Schmid B.V., Jesse M., Wilschut L.I., Viljugrein H., Heesterbeek J.A. Local persistence and extinction of plague in a metapopulation of great gerbil burrows, Kazakhstan // *Epidemics.* -2012. -Vol.4. Is.4. -P. 211-218.
74. Perry R. D., Fetherston J. D. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague // *Clin. Microbiol. Rev.* -1997. -Vol.10. -P. 35–66.
75. N. Rascovan et al., Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic decline. *Cell* 176, 295–305.e10 (2019)
76. N. C. Stenseth et al., Plague dynamics are driven by climate variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13110–13115 (2006).
77. K. L. Gage, M. Y. Kosoy, Natural history of plague: Perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 505–528 (2005).
78. A. Andrades Valtueña et al., The stone age plague and its persistence in Eurasia. *Curr. Biol.* 27, 3683–3691.e8 (2017)
79. Anisimov A.P, Lindler L.E, Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* // *Clin Microbiol Rev.* -2004. -Vol.17. Is.2. -P.434-464.
80. Davis S., Begon M., Bruyn L., Ageyev V.S., Klassovskiy N.I., Pole S.B., Viljugrein H., Stenseth N.C., Leirs H. Predictive thresholds for plague in Kazakhstan // *Science.* – 2004. -P. 736-738.
81. Arbaji A., Kharabsheh S., Al-Azab S., Al-Kayed M., Amr Z.S., Abu Baker M., Chu M.C. A 12-case outbreak of pharyngeal plague following the consumption of camel meat, in north-eastern Jordan // *Ann Trop Med Parasitol.* -2005. -Vol. 99. Is.8. -P.789-793.

82. Ratsitorahina M., Chanteau S., Rahalison L., Ratsifasoamanana L., Boisier P. Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar // *Lancet Lond. Engl.* -2000. -Vol. 355. -P. 111–113.
83. Valtueña A.A., Mitnik A., Key F.M., Haak W., Allmäe R., Belinskij A., Daubaras M., Feldman M., Jankauskas R., Janković I., Massy K., Novak M., Pfrengle S., Reinhold S., Šlaus M., Spyrou M.A., Szécsényi-Nagy A., Törv M., Hansen S., Bos K.I., Stockhammer P.W., Herbig A., Krause J. The Stone Age Plague and Its Persistence in Eurasia // *Curr Biol.* – 2017. -Vol.27.Is.23. -P.3683-3691.
84. Dols M. W. The Black Death in the Middle East // Princeton: Princeton University Press. – 1979.
85. Varlik N. Plague and empire in the early modern mediterranean world // Cambridge University Press. -2015.
86. Spyrou M.A., Keller M., Tukhbatova R.I. *et al.* Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes // *Nat Commun.* -2019. -Vol. 10. -P. 4470.
87. Bos K.I., Herbig A., Sahl J., Waglechner N., Fourment M., Forrest S.A., Klunk J., Schuenemann V.J., Poinar D., Kuch M., Golding G.B., Dutour O., Keim P., Wagner D.M., Holmes E.C., Krause J., Poinar H.N. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus // *Elife.* -2016. -Vol.5. e12994
88. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov A.G., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I.R., Nurgaliev D.K., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Historical *Y. pestis* Genomes Reveal the European Black Death as the Source of Ancient and Modern Plague Pandemics // *Cell Host Microbe.* -2016. -Vol. 19. Is.6. -P. 874-881.
89. Susat J., Bonczarowska J.H., Pētersone-Gordina E. *et al.* *Yersinia pestis* strains from Latvia show depletion of the *pla* virulence gene at the end of the second plague pandemic // *Sci Rep.* -2020. -Vol.10. -P.14628.
90. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2013. -Vol.110. Is.2. -P. 577-582.
91. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States // *Front Microbiol.* -2018. -Vol.9. -P.1106.
92. Hymes R. Epilogue: a hypothesis on the East Asian beginnings of the *Yersinia pestis* polytomy // *The Medieval Globe.* -2014. -Vol. 1. -P.12.
93. Fazlinejad A., Ahmadi, F. The Black Death in Iran, according to Iranian Historical Accounts from the Fourteenth through Fifteenth Centuries // *Journal of Persianate Studies.* -2018. -Vol. 11. -P. 56-71.

94. Slavin P. Death by the Lake: Mortality Crisis in Early Fourteenth-Century Central Asia // *Journal of Interdisciplinary History*. -2019. -Vol.50. -P.59-90.
95. Velsko I., Skourtanioti E., Brandt G.. Ancient DNA Extraction from Skeletal Material. -2020.
96. Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., García N., Pääbo S., Arsuaga J.L., Meyer M. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. -Vol.110. Is.39. -P.15758-15763.
97. Kim T.J., Chauhan S., Motin V.L., Goh E.B., Igo M.M., Young G.M. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein // *J Bacteriol*. -2007. -Vol.189. Is.24. -P. 8890-8900.
98. Seifert L., Wiechmann I., Harbeck M., Thomas A., Grupe G., Projahn M., Scholz H.C., Riehm J.M. Genotyping *Yersinia pestis* in Historical Plague: Evidence for Long-Term Persistence of *Y. pestis* in Europe from the 14th to the 17th Century // *PLoS One*. -2016. -Vol.11. Is.1. e0145194
99. Rohland N., Harney E., Mallick S., Nordenfelt S., Reich D. Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA // *Phil. Trans. R. Soc.* -2015. -Vol B 370.
100. Peltzer A., Jäger G., Herbig A., Seitz A., Kniep C., Krause J., Nieselt K., EAGER: Efficient ancient genome reconstruction // *Genome Biology*. -2016. -Vol. 17., -P. 60.
101. Kumar S., Stecher G. and Tamura K., MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Molecular biology and evolution*, -2016. -Vol.33(7). -P.1870-1874.
102. R Development Core Team. 2009R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing
103. Duchene S., Lemey P., Stadler T., Ho S. Y. W., Duchene D. A., Dhanasekaran V., Baele G., Bayesian Evaluation of Temporal Signal in Measurably Evolving Populations // *Mol Biol Evol*. -2020. -Vol.37. -P. 3363–3379.
104. A. R. Quinlan, I. M. Hall, BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841–842 (2010).
105. H. Wickham, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-Verlag New York, 2009).
106. Morozova I., Kasianov A., Bruskin S., Neukamm J., Molak M., Batiéva E., Pudło A., Rühli F.J., Schuenemann V.J. New ancient Eastern European *Yersinia pestis* genomes illuminate the dispersal of plague in Europe // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. -2020. -Vol.375. -P.1812.
107. Leggett R.M, Ramirez-Gonzalez R.H, Clavijo B.J, Waite D., Davey R.P. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics // *Front Genet*. -2013. -Vol.4. -P. 288.
108. Vågane Å.J, Herbig A., Campana M.G., Robles García N.M., Warinner C., Sabin S., Spyrou M.A., Andrades Valtueña A., Huson D., Tuross N., Bos K.I., Krause J. *Salmonella enterica* genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico // *Nat. Ecol. Evol*. -2018. Vol.2. -P. 520–528.

109. Dierckxsens N, Mardulyn N., Smits G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data // *Nucleic Acids Res.* -2017. -Vol. 45. -P. e18.
110. DePristo M. A., Banks E., Poplin R., Garimella K. V., Maguire J. R., Hartl C., Philippakis A. A., Angel G., Rivas M. A., Hanna M., McKenna A., Fennell T. J., Kernytsky A. M., Sivachenko A. Y., Cibulskis K., Gabriel S. B., Altshuler D., Daly M. J., A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data // *Nat Genet.* -2011. -Vol.43. -P. 491–498.
111. Li H, Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup // *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.* *Bioinformatics.* -2009. -Vol.25. Is.16. -P.2078-2089.
112. Costanza P., Herzeel C., Verachtert W. A comparison of three programming languages for a full-fledged next-generation sequencing tool // *BMC Bioinformatics.* – 2019. -Vol.20.Is.1. -P.301.
113. James A. Fellows Yates, Thiseas Christos Lamnidis, Maxime Borry, Aida Andrades Valtueña, Zandra Fagneräs, Stephen Clayton, Maxime U. Garcia, Judith Neukamm, Alexander Peltzer Reproducible, portable, and efficient ancient genome reconstruction with nf-core/eager // *bioRxiv.* -2020. [doi: https://doi.org/10.1101/2020.06.11.145615](https://doi.org/10.1101/2020.06.11.145615)
114. Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C.-H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., Drummond A. J., BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis // *PLoS Computational Biology.* -2014. -Vol.10. e1003537
115. Renaud G., Slon V., Duggan A.T., Kelso J. Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA // *Genome Biol.* -2015. -Vol.16. -P. 224.
116. Meriam Guellil, Oliver Kersten, Amine Namouchi, Egil L. Bauer, Michael Derrick, Anne Ø. Jensen, Nils C. Stenseth, and Barbara Bramantia, Genomic blueprint of a relapsing fever pathogen in 15th century Scandinavia // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2018. -Vol. 115. Is.41. -P. 10422–10427.
117. Andreas G. Nerlich, Bettina Schraut, Sabine Dittrich, Thomas Jelinek, and Albert R. Zink, *Plasmodium falciparum* in Ancient Egypt // *Emerg Infect Dis.* -2008. -Vol.14. Is.8. -P.1317–1319.
118. Mühlemann B., Margaryan A., Damgaard P.B., Allentoft M.E., Vinner L., Hansen A.J., Weber A., Bazaliiskii V.I., Arneborg J., Bogdanowicz W., Falys C., Sablin M., Smrčka V., Sten S., Tashbaeva K., Lynnerup N., Sikora M., Smith D.J., Fouchier R.A.M, Drosten C., Sjögren K.G., Kristiansen K., Willerslev E., Jones T.C. Ancient human *parvovirus B19* in Eurasia reveals its long-term association with humans // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* -2018. -Vol.115. -P. 7557–7562.
119. Алексеева Т.И., Ефимова С.Г., Эренбург Р.Б. Краниологические и остеологические коллекции Института и Музея антропологии МГУ, издательство Московского университета, 1986. 654 с.
120. Moreno-Mayar J.V., Korneliusson T.S., Dalal J., Renaud G., Albrechtsen A., Nielsen R., Malaspina A.S. A likelihood method for estimating present-day human

- contamination in ancient male samples using low-depth X-chromosome data // *Bioinformatics*. – 2019. -Vol.36 Is.3. -P.828–841.
121. Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L., Green R.E., Kelso J., Prufer K., et al. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2007. -Vol.104. Is. 37. -P.14616-14621.
122. Green RE, Malaspinas AS, Krause J, Briggs AW, Johnson PL, Uhler C, Meyer M, Good JM, Maričić T, Stenzel U, et al. A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell*. 2008;134:416–26
123. Racimo F, Renaud G, Slatkin M. Joint estimation of contamination, error and demography for nuclear DNA from ancient humans. *PLoS Genet*. 2016;12:e1005972
124. Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A. V., Pääbo S. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA // *Nucleic Acids Res*. -2001. -Vol.29. -P. 4793–4799.
125. Sawyer S., Krause J., Guschanski K., Savolainen V., Paabo S. Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA // *PLOS ONE* -2012. -Vol.7. e34131
126. Kircher M., Sawyer S., Meyer M. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform // *Nucleic Acids Research*. -2010.
127. Cohn S.K Jr. Epidemiology of the Black Death and successive waves of plague. *Med. Hist. Suppl*. -2008. -P 74-100.
128. Büntgen U., Ginzler C., Esper J., Tegel W., McMichael A. J. Digitizing historical plague // *Clin. Infect. Dis*. -2012. -Vol.55. -P. 1586–1588.
129. Drancourt M., Raoult D. Molecular insights into the history of plague // *Microbes Infect*. -2002. -Vol.4. -P. 105–109.
130. McNally, A., Thomson, N. R., Reuter, S. & Wren, B. W. ‘Add, stir and reduce’: *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 177–190 (2016)
131. Bertherat E., Thullier P., Shako J.C., England K., Koné M.L., Arntzen L., Tomaso H., Koyange L., Formenty P., Ekwanzala F., Crestani R., Ciglenecki I., Rahalison L. Lessons learned about pneumonic plague diagnosis from two outbreaks, Democratic Republic of the Congo // *Emerg Infect Dis*. -2011. -Vol.5. -P.778-784.
132. Wu Liande *Plague; a Manual for Medical and Public Health Workers*. // Weishengshu National quarantine Service, Shanghai station. - 1936.
133. Richard V., Riehm J. M., Herindrainy P., Soanandrasana R., Ratsitoharina M., Rakotomanana F., Andrianalimanana S., Scholz H. C., Rajerison M. Pneumonic plague outbreak, Northern Madagascar // *Emerging infectious diseases*. -2015. -Vol.21. Is.1. -P.8–15.
134. Gamsa M. The Epidemic of Pneumonic Plague in Manchuria 1910–1911 // *Past Present* 190. -2006. -P.147–183.
135. Christie A. B., Chen T. H., Elberg S. S. Plague in Camels and Goats: Their Role in Human Epidemics // *J. Infect. Dis*. -1980. -Vol.141. -P.724–726.
136. Fages A, Hanghøj K, Khan N, Gaunitz C, Seguin-Orlando A, Leonardi M et al. Tracking Five Millennia of Horse Management with Extensive Ancient Genome Time Series // *Cell*. -2019. -Vol. 177. -P.1419-1435.

137. Pollitzer R. Plague // Geneva: WHO. -1954. -P. 409-482.
138. Musralina L.Z.* , Djansugurova L.B., Krause J.J. Features of the study of ancient pathogens // Журнал проблем эволюций открытых систем. -2020. -Vol.22. Is.1. - P. 83-89.
139. Segata N., Waldron L., Ballarini A., Narasimhan V., Jousson O., Huttenhower C. M. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes // Nat. Methods. -2012. -Vol. 9. -P. 811–814.
140. Warinner C., Herbig A., Mann A., et al. A Robust Framework for Microbial Archaeology // Annu Rev Genomics Hum Genet. -2017. -Vol.18. -P.321-356.
141. Key F.M., Posth C., Krause J., Herbig A., Bos K.I. Mining metagenomic data sets for ancient DNA: recommended protocols for authentication // Trends Genet. – 2017. -Vol.33. -P.508–520.
142. Chwolson D. Syrisch-nestorianische Grabinschriften aus Semirjetschie. Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Pétersbourg // VII ser. XXXVII 37. -1890.
143. Kahila Bar-Gal G., Kim M. J., Klein A., Shin D. H., Oh C. S., Kim J. W., Kim T. H., Kim S. B., Grant P. R., Pappo O., Spigelman M., Shouval D. Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a Korean mummy // Hepatology (Baltimore, Md.). -2012. -Vol.56. Is.5. -P. 1671–1680.
144. Samashev Z. Hun-Syanbian cultural and chronological horizon of Berel // in Materials of the International Archaeological conferences. -2019. -P.385–394.
145. Самашев З., Чотбаев А., Кариев Е., Киясбек Г., Самашев С., Ахмадиев Ж. Берел в истории культуры древних кочевников Казахского Алтая //Астана. Фолиант. -2018. С. 264.
146. Мусралина Л.З., Алтынова Н.К., Хусаинова Э.М., Жаниязов Ж.А., Нуржибек Қ.1, Самашев З.С., Бекманов Б.О., Жансүгірова Л.Б. Берел аймағынан табылған адамның сүйек қалдықтарынан ежелгі патогенді микроағзаларға палеогенетикалық талдау // Журнал проблем эволюции открытых систем. -2021 – Т.2, Вып. 23. – С. 117-126.
147. Гумилёв Л. Н. Несторианство и древняя Русь. (Доложено на заседании отделения этнографии ВГО 15 октября 1964 г.) // Всесоюзное Географическое Общество. Доклады отделения этнографии. - 1967. — Вып. 5. — С. 5.
148. Плоских В. М., Плоских В. В. Подводные тайны Иссык-Куля // Бишкек: Илим. -2008.
149. Кошеленко Г. А., Гаيبов В. А. Институт археологии РАН Великая церковь Востока
150. Eroshenko G.A, Nosov N.Y, Krasnov Y.M, Oglodin Y.G, Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzhaparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan // PLoS One. – 2017. -Vol.12. Is.10 e0187230
151. Zhgenti E., Johnson S. L., Davenport K. W., Chanturia G., Daligault H. E., Chain P. S., Nikolich M. P. Genome Assemblies for 11 *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Caucasus Region // Genome Announc. -2015. -Vol.3. e01030-15
152. A. Andrades Valtuena, G. U. Neumann, M. A. Spyrou, L. Musralina, F. Aronb.,

- A. Beisenov, A. B. Belinskiy, K. I. Bosa, A. Buzhilova, M. Conrad, L. B. Djansugurova, M. Dobes, Michal Ernee, J. Fernandez-Eraso, B. Frohlich, M. Furmaneko, A. Haluszkoo, S. Hansen, E. Harney, A. N. Hissa, A. Hubner, F. M. Keya, E. Khussainova, E. Kitovg, A. O. Kitovaw, C. Knipper, D. Kuhnert, C. Lalueza-Foxz, J. Littletonaa, K. Massy, A. Mitniks, J. Antonio M. Alustiza, I. Olalde, L. Papac, S. Penskea, J. Peskaee, R. Pinhasi, D. Reichs, S. Reinhold, R. Stahl, H. Stauble, R. I. Tukhbatovab, S. Vasilyev, E. Veselovskaya, C. Warinnera, P. W. Stockhammera, W. Haak, J. Krausea, and A. Herbig, Stone Age *Yersinia pestis* genomes shed light on the early evolution, diversity, and ecology of plague PNAS 2022 Vol. 119
153. Giffin K., Lankapalli A. K., Sabin S. *et al.* A treponemal genome from an historic plague victim supports a recent emergence of yaws and its presence in 15th century Europe // Sci Rep. -2020. -Vol.10. -P. 9499.
154. W. Haak, *et al.*, Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature* **522**, 207–211 (2015).
155. S. Wilkin, *et al.*, Dairy pastoralism sustained eastern Eurasian steppe populations for 5,000 years. *Nat. Ecol. Evol.* **4**, 346–355 (2020)
156. F. Klimscha, Transforming Technical Know-how in Time and Space. Using the Digital Atlas of Innovations to understand the Innovation Process of Animal Traction and the Wheel (2017) https://doi.org/10.17169/FUDOCs_document_000000026267 (March 24, 2021).
157. P. Librado, *et al.*, The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature* **598**, 634–640 (2021).
158. Anthony, D. W., *The Horse, the Wheel, and Language: How Bronze-Age Riders from the Eurasian Steppes Shaped the Modern World.* (2007) (July 31, 2016).
159. A. B. Saeed, N. A. Al-Hamdan, R. E. Fontaine, Plague from Eating Raw Camel Liver. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1456–1457 (2005)
160. A. Mahmoudi, *et al.*, Plague reservoir species throughout the world. *Integr. Zool.* **n/a** (2020).
161. S. Koskiniemi, S. Sun, O. G. Berg, D. I. Andersson, Selection-Driven Gene Loss in Bacteria. *PLOS Genet.* **8**, e1002787 (2012)
162. H. Ochman, N. A. Moran, Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**, 1096–1099 (2001)
163. R. J. Eisen, D. T. Dennis, K. L. Gage, The Role of Early-Phase Transmission in the Spread of *Yersinia pestis*. *J. Med. Entomol.* **52**, 1183–1192 (2015)
164. D. M. Bland, A. Miarinjara, C. F. Bosio, J. Calarco, B. J. Hinnebusch, Acquisition of *Yersinia murine* toxin enabled *Yersinia pestis* to expand the range of mammalian hosts that sustain flea-borne plague. *PLOS Pathog.* **17**, e1009995 (2021)
165. A. B. Christie, T. H. Chen, S. S. Elberg, Plague in Camels and Goats: Their Role in Human Epidemics. *J. Infect. Dis.* **141**, 724–726 (1980).
166. J. Kehrmann, *et al.*, Two fatal cases of plague after consumption of raw marmot organs. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1878–1880 (2020).
167. F. Sebbane, C. O. Jarrett, D. Gardner, D. Long, B. J. Hinnebusch, Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5526–5530

(2006).

168. D. L. Zimble, J. A. Schroeder, J. L. Eddy, W. W. Lathem, Early emergence of *Yersinia pestis* as a severe respiratory pathogen. *Nat. Commun.* **6** (2015).

169. V. Richard, *et al.*, Pneumonic Plague Outbreak, Northern Madagascar, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 8–15 (2015).

170. D. Wong, *et al.*, Primary Pneumonic Plague Contracted from a Mountain Lion Carcass. *Clin. Infect. Dis.* **49**, e33–e38 (2009).

171. Barker H. Laying the Corpses to Rest: Grain, Embargoes, and *Yersinia pestis* in the Black Sea, 1346–48 // *Speculum*. -2021. -Vol.96. -P. 97-126.

172. Spyrou, M.A., Musralina, L., Gnecci Ruscone, G.A. *et al.* The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature* (2022).

173. Green M. H. The Four Black Deaths. *The American Historical Review* – 2020. -Vol.125. -P.1601-1631.

174. Norris J. East or west? The geographic origin of the Black Death // *Bulletin of the History of Medicine*. -1977. -Vol.51. -P 1-24.

175. Reich D., Green R., Kircher M. *et al.* Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia // *Nature*. -2010. -Vol.468. -P. 1053–1060.

176. Anisimov A. P., Lindler L. E., Pier G. B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* // *Clin Microbiol Rev.* -2004. -Vol. 17. -P. 434-464.

177. Onishchenko G., Kutyrev V. Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia, and Siberia // *Moscow - Medicine*. -2004.

178. Tsiamis C., Poulakou-Rebelakou E., Marketos S. Earthquakes and plague during Byzantine times: Can lessons from the past improve epidemic preparedness? // *Acta medico-historica Adriatica: AMHA*. -2013. -Vol. 11. -P. 55-64.

179. McCormick M. Rats, communications, and plague: toward an ecological history // *Journal of Interdisciplinary History*. -2003. -Vol. 34. -P. 1-25.

180. Pourhossein B., Esmaeili S., Gyuranecz M., Mostafavi E. Tularemia and plague survey in rodents in an earthquake zone in southeastern Iran // *Epidemiology and Health*. -2015. -Vol. 37.

181. A.M. Korjenkov, S.V. Abdieva, A.B. Dzhumabaeva, A.B. Fortuna, E. Mamyrov, E.A. Morozova, L.A. Orlova, P.S. Vakhrameeva, Strong historical earthquakes in the northwestern Issyk Kul'basin (northern Tien Shan) // *Russian Geology and Geophysics* -2011. -Vol.52. -P.1007-1015.

182. Korzhenkov A.M., Kol'chenko V. A., Luzhanskii D. V., Abdieva S. V., Deev E. V., Mazeika J. V., Rogozhin E. A., Rodina S. N., Rodkin M. V., Fortuna A.B., Charimov T. A., Yudakhin A. S. Archaeoseismological studies and structural position of the medieval earthquakes in the South of the Issyk-Kul depression (Tien Shan) // *Izvestiya, Physics of the Solid Earth*. -2016. -Vol. 52. -P. 218-232

183. Kocher A., Papac L, Barquera R., Key F.M., Spyrou M.A., Hübler R., Prüfer K., Rohrlach A.B., Aron F., Stah R., Wissgott A., Mittnik A., Villalba-Mouco V., Neumann G.U., Rivollat M., van de Loosdrecht M.S., Majander K., Tukhbatova R.I., Musralina L., Ghalichi A., Penske S., Sabin S., Miche M., Gretzinger J., Nelson E.A., Ferraz T., Nägele K., Parker C., Keller M., Guevara E.K., Feldman M., Eisenmann S., ... Batieva E., Calmet M.A., Llamas B., Schultz M., Krauß R., Jiménez-Echevarría J.,

Francken M., Shnaider S., Altena E., Van de Vijver K., Fehren-Schmitz L., Tung T.A., Lösch S., Dobrovolskaya M., Makarov N., Read C., Van Twest M., Sagona C., Ramsdell P.C., Akar M., Yener K.A., Ballesteros E.C., Cucca F., Mazzarello V., Utrilla P., Rademaker K., Fernández-Domínguez E., Baird D., Semal P., Márquez-Morfin L., Roksandic M., Steiner H., Salazar-García D.C., Shishlina N., Erdal Y.S., Hallgren F., Boyadzhiev Y., Boyadzhiev K., Küßner M., Sayer D., Onkamo P., Skeates R., Buzhilova A., Khussainova E., Djansugurova L.B., Beisenov A.Z., Samashev Z., Massy K., Rojo-Guerra M., Mannino M., Moiseyev V., Mannermaa K., Balanovsky O., Deguilloux M.-F., Reinhold S., Hansen S., Kitov E.P., Dobeš M., Ernée M., Meller H., Warinner C., Schiffels S., Stockhammer Ph.W., Bos K., Posth C., Herbig A., Haak W., Krause J., and Kühnert D. Ten millennia of hepatitis B virus evolution // *Science*. – 2021. – Vol. 374, Is. 6564. P. 182-188.

184. Guido Alberto Gnecci-Ruscione, Elmira Khussainova, Nurzhibek Kahbatkyzy, Lyazzat Musralina, Maria A. Spyrou, Raffaella A. Bianco, Rita Radzeviciute, Nuno Filipe Gomes Martins, Caecilia Freund, Olzhas Iksan, Alexander Garshin, Zhassulan Zhaniyazov, Bakhytzhhan Bekmanov, Egor Kitov, Zainolla Samashev, Arman Beisenov, Natalia Berezina, Yakov Berezin, András Zsolt Bíró, Sándor Évinger, Arman Bisseмбаev, Gaziz Akhatov, Aslan Mamedov, Akhan Onggaruly, Dmitriy Voyakin, Aidos Chotbayev, Yeldos Kariyev, Alexandra Buzhilova, Leyla Djansugurova*, Choongwon Jeong* and Johannes Krause, Ancient genomic time transect from the Central Asian Steppe unravels the history of the Scythians // *Science Advances*. -2021. -Vol. 7. Is. 13. - eabe4414.

Пример работы с каталогом остеологических материалов коллекции Института и Музея антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова [23] и данные по некоторым отобранным для анализа ДНК образцам

#	Надпись на черепе [23]	Образцы (зубы) взятые для анализа ДНК	Образцы, которые нашлись в коллекции, либо без зубов	Период	Множественные или единичные захоронения
1	2	3	4	5	6
1	Чеш-Тюбе, Таласская долина, Киргизская ССР; И.К.Кожомбердыев, Н.Н.Миклашевская, 1957 г., экспедиция Киргизской ССР	все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов было зубов.	#748*	Бронзовый век	единичные
2	Адж, Киргизская АССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952, 1963 гг., Киргизская экспедиция	#561: ПН М3; #559: ПН М2; #666: ЛВМ2; #667: ПН М3; #664: ПВ М3; #569: ПН М2; #546: нет зубов; #560: нет зубов; #573: ЛН М2; #570: ПВ М3; #572: ЛВ М2; #588: ЛН М2; #618: ПВ М1; #590: ЛН М2; #628: нет зубов; #635: нет зубов; #641: нет зубов; #660: ЛВ М2	571, 582	I пол. I тыс. н.э.	множественные
3	Айгыр-Джал, Нарынский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция Киргизской ССР	все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов было зубов.	567* Нет зубов	I пол. I тыс. н.э.	единичные

Продолжение таблицы Приложения А

1	2	3	4	5	6
4	Богдановка, Горьковский р-н, Омская обл.; В.А.Могильников, 1966 г., Западносибирская экспедиция СССР	#228/1: молочный ЛН М1; #228/2: ЛВ-М2; #228/3: ЛН С; #228/4: ЛВ-М2; #228/5: ПВ-М2	#228/6 нет черепа	II-I д.н.э.	множественные
5	Алай /м-ки Нура I, II, Туюк II/Киргизская ССР; экспедиция ИИ АН Кирг. ССР, 1975, 1976 гг.	#360/1: ПН М2; #360/5: ЛВМ2; #360/4: ЛВМ3; #360/3: ПВ М3; #360/6: ЛВМ2; #360/11: нет зубов; #360/8: ПВ Р2; #360/7: ЛН М2; #360/10: ПВ М1; #360/12: ЛН М2; #360/14: ЛВ М1	индивид #360/7 перенапрявлен в Йену	Сакское время V-I вв. до н.э.	множественные
6	Алыш, Нарынский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция 596, ТШ-54, Ал-2 К2 625, ТШ-54, Алыш-1	Зубы - 2, #596, 625* #625: ПН М2; #596: ПВ М2		Кенкольское время тыс н.э.	множественные
7	Дюрбельджин, Акталинский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция ССР Дюрбельджин, 1953, К1	#576: ЛВ М2		I пол. I тыс. н.э.	единичные
8	Куртикова щель, Покровский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция ИИ АН Кирг. ССР. 578 – ТШ-53, К2	#566: нет зубов; #578: ЛН М1	Череп -2, #566, 578*	I пол. I тыс. н.э.	множественные

Продолжение таблицы Приложения А

1	2	3	4	5	6
9	Чильпек, близ г. Каракола, Киргизская ССР, М.В.Воеводский, 1929 г.	#8187: ЛН М3; #8190: нет зубов; #8186: ЛВ М3; #8188: Р1; #8189: Р1; #8191: ПВ Р1		I в. до н.э. -I в.н.э.	множест- венные
10	Шамси, Чолпонский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г.	#557: ПВ М2		I пол. I тыс. н.э.	единич- ные
11	Кенкольский м-к, Таласская долина, Киргизская ССР; П.Н.Кожемяко, И.К.Кожамбердиев, Н.Н.Миклашевская, 1956, 1957 гг., Киргизская экспедиция ИЭ АН СССР и ИИ АН Кирг. ССР.	#681: ПВ М2; #682: ЛВМ3; #679: ПВ М2; #683: левый правый М2; #684: ЛВ М1; #686: ЛВ М2; #685: нет зубов; #687: ПН М2; #688: М3; #689: М1; #690: ЛН М3; #691: ПВ М1; #692: ПН М2; #693: ПВ М2; #694: ПН М1; #695: М3; #696: ЛВМ2; #697: ПН М2; #698: нет зубов; #699: ПВ М2; #700: ПН М3; #701: ПВ М3; #702: ПН М2; #703: ЛН М2; #704: ЛВ М1; #705: ПВ М2; #706: ЛВ М2; #707, 708: нет зубов; #709: ЛВ М2; #710: ПВ М3; #711: ПН М3; #712: ПВ клык; #713: ЛН М3; #714: ПВ М2; #715: ПВ М1; #716: ПН М2; #717: ЛН М1; #718: ЛВ М2; #719: ЛН М2; #720: нет зубов; #721: ЛН М1; #722, 723: нет зубов	680 нет	I-II вв., VII-VIII вв.	множест- венные
12	Иссык-Куль /оз./, Семиреченская обл.; Поярков, 1896 г.	#4197: ПВ Р1;	#4195, 4196, 4198*: нет зубов	IV вв	множест- венные

Продолжение таблицы Приложения А

1	2	3	4	5	6
13	Ак-Таш, Нарынский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция ССР	#542: ПВ М2; #545: ЛВ М2		IV вв	множест- венные
14	Айгыр-Джал, Нарынский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция	#668*: ПН М1	#636	IV вв	множест- венные
15	Ак-Чий, Нарынский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция	#544: ЛВ Р2; #650*: ЛН М2		IV вв	множест- венные
16	Байталчи, Нарынский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция	#629: ПВ М3; #580: ПВ Р2; #648: ПН М3; #652*: Р2; #587: ПВ М2;	#583: нет зубов;	IV вв	множест- венные
17	Боровое, Шадринский р-н, К -ская обл.; В.Ф.Генинг, 1962, 1963 гг., Уральская археол. экспедиция Свердловского ГУ.	#240/15: ЛН Р2;		II в. до н.э. - II в. н.э.	единич- ные
18	Адж, Киргизская АССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952, 1953 гг.	все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов было зубов.	#643* нет зубов	Усуньск ое время	единич- ные

Продолжение таблицы Приложения А

1	2	3	4	5	6
19	Орто-Токой, Кочкорский район, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция	Не все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов не было зубов.	#550, 665* нет черепа	IV вв	множественные
20	Казарман, Нарынский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1954 г., Киргизская экспедиция ИИ АН Кирг. ССР и ИЭ АН СССР	Не все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов не было зубов.	#579* нет черепа	IV вв	единичные
21	Кара-Саз, Кочкорский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция ИЭ АН СССР и АН Кирг. ССР	#586: ЛН М1; #540: ПН М2; #548: М1;n #593: ЛН М2; #647: ПН М1; #649: ПВ Р1; #602: ПН М3	#541: нет зубов; 609 нет черепа	IV вв	множественные
22	Кара-Тала, Акталинский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция ИЭ АН СССР и АН Кирг. ССР	Не все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов не было зубов.	#549, 604: нет зубов	IV вв	множественные
23	Кен-Су, Чолпонский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1957 г., Киргизская экспедиция	#551: ПВ М2; #651*: ЛН М1		IV вв	множественные
24	Кен-Су 2, Чолпонский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1957 г., Киргизская экспедиция	#556: информация на черепе указывает на принадлежность к Кен-Су-2*> #556: ПН М1		IV вв	множественные

Продолжение таблицы Приложения А

1	2	3	4	5	6
25	Тянь-Шань /Алма-Луу, Кара-Тектир, Кызыл-Жази и др./, Киргизская ССР; ИИ АН Кирг. ССР, 1975-1976 гг.	#360/26: ПН М2; #360/27: ЛВ М3; #360/29: ЛН М3; #360/30: нет зубов; #360/28: I2; #360/31: ПН Р1; #360/33: нет зубов; #360/35: нет зубов; #360/23: нет зубов; #360/36: нет зубов; #360/16, 360/17: нет зубов; #360/39: ЛВ М3; #360/38: ПВ Р1; #360/34: ЛВ М3; #360/32: ЛВ М2; #360/25: нет зубов; #360/20: ПВ М3; #360/15: нет зубов; #360/24: (ПВ) резец (рыхлый); #360/37: ЛН М2; #360/22: нет зубов; #360/21: ЛВ М3; #360/18: нет зубов; #360/19: ПН Р1	#360/36: left petrous bone --> shipped to Jena via Mail	I-IV вв	множественные
26	Уч-Эмчек, Калининский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция	#568: ПВ М2; #584: ЛВ М3; #598: ПН Р2; #608: ПВ М2;		IV вв	множественные
27	Чегиртне-Арык, Акталинский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция ИЭ АН СССР и АН Кирг. ССР	#581*: вПВ М3		IV вв	единичные
28	Шамси, Чолпонский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г., Киргизская экспедиция	#617: ЛВМ2; #620*: М1		IV вв	множественные

Продолжение таблицы Приложения А

1	2	3	4	5	6
29	Чеш-Тюбе, Таласская долина, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952, 1957 гг., Киргизская экспедиция ИЭ АН СССР и АН Кирг. ССР	#622: ПН М3; #749: ЛВкльк	#749: височная кость отправлена в Йену	I-V вв	множественные
30	Челкар /оз./, Чапаевский р-н, Уральская обл., Казахская ССР, М.Г.Мошкова, Г.В.Кушаев, 1969 г., экспедиция ИА АН СССР и Пед.Института г.Уральская	#283/3: ЛВМ2; #283/1: ПН М3		VI-IV вв., до н.э.	множественные
31	Шамси, Чолпонский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1954 г., Киргизская экспедиция	#599*: ЛН М3		Усуньское время	единичные
32	Шмаково, Белозерский р-н, Ф.Генинг, С.В.Хохлова, 1961г., экспедиция Свердловского ГУ	Не все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов не было зубов.		IV-III век д.н.э.	множественные
33	Приречное, Кустанайская обл., К.Ф.Смирнов, М.Г.Мошкова, 1966, 1967 гг., Оренбургская экспедиция	#232/5: молочный ПН М2; 232/3: ЛН М3; #232/2: М3; #232/1: ПН М3;	232/4: нет зубов	II тысячелетия нашей эры	множественные
34	Шадринск, М.С. Акимова, 1961 г., экспедиция МГУ	Не все образцы с каталога нашлись в Музее, либо у черепов не было зубов.		V-III век д.н.э.	множественные

Продолжение таблицы Приложения А

1	2	3	4	5	6
35	Коконовка, Омская обл.; 1967 г., В.А.Могильников, Западно- сибирская экспедиция	#225/1: нет зубов; 225/2: молочный ПВ I1; #225/3: ЛН I2; #225/4: ЛВМ1		IV-III д.н.э.	множест- венные
36	Горная Бития, Омский р-н, Омская обл.; В.А.Могильников, 1967 г., Западносиб. экспедиция	#228/12: ПН М1; #228/14: мол. ПН М2; #228/15: ПН М3; #228/19: ЛВМ2; #228/20: ЛН М2; #228/21: молочный ЛН М2; #228/23: молочный ПН М1; #228/24: ЛН М3; #28/25: молочный ЛВР2; #228/26: М1; #228/27: М2; #228/31: М1;	#228/30: нет зубов; #228/29: нет зубов; 13, 16, 17, 18, 22, 28, 29, 30 нет черепов	III-II д.н.э.	множест- венные
37	Воробьёво, Шадринский р-н, К - ская обл.; В.Е.Стойнов, С.В.Хохлова, 1961 г., экспедиция Свердловского ГУ.	#22/1: М2; #22/1: ПН М3; #22/3: верхний молярный; #22/4: ПН М3; #22/2: М3	#22/2: нет височной кости --> отправлено в Йену отдельно	V-II д.н.э.	множест- венные
Примечание: * Информация на черепе верная, могли сделать ошибку, внося в Каталог [23] ПВ - правый верхний; ПН – правый нижний; ЛВ - левый верхний; ЛН - левый нижний					

Пары праймеров для индексирования образцов

P7 primer ID	P7 sequence	P5 primer ID	P5 sequence	Образцы
1	2	3	4	5
P7 Jen 8nt 0634	CCTCCGGT	P5 Jen 8nt 0728	CCAACCGC	MER001.A0101
P7 Jen 8nt 0644	CTCTGATG	P5 Jen 8nt 0715	AGCTGCAA	MER002.A0101
P7 Jen 8nt 0243	CTGAGTTC	P5 Jen 8nt 0333	CCAGACTC	TRG001.A0101
P7 Jen 8nt 0690	TGCTAACG	P5 Jen 8nt 0736	CGCCGCAT	TRG002.A0101
P7 Jen 8nt 0639	CGTAGATC	P5 Jen 8nt 0383	TCGCGTAG	TRG003.A0101
P7 Jen 8nt 0260	GCTTCCGA	P5 Jen 8nt 0740	CGGTACCG	KLR001.A0101
P7 Jen 8nt 0270	GTACGAGC	P5 Jen 8nt 0787	TGACTTAT	ILI001.A0101
P7 Jen 8nt 0622	ATAGTCAA	P5 Jen 8nt 0349	CTTCATGG	KSK001.A0101
P7 Jen 8nt 0286	TCGCGGAT	P5 Jen 8nt 0723	ATTCCTTC	AKU001.A0101
P7 Jen 8nt 0601	AATAATCC	P5 Jen 8nt 0362	GCTGATCG	AKU002.A0101
P7 Jen 8nt 0287	TCGGAACG	P5 Jen 8nt 0312	AGAACGAC	AKU003.A0101
P7 Jen 8nt 0683	TCGAATAA	P5 Jen 8nt 0394	TTCCTAAC	BRO001.A0101
P7 Jen 8nt 0682	TCCTCAAT	P5 Jen 8nt 0347	CTCTAACG	BTK001.A0101
P7 Jen 8nt 0291	TGCAGCGA	P5 Jen 8nt 0790	TTAAGGTC	KRL001.A0101
P7 Jen 8nt 0650	GACGGATT	P5 Jen 8nt 0376	TAACGCTT	NTK001.A0101
P7 Jen 8nt 0237	CGTAGGCA	P5 Jen 8nt 0757	GCATAGAT	AKR001.A0101
P7 Jen 8nt 0615	AGATGCGA	P5 Jen 8nt 0721	ATCAGTTG	BIR001.A0101
P7 Jen 8nt 0627	CAGAATAT	P5 Jen 8nt 0779	TATGACTC	BIR002.A0101
P7 Jen 8nt 0280	TCAACTTG	P5 Jen 8nt 0367	GGCCGCGA	BIR003.A0101
P7 Jen 8nt 0631	CATTGCCA	P5 Jen 8nt 0321	ATGCGAAG	BIR005.A0101
P7 Jen 8nt 0268	GGTCGCTT	P5 Jen 8nt 0709	ACTGCCTC	BIR011.A0101
P7 Jen 8nt 0674	GTCCTAAC	P5 Jen 8nt 0788	TGCCAATT	KSH005.A0101
P7 Jen 8nt 0677	TACTTATC	P5 Jen 8nt 0744	CTCGCGAG	ASU001.A0101
P7 Jen 8nt 0266	GGTCAGAT	P5 Jen 8nt 0773	TACCGACT	SMY005.A0101
P7 Jen 8nt 0681	TCAGGCGA	P5 Jen 8nt 0331	CCAAGAGA	MBL001.A0101
P7 Jen 8nt 0663	GCTGCGGC	P5 Jen 8nt 0396	TTCTTGGC	ASU002.A0101
P7 Jen 8nt 0632	CCGAATTG	P5 Jen 8nt 0713	AGATGGCC	SMY006.A0101
P7 Jen 8nt 0204	AACGGCGC	P5 Jen 8nt 0759	GCGGCCTG	BGY001.A0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0253	GCATGGCG	P5_Jen_8nt_0742	CTCAGAAG	SMY007.A0101
P7_Jen_8nt_0633	CCGGCGAC	P5_Jen_8nt_0357	GCAAGTCA	KZB001.A0101
P7_Jen_8nt_0242	CTCTCCAA	P5_Jen_8nt_0359	GCCTGGAC	TND001.A0101
P7_Jen_8nt_0605	ACGAGGAA	P5_Jen_8nt_0387	TGCGACTG	TGP001.A0101
P7_Jen_8nt_0669	GGTACGCC	P5_Jen_8nt_0706	AATTAAGG	KZK001.A0101
P7_Jen_8nt_0623	ATCAAGCA	P5_Jen_8nt_0786	TCGCGGTA	SMY001.A0101
P7_Jen_8nt_0207	AACTGATA	P5_Jen_8nt_0785	TCCTTAGA	SGZ001.B0101
P7_Jen_8nt_0675	GTTAAGTT	P5_Jen_8nt_0746	CTGGACGA	KRM001.A0101
P7_Jen_8nt_0625	ATCTCAGT	P5_Jen_8nt_0375	GTTCGCAG	SMY002.A0101
P7_Jen_8nt_0297	TTGAGACC	P5_Jen_8nt_0342	CGGAGGTC	KTS001.A0101
P7_Jen_8nt_0275	TACGGTAC	P5_Jen_8nt_0377	TACTGCAT	SMY003.A0101
P7_Jen_8nt_0209	AAGACCAG	P5_Jen_8nt_0318	ATAGACTT	AKE001.A0101
P7_Jen_8nt_0274	GTTCAATA	P5_Jen_8nt_0766	GGCAGGCC	SMY004.A0101
P7_Jen_8nt_0218	AGCGTAAC	P5_Jen_8nt_0774	TACTACGG	SGZ002.B0101
P7_Jen_8nt_0653	GAGCTAGT	P5_Jen_8nt_0731	CCTATATG	KSH004.B0101
P7_Jen_8nt_0276	TAGTATCT	P5_Jen_8nt_0783	TCATTGCT	KNT005.B0101
P7_Jen_8nt_0635	CCTTCAGG	P5_Jen_8nt_0761	GCTAAGTT	KRY001.B0101
P7_Jen_8nt_0659	GATGCGCT	P5_Jen_8nt_0336	CCTGCTCC	SRK001.B0101
P7_Jen_8nt_0264	GGCCAGTA	P5_Jen_8nt_0320	ATGATCTG	KNL007.A0101
P7_Jen_8nt_0229	CCAATACC	P5_Jen_8nt_0751	GAGCTCCA	TAL003.B0101
P7_Jen_8nt_0626	ATGGTACT	P5_Jen_8nt_0748	GACGGATT	KYZ002.B0101
P7_Jen_8nt_0608	ACTCGCTA	P5_Jen_8nt_0303	AACGCGCA	KNL008.A0101
P7_Jen_8nt_0685	TCGGTCAT	P5_Jen_8nt_0351	GAATATTC	TAL004.B0101
P7_Jen_8nt_0217	AGAAGTTA	P5_Jen_8nt_0726	CAGGCGGC	BDY001.B0101
P7_Jen_8nt_0655	GAGGAGTA	P5_Jen_8nt_0749	GAGACTGC	KNL021.A0101
P7_Jen_8nt_0290	TGAGTCCT	P5_Jen_8nt_0719	AGTTGCGC	TAL005.B0101
P7_Jen_8nt_0695	TTCCGGTC	P5_Jen_8nt_0395	TTCGTACG	NUR002.B0101
P7_Jen_8nt_0687	TGACGCGG	P5_Jen_8nt_0337	CCTGGCCA	ESZ003.A0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0265	GGCGCGTC	P5_Jen_8nt_0322	ATGGCAGT	KNT001.B0101
P7_Jen_8nt_0293	TGCTCTTC	P5_Jen_8nt_0718	AGTCAAGA	KSH002.B0101
P7_Jen_8nt_0603	ACCATCAA	P5_Jen_8nt_0355	GATCTGGT	KNT003.B0101
P7_Jen_8nt_0664	GGAACGGT	P5_Jen_8nt_0720	ATATGGAT	KSH003.B0101
P7_Jen_8nt_0202	AACGCCAT	P5_Jen_8nt_0712	AGAGACGC	KNT004.B0101
P7_Jen_8nt_0234	CGGAGACT	P5_Jen_8nt_0379	TAGTAACC	BRE014.B0101
P7_Jen_8nt_0231	CCGGTTAG	P5_Jen_8nt_0743	CTCCTGAT	BRE023.A0101
P7_Jen_8nt_0641	CTCAGTCT	P5_Jen_8nt_0760	GCGTCAGC	KUS010.A0101
P7_Jen_8nt_0200	AACGATAG	P5_Jen_8nt_0717	AGGCCTTG	BIS001.A0101
P7_Jen_8nt_0645	CTGAAGCC	P5_Jen_8nt_0324	ATTGGATG	KYY002.A0101
P7_Jen_8nt_0208	AAGAATGG	P5_Jen_8nt_0724	ATTGAGTA	KUS009.A0101
P7_Jen_8nt_0679	TATTGCGC	P5_Jen_8nt_0309	ACCATAGT	BIR008.A0101
P7_Jen_8nt_0686	TCTCCGTC	P5_Jen_8nt_0372	GTATATAG	KYY001.A0101
P7_Jen_8nt_0621	ATAGCTTG	P5_Jen_8nt_0356	GATGCAGT	SMY010.A0101
P7_Jen_8nt_0656	GAGTAACG	P5_Jen_8nt_0735	CGCAAGAC	BIR007.A0101
P7_Jen_8nt_0654	GAGGACCT	P5_Jen_8nt_0307	AAGACGCT	KUS016.A0101
P7_Jen_8nt_0205	AACTCAAG	P5_Jen_8nt_0384	TCGCTTCC	SMY008.A0101
P7_Jen_8nt_0610	ACTTCTAA	P5_Jen_8nt_0745	CTGCATAT	BIR006.A0101
P7_Jen_8nt_0624	ATCTACGG	P5_Jen_8nt_0737	CGCCTTGC	KUS015.A0101
P7_Jen_8nt_0692	TTAACCAA	P5_Jen_8nt_0392	TGGTCTCA	SMY009.A0101
P7_Jen_8nt_0646	CTGCCTCG	P5_Jen_8nt_0738	CGCTCTGG	BIR004.A0101
P7_Jen_8nt_0203	AACGCGCA	P5_Jen_8nt_0750	GAGAGTAA	KUS014.A0101
P7_Jen_8nt_0660	GCAGGAGG	P5_Jen_8nt_0778	TATATCCG	BRE025.A0101
P7_Jen_8nt_0281	TCAGATTC	P5_Jen_8nt_0391	TGGCGCGT	KUS012.A0101
P7_Jen_8nt_0222	ATGACTGC	P5_Jen_8nt_0764	GGAAGCTC	BRE024.A0101
P7_Jen_8nt_0295	TTATAACT	P5_Jen_8nt_0722	ATTAATAG	KUS011.A0101
P7_Jen_8nt_0241	CTATTCAT	P5_Jen_8nt_0739	CGGTAAGA	AKS002.A0101
P7_Jen_8nt_0257	GCGACCTG	P5_Jen_8nt_0361	GCGGTAGA	KSZ002.A0101
P7_Jen_8nt_0636	CGCCTATG	P5_Jen_8nt_0344	CTAATTGG	ADJ007.A0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0671	GTACCGAG	P5_Jen_8nt_0330	CATTAGCA	KSZ001.A0101
P7_Jen_8nt_0665	GGAACTTC	P5_Jen_8nt_0323	ATGGCCTA	AKS001.A0101
P7_Jen_8nt_0628	CAGACCTT	P5_Jen_8nt_0733	CGAGTACG	KKM001.B0101
P7_Jen_8nt_0223	ATGCTTAG	P5_Jen_8nt_0304	AACTACCT	SBT001.A0101
P7_Jen_8nt_0278	TATATTGA	P5_Jen_8nt_0353	GAGCAAGG	ADJ006.A0101
P7_Jen_8nt_0284	TCCTGAGA	P5_Jen_8nt_0741	CGTACGCC	AKC001.A0101
P7_Jen_8nt_0672	GTAGAAGT	P5_Jen_8nt_0705	AATGCTCG	ADJ013.A0101
P7_Jen_8nt_0678	TAGTAGAG	P5_Jen_8nt_0305	AACTAGTC	ADJ005.A0101
P7_Jen_8nt_0611	ACTTGCAG	P5_Jen_8nt_0702	AAGGTTCA	KSZ007.A0101
P7_Jen_8nt_0609	ACTGGAGC	P5_Jen_8nt_0784	TCCGCTCT	ADJ012.A0101
P7_Jen_8nt_0600	AAGGTTCA	P5_Jen_8nt_0792	TTACTCCT	ADJ004.A0101
P7_Jen_8nt_0230	CCAATGGA	P5_Jen_8nt_0789	TGGACTAT	KSZ006.A0101
P7_Jen_8nt_0619	AGTTATGC	P5_Jen_8nt_0393	TGGTTAAG	ADJ011.A0101
P7_Jen_8nt_0612	AGAAGCAT	P5_Jen_8nt_0732	CCTTCCGA	ADJ003.A0101
P7_Jen_8nt_0671	GTACCGAG	P5_Jen_8nt_0302	AACGCCAT	KSZ005.A0101
P7_Jen_8nt_0621	ATAGCTTG	P5_Jen_8nt_0304	AACTACCT	ADJ010.A0101
P7_Jen_8nt_0695	TTCCGGTC	P5_Jen_8nt_0783	TCATTGCT	KSZ004.A0101
P7_Jen_8nt_0631	CATTGCCA	P5_Jen_8nt_0315	AGTCAGTC	ADJ009.A0101
P7_Jen_8nt_0266	GGTCAGAT	P5_Jen_8nt_0747	CTTAAGAA	KSZ003.A0101
P7_Jen_8nt_0605	ACGAGGAA	P5_Jen_8nt_0771	GTAGCAAT	ADJ008.A0101
P7_Jen_8nt_0615	AGATGCGA	P5_Jen_8nt_0775	TAGCTGAT	CTA001.A0101
P7_Jen_8nt_0667	GGAGTATG	P5_Jen_8nt_0762	GCTCCATC	UCH002.A0101
P7_Jen_8nt_0219	AGTTGAAC	P5_Jen_8nt_0385	TCTAGAGG	CHB002.A0101
P7_Jen_8nt_0212	AATAAGGA	P5_Jen_8nt_0774	TACTACGG	DYU001.A0101
P7_Jen_8nt_0286	TCGCGGAT	P5_Jen_8nt_0321	ATGCGAAG	UCH001.A0101
P7_Jen_8nt_0237	CGTAGGCA	P5_Jen_8nt_0764	GGAAGCTC	KRV001.A0101
P7_Jen_8nt_0646	CTGCCTCG	P5_Jen_8nt_0720	ATATGGAT	ALH002.A0101
P7_Jen_8nt_0686	TCTCCGTC	P5_Jen_8nt_0730	CCATTGAG	SHS003.A0101
P7_Jen_8nt_0203	AACGCGCA	P5_Jen_8nt_0772	GTCCGAAT	BIS003.A0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7 Jen 8nt 0628	CAGACCTT	P5 Jen 8nt 0367	GGCCGCGA	SHS002.A0101
P7 Jen 8nt 0289	TCTCTCTG	P5 Jen 8nt 0765	GGACCGTC	ALH001.A0101
P7 Jen 8nt 0294	TGGAAGGT	P5 Jen 8nt 0332	CCAATGGT	SHS001.A0101
P7 Jen 8nt 0209	AAGACCAG	P5 Jen 8nt 0738	CGCTCTGG	BIS002.A0101
P7 Jen 8nt 0647	CTTCATGG	P5 Jen 8nt 0744	CTCGCGAG	ADJ002.A0101
P7 Jen 8nt 0643	CTCTATCG	P5 Jen 8nt 0789	TGGACTAT	AGJ001.A0101
P7 Jen 8nt 0632	CCGAATTG	P5 Jen 8nt 0360	GCGCCTCA	ADJ001.A0101
P7 Jen 8nt 0670	GTAATTAT	P5 Jen 8nt 0310	ACGTCTGG	SHS004.A0101
P7 Jen 8nt 0685	TCGGTCAT	P5 Jen 8nt 0364	GGATCGAG	UCH004.A0101
P7 Jen 8nt 0622	ATAGTCAA	P5 Jen 8nt 0766	GGCAGGCC	CHB003.A0101
P7 Jen 8nt 0657	GATCTTCC	P5 Jen 8nt 0314	AGAAGGTA	UCH003.A0101
P7 Jen 8nt 0639	CGTAGATC	P5 Jen 8nt 0386	TCTGATAA	CHB001.A0101
P7 Jen 8nt 0273	GTCGCCTT	P5 Jen 8nt 0717	AGGCCTTG	AKC002.A0101
P7 Jen 8nt 0280	TCAACTTG	P5 Jen 8nt 0737	CGCCTTGC	AML007.A0101
P7 Jen 8nt 0215	ACTTAACG	P5 Jen 8nt 0709	ACTGCCTC	BTH004.A0101
P7 Jen 8nt 0252	GCAATGAG	P5 Jen 8nt 0711	AGACTACC	AML014.A0101
P7 Jen 8nt 0258	GCTACGTA	P5 Jen 8nt 0392	TGGTCTCA	AML006.A0101
P7 Jen 8nt 0673	GTATACCA	P5 Jen 8nt 0399	TTGGCGAC	BTH003.A0101
P7 Jen 8nt 0229	CCAATACC	P5 Jen 8nt 0728	CCAACCGC	AML013.A0101
P7 Jen 8nt 0224	ATTGATTA	P5 Jen 8nt 0760	GCGTCAGC	AML005.A0101
P7 Jen 8nt 0233	CGCCGACC	P5 Jen 8nt 0398	TTGATAAT	BTH002.A0101
P7 Jen 8nt 0234	CGGAGACT	P5 Jen 8nt 0361	GCGGTAGA	AML012.A0101
P7 Jen 8nt 0626	ATGGTACT	P5 Jen 8nt 0707	ACCGCGTT	AML004.A0101
P7 Jen 8nt 0299	TTGCGCGC	P5 Jen 8nt 0704	AAGTTGGA	BTH001.A0101
P7 Jen 8nt 0650	GACGGATT	P5 Jen 8nt 0746	CTGGACGA	AML011.A0101
P7 Jen 8nt 0638	CGGAAGAG	P5 Jen 8nt 0387	TGCGACTG	AML002.A0101
P7 Jen 8nt 0660	GCAGGAGG	P5 Jen 8nt 0741	CGTACGCC	ISK001.A0101
P7 Jen 8nt 0293	TGCTCTTC	P5 Jen 8nt 0792	TTACTCCT	AML010.A0101
P7 Jen 8nt 0692	TTAACCAA	P5 Jen 8nt 0359	GCCTGGAC	AML003.A0101
P7 Jen 8nt 0689	TGATCTCA	P5 Jen 8nt 0780	TATGCTTA	AML009.A0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0640	CGTCATAA	P5_Jen_8nt_0346	CTCATAGC	KNL003.A0101
P7_Jen_8nt_0232	CCTCCTTG	P5_Jen_8nt_0318	ATAGACTT	AML001.A0101
P7_Jen_8nt_0603	ACCATCAA	P5_Jen_8nt_0328	CAGACCGA	AML008.A0101
P7_Jen_8nt_0238	CGTTAATG	P5_Jen_8nt_0700	AAGAGCTC	BTH005.A0101
P7_Jen_8nt_0624	ATCTACGG	P5_Jen_8nt_0755	GATTGACC	KNL020.A0101
P7_Jen_8nt_0690	TGCTAACG	P5_Jen_8nt_0344	CTAATTGG	KNL029.A0101
P7_Jen_8nt_0651	GAGATTGC	P5_Jen_8nt_0391	TGGCGCGT	SMV001.A0101
P7_Jen_8nt_0682	TCCTCAAT	P5_Jen_8nt_0397	TTGACTTC	KNL019.A0101
P7_Jen_8nt_0606	ACGCTGCA	P5_Jen_8nt_0716	AGCTTACG	KNL002.A0101
P7_Jen_8nt_0251	GAAC TAAG	P5_Jen_8nt_0759	GCGGCCTG	PRR004.A0101
P7_Jen_8nt_0230	CCAATGGA	P5_Jen_8nt_0339	CGAACCTT	KNL012.A0101
P7_Jen_8nt_0612	AGAAGCAT	P5_Jen_8nt_0355	GATCTGGT	KNL001.A0101
P7_Jen_8nt_0281	TCAGATTC	P5_Jen_8nt_0793	TTATACGA	PRR003.A0101
P7_Jen_8nt_0618	AGGCTCTA	P5_Jen_8nt_0303	AACGCGCA	KNL011.A0101
P7_Jen_8nt_0268	GGTCGCTT	P5_Jen_8nt_0326	CAACGCAG	KNL025.A0101
P7_Jen_8nt_0665	GGAAC TTC	P5_Jen_8nt_0335	CCTGAGCT	PRR002.A0101
P7_Jen_8nt_0672	GTAGAAGT	P5_Jen_8nt_0743	CTCCTGAT	KNL010.A0101
P7_Jen_8nt_0664	GGAACGGT	P5_Jen_8nt_0325	CAACCTTC	KNL024.A0101
P7_Jen_8nt_0247	CTTGAGTC	P5_Jen_8nt_0754	GATCGCTC	PRR001.A0101
P7_Jen_8nt_0207	AACTGATA	P5_Jen_8nt_0777	TAGGCATG	KNL009.A0101
P7_Jen_8nt_0267	GGTCCTAG	P5_Jen_8nt_0396	TTCTTGGC	KNL023.A0101
P7_Jen_8nt_0649	GACCGGAG	P5_Jen_8nt_0312	AGAACGAC	KNL006.A0101
P7_Jen_8nt_0202	AACGCCAT	P5_Jen_8nt_0785	TCCTTAGA	KNL022.A0101
P7_Jen_8nt_0240	CTAGTTGC	P5_Jen_8nt_0727	CATGATGC	KNL004.A0101
P7_Jen_8nt_0223	ATGCTTAG	P5_Jen_8nt_0357	GCAAGTCA	SMV002.A0101
P7_Jen_8nt_0220	ATAACCTT	P5_Jen_8nt_0708	ACTGACGA	BRE013.B0101
P7_Jen_8nt_0257	GCGACCTG	P5_Jen_8nt_0362	GCTGATCG	ESZ001.B0101
P7_Jen_8nt_0662	GCGCTCTT	P5_Jen_8nt_0739	CGGTAAGA	BRE012.B0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0668	GGCAGGAC	P5_Jen_8nt_0388	TGCGTTAG	BRE004.B0101
P7_Jen_8nt_0287	TCGGAACG	P5_Jen_8nt_0749	GAGACTGC	KNL028.A0101
P7_Jen_8nt_0600	AAGGTTCA	P5_Jen_8nt_0735	CGCAAGAC	BRE003.B0101
P7_Jen_8nt_0269	GGTCGGCG	P5_Jen_8nt_0320	ATGATCTG	KNL027.A0101
P7_Jen_8nt_0227	CAATAATA	P5_Jen_8nt_0395	TTCGTACG	BRE002.B0101
P7_Jen_8nt_0680	TCAATGCT	P5_Jen_8nt_0767	GGCAGTAT	KNL026.A0101
P7_Jen_8nt_0624	ATCTACGG	P5_Jen_8nt_0366	GGATTGGC	KUS001.A0101
P7_Jen_8nt_0619	AGTTATGC	P5_Jen_8nt_0336	CCTGCTCC	KUS001.A0102
P7_Jen_8nt_0670	GTAATTAT	P5_Jen_8nt_0788	TGCCAATT	BSK001.A0101
P7_Jen_8nt_0623	ATCAAGCA	P5_Jen_8nt_0723	ATTCCTTC	BSK001.A0102
P7_Jen_8nt_0653	GAGCTAGT	P5_Jen_8nt_0784	TCCGCTCT	BSK003.A0101
P7_Jen_8nt_0660	GCAGGAGG	P5_Jen_8nt_0753	GAGTCGAA	BSK003.A0102
P7_Jen_8nt_0694	TTATCGTC	P5_Jen_8nt_0377	TACTGCAT	KZL002.A0101
P7_Jen_8nt_0686	TCTCCGTC	P5_Jen_8nt_0716	AGCTTACG	KZL002.A0102
P7_Jen_8nt_0251	GAACTAAG	P5_Jen_8nt_0316	AGTTACCA	KNL015.A0101
P7_Jen_8nt_0634	CCTCCGGT	P5_Jen_8nt_0308	ACCAGCGA	KNL015.A0102
P7_Jen_8nt_0621	ATAGCTTG	P5_Jen_8nt_0729	CCAGATCA	KNL016.A0101
P7_Jen_8nt_0657	GATCTTCC	P5_Jen_8nt_0390	TGGCCGGC	KNL016.A0102
P7_Jen_8nt_0605	ACGAGGAA	P5_Jen_8nt_0794	TTCAATAT	KNL032.A0101
P7_Jen_8nt_0659	GATGCGCT	P5_Jen_8nt_0302	AACGCCAT	KNL032.A0102
P7_Jen_8nt_0677	TACTTATC	P5_Jen_8nt_0364	GGATCGAG	KUS002.A0101
P7_Jen_8nt_0227	CAATAATA	P5_Jen_8nt_0791	TTACCGCC	KUS003.A0101
P7_Jen_8nt_0278	TATATTGA	P5_Jen_8nt_0774	TACTACGG	KUS004.A0101
P7_Jen_8nt_0601	AATAATCC	P5_Jen_8nt_0772	GTCCGAAT	KUS005.A0101
P7_Jen_8nt_0661	GCCTATAC	P5_Jen_8nt_0322	ATGGCAGT	KUS006.A0101
P7_Jen_8nt_0671	GTACCGAG	P5_Jen_8nt_0318	ATAGACTT	KUS007.A0101
P7_Jen_8nt_0279	TATCGGCT	P5_Jen_8nt_0730	CCATTGAG	KUS008.A0101
P7_Jen_8nt_0600	AAGGTTCA	P5_Jen_8nt_0339	CGAACCTT	KUS013.A0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0241	СТАТТКАТ	P5_Jen_8nt_0331	CCAAGAGA	CSP003.A0101
P7_Jen_8nt_0280	ТКААКТТГ	P5_Jen_8nt_0330	КАТТАГКА	CSP004.A0101
P7_Jen_8nt_0638	СГГААГАГ	P5_Jen_8nt_0360	СГССТКА	CSP005.A0101
P7_Jen_8nt_0693	ТТАГГАТГ	P5_Jen_8nt_0731	ССТАТАТГ	AIG001.A0101
P7_Jen_8nt_0635	ССТТКАГГ	P5_Jen_8nt_0754	ГАТСГСТС	AIG002.A0101
P7_Jen_8nt_0296	ТТСГТСГГ	P5_Jen_8nt_0371	ГТАГААГС	AIG003.A0101
P7_Jen_8nt_0255	ССТТААСТ	P5_Jen_8nt_0775	ТАГСТГАТ	AIG004.A0101
P7_Jen_8nt_0243	СТГАГТТС	P5_Jen_8nt_0386	ТСТГАТАА	AIG005.A0101
P7_Jen_8nt_0283	ТССГТАТА	P5_Jen_8nt_0766	СГСАГССТ	AIG006.A0101
P7_Jen_8nt_0628	САГАССТТ	P5_Jen_8nt_0737	СГССТТГС	SRO001.A0101
P7_Jen_8nt_0690	ТГСТААСГ	P5_Jen_8nt_0385	ТСТАГАГГ	WAR001.B0101
P7_Jen_8nt_0288	ТСГТСГССТ	P5_Jen_8nt_0320	АТГАТСТГ	BRE016.A0101
P7_Jen_8nt_0689	ТГАТСТКА	P5_Jen_8nt_0376	ТААСГСТТ	BRE017.A0101
P7_Jen_8nt_0641	СТСАГТСТ	P5_Jen_8nt_0326	СААСГСАГ	BRE018.A0101
P7_Jen_8nt_0626	АТГГТАСТ	P5_Jen_8nt_0789	ТГГАСТАТ	BRE019.A0101
P7_Jen_8nt_0604	АССГТТГА	P5_Jen_8nt_0722	АТТААТАГ	BRE020.A0101
P7_Jen_8nt_0615	АГАТСГСА	P5_Jen_8nt_0714	АСССГАГГ	BRE021.A0101
P7_Jen_8nt_0223	АТГСТТАГ	P5_Jen_8nt_0707	АСССГСТТ	BRE022.A0101
P7_Jen_8nt_0654	ГАГСАССТ	P5_Jen_8nt_0746	СТГСАСГА	BRE026.A0101
P7_Jen_8nt_0683	ТСГААТАА	P5_Jen_8nt_0767	СГСАГТАТ	BRE027.A0101
P7_Jen_8nt_0215	АСТТААСГ	P5_Jen_8nt_0384	ТСГСТТСС	BRE028.A0101
P7_Jen_8nt_0258	ССТАСГТА	P5_Jen_8nt_0747	СТТААГАА	BSB001.A0101
P7_Jen_8nt_0629	САТААСГТ	P5_Jen_8nt_0353	ГАГСААГГ	BSB002.A0101
P7_Jen_8nt_0627	САГААТАТ	P5_Jen_8nt_0375	ГТТСГСАГ	BSB003.A0101
P7_Jen_8nt_0235	СГГСАТТС	P5_Jen_8nt_0725	САГСТТГГ	BSB004.A0101
P7_Jen_8nt_0639	СГТАГАТС	P5_Jen_8nt_0315	АГТСАГТС	KBU001.A0101
P7_Jen_8nt_0678	ТАГТАГАГ	P5_Jen_8nt_0702	ААГГТТКА	KBU002.A0101
P7_Jen_8nt_0622	АТАГТКАА	P5_Jen_8nt_0709	АСТССТС	KBU003.A0101

Продолжение таблицы Приложения Б

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0606	ACGCTGCA	P5_Jen_8nt_0763	GCTCGACT	ZHR002.A0101
P7_Jen_8nt_0240	CTAGTTGC	P5_Jen_8nt_0700	AAGAGCTC	ZHR003.A0101
P7_Jen_8nt_0225	CAACCTCT	P5_Jen_8nt_0721	ATCAGTTG	AKB002.A0101
P7_Jen_8nt_0224	ATTGATTA	P5_Jen_8nt_0704	AAGTTGGA	AKB003.A0101
P7_Jen_8nt_0602	AATCCTCA	P5_Jen_8nt_0777	TAGGCATG	BKB001.A0101
P7_Jen_8nt_0250	GAACGTAT	P5_Jen_8nt_0332	CCAATGGT	BKB002.A0101
P7_Jen_8nt_0636	CGCCTATG	P5_Jen_8nt_0324	ATTGGATG	BKB003.A0101
P7_Jen_8nt_0662	GCGCTCTT	P5_Jen_8nt_0338	CCTTAACC	BKB004.A0101
P7_Jen_8nt_0612	AGAAGCAT	P5_Jen_8nt_0758	GCATTCTT	CPA001.A0101
P7_Jen_8nt_0685	TCGGTCAT	P5_Jen_8nt_0328	CAGACCGA	CPA002.A0101
P7_Jen_8nt_0684	TCGATATT	P5_Jen_8nt_0323	ATGGCCTA	KZL001.A0101
P7_Jen_8nt_0238	CGTTAATG	P5_Jen_8nt_0769	GTAACGAA	KZL003.A0101
P7_Jen_8nt_0245	CTGCTGAA	P5_Jen_8nt_0771	GTAGCAAT	KZL004.A0101
P7_Jen_8nt_0246	CTTCTAGC	P5_Jen_8nt_0356	GATGCAGT	KZL005.A0101
P7_Jen_8nt_0676	TACCGCAT	P5_Jen_8nt_0333	CCAGACTC	NUR003.A0101
P7_Jen_8nt_0269	GGTCGGCG	P5_Jen_8nt_0719	AGTTGCGC	NUR004.A0101
P7_Jen_8nt_0688	TGAGAGGA	P5_Jen_8nt_0782	TCATATTA	CSP002.A0101
P7_Jen_8nt_0650	GACGGATT	P5_Jen_8nt_0349	CTTCATGG	KLK002.A0101
P7_Jen_8nt_0286	TCGCGGAT	P5_Jen_8nt_0735	CGCAAGAC	CSP001.A0101
P7_Jen_8nt_0623	ATCAAGCA	P5_Jen_8nt_0732	CCTTCCGA	KNL037.A0101
P7_Jen_8nt_0274	GTTCAATA	P5_Jen_8nt_0341	CGCGGTCA	BRE011.B0101
P7_Jen_8nt_0614	AGACGATG	P5_Jen_8nt_0363	GCTTCCAG	KNL036.A0101
P7_Jen_8nt_0676	TACCGCAT	P5_Jen_8nt_0758	GCATTCTT	BRE008.B0101
P7_Jen_8nt_0241	CTATTCAT	P5_Jen_8nt_0702	AAGGTTC A	KNL030.A0101
P7_Jen_8nt_0693	TTAGGATG	P5_Jen_8nt_0311	ACTCCTCT	BRE006.B0101
P7_Jen_8nt_0298	TTGATCCA	P5_Jen_8nt_0343	CGTTAATT	KLK001.A0101

Пары праймеров для индексирования отрицательных контролей

P7 primer ID	P7 sequence	P5 primer ID	P5 sequence	Отрицательные контроли
1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0478	TCCGCTCG	P5_Jen_8nt_0530	CATAGCGG	LIB052.A0114
P7_Jen_8nt_0413	AGACTCGT	P5_Jen_8nt_0503	AAGACTTA	LIB052.A0115
P7_Jen_8nt_0465	GGCTCTCT	P5_Jen_8nt_0564	GGCGCCAG	LIB052.A0116
P7_Jen_8nt_0460	GCCAGGTT	P5_Jen_8nt_0523	ATTCTAGC	LIB052.A0117
P7_Jen_8nt_0416	AGGTCGAA	P5_Jen_8nt_0522	ATGGTCCT	LIB052.A0118
P7_Jen_8nt_0489	TGCCTCTC	P5_Jen_8nt_0540	CGCTGACT	LIB052.A0119
P7_Jen_8nt_0427	CAACTGCA	P5_Jen_8nt_0573	TAATTCCA	LIB052.A0120
P7_Jen_8nt_0483	TCTAGAGG	P5_Jen_8nt_0558	GCGCGTTC	LIB052.A0121
P7_Jen_8nt_0433	CGAATATT	P5_Jen_8nt_0561	GGAGACCG	LIB052.A0122
P7_Jen_8nt_0402	AAGCAGGT	P5_Jen_8nt_0534	CCGTTTCA	LIB052.A0123
P7_Jen_8nt_0423	ATTATCGA	P5_Jen_8nt_0581	TCCGATGG	LIB052.A0124
P7_Jen_8nt_0482	TCGTTTCA	P5_Jen_8nt_0568	GTCCAATC	LIB052.A0125
P7_Jen_8nt_0407	ACCAATTA	P5_Jen_8nt_0584	TCGTAATG	LIB052.A0126
P7_Jen_8nt_0451	GACTATTG	P5_Jen_8nt_0583	TCGAAGGT	LIB052.A0127
P7_Jen_8nt_0432	CGAAGCTG	P5_Jen_8nt_0571	GTAACTA	LIB052.A0128
P7_Jen_8nt_0436	CGCAACGG	P5_Jen_8nt_0566	GTAGGTCT	LIB052.A0129
P7_Jen_8nt_0467	GGTCAACC	P5_Jen_8nt_0562	GGAGGATG	LIB052.A0130
P7_Jen_8nt_0441	CTCGAGGT	P5_Jen_8nt_0570	GTCTCTAT	LIB052.A0131
P7_Jen_8nt_0415	AGGCCTTG	P5_Jen_8nt_0589	TGACTGGA	EXB062.A0501
P7_Jen_8nt_0439	CTAGGAGA	P5_Jen_8nt_0559	GCTAATGA	EXB062.A0601
P7_Jen_8nt_0482	TCGTTTCA	P5_Jen_8nt_0548	CTTAGTCT	EXB062.A1301
P7_Jen_8nt_0463	GCTTCTCC	P5_Jen_8nt_0506	ACCGAGCC	EXB062.A2701
P7_Jen_8nt_0491	TGGCCATC	P5_Jen_8nt_0504	AAGGATTC	EXB062.A2901
P7_Jen_8nt_0435	CGATTAGC	P5_Jen_8nt_0544	CTCTTGCA	EXB062.A3101

Продолжение таблицы Приложения В

1	2	3	4	5
P7 Jen 8nt 0466	GGTACCAA	P5 Jen 8nt 0539	CGCGAGCG	EXB062.A3201
P7 Jen 8nt 0417	AGGTTATG	P5 Jen 8nt 0507	ACGACCTT	LIB052.A0101
P7 Jen 8nt 0454	GATGAATG	P5 Jen 8nt 0520	ATATCATG	LIB052.A0102
P7 Jen 8nt 0443	CTCTGGCC	P5 Jen 8nt 0581	TCCGATGG	LIB052.A0103
P7 Jen 8nt 0487	TGACGAAC	P5 Jen 8nt 0534	CCGTTTTCAT	LIB052.A0104
P7 Jen 8nt 0495	TTGCATAT	P5 Jen 8nt 0564	GGCGCCAG	LIB052.A0105
P7 Jen 8nt 0464	GGAGGCTC	P5 Jen 8nt 0515	AGTCGTTA	LIB052.A0106
P7 Jen 8nt 0431	CCTGAACT	P5 Jen 8nt 0521	ATATTGCG	EXB062.A3501
P7 Jen 8nt 0411	ACTATATA	P5 Jen 8nt 0511	AGACGTCG	LIB052.A0107

Приложение Г

Результат теста на ингибирование

№	Позиция	Название образца	Дата проведения	Cq	ΔCq
1	2	3	4	5	6
1	A5	BIR008.A01	03.04.2019 (1)	18,04	-1,955
2	B5	BIR007.A01	03.04.2019 (1)	18,51	-1,485
3	C5	BIR006.A01	03.04.2019 (1)	18,8	-1,195
4	D5	BIR005.A01	03.04.2019 (1)	18,35	-1,645
5	E5	BIR004.A01	03.04.2019 (1)	18,35	-1,645
6	F5	BIR003.A01	03.04.2019 (1)	18,9	-1,095
7	G5	BIR002.A01	03.04.2019 (1)	18,46	-1,535
8	H5	BIR001.A01	03.04.2019 (1)	18,92	-1,075
9	A6	NUR005.A01	03.04.2019 (1)	18,32	-1,675
10	B6	NUR004.A01	03.04.2019 (1)	18,17	-1,825
11	C6	NUR003.A01	03.04.2019 (1)	18,11	-1,885
12	D6	BIR013.A01	03.04.2019 (1)	18,87	-1,125
13	E6	BIR012.A01	03.04.2019 (1)	18,25	-1,745
14	F6	BIR011.A01	03.04.2019 (1)	18,6	-1,395
15	G6	BIR010.A01	03.04.2019 (1)		
16	H6	BIR009.A01	03.04.2019 (1)	18,27	-1,725
17	A5	NZR001.A01	04.04.2019 (2)	18,81	-1,63
18	B5	NZR002.A01	04.04.2019 (2)	19,16	-1,28
19	C5	BDY003.A01	04.04.2019 (2)	18,91	-1,53
20	D5	KBO001.A01	04.04.2019 (2)	18,85	-1,59
21	E5	KTS001.A01	04.04.2019 (2)	19,23	-1,21
22	F5	KZL001.A01	04.04.2019 (2)	18,78	-1,66
23	G5	KZL002.A01	04.04.2019 (2)	18,97	-1,47
24	H5	KZL003.A01	04.04.2019 (2)	18,85	-1,59
25	A6	KZL004.A01	04.04.2019 (2)	18,91	-1,53
26	B6	KZL005.A01	04.04.2019 (2)	18,99	-1,45
27	C6	KZB001.A01	04.04.2019 (2)	19,06	-1,38
28	D6	KZK001.A01	04.04.2019 (2)	18,64	-1,8
29	E6	BDY002.A01	04.04.2019 (2)	18,74	-1,7
30	F6	CPA001.A01	04.04.2019 (2)	19,94	-0,5
31	G6	CPA002.A01	04.04.2019 (2)	18,83	-1,61
32	H6	AKE001.A01	04.04.2019 (2)	18,53	-1,91
33	A5	SRK002.A01	04.04.2019 (3)	18,42	-1,9425
34	B5	SRK003.A01	04.04.2019 (3)	18,85	-1,5125
35	C5	SRK004.A01	04.04.2019 (3)	18,47	-1,8925
36	D5	SRK005.A01	04.04.2019 (3)	18,75	-1,6125
37	E5	ASU001.A01	04.04.2019 (3)	18,87	-1,4925
38	F5	ASU002.A01	04.04.2019 (3)	18,94	-1,4225
39	G5	SBT001.A01	04.04.2019 (3)	18,72	-1,6425
40	H5	TND001.A01	04.04.2019 (3)	18,42	-1,9425
41	A6	CSP001.A01	04.04.2019 (3)	18,48	-1,8825
42	B6	CSP002.A01	04.04.2019 (3)	18,73	-1,6325
43	C6	CSP003.A01	04.04.2019 (3)	18,58	-1,7825
44	D6	CSP004.A01	04.04.2019 (3)	18,72	-1,6425
45	E6	CSP005.A01	04.04.2019 (3)	18,57	-1,7925
46	F6	AIG001.A01	04.04.2019 (3)	18,79	-1,5725
47	G6	AIG002.A01	04.04.2019 (3)	18,31	-2,0525
48	H6	AIG003.A01	04.04.2019 (3)	18,47	-1,8925
49	A7	AIG004.A01	04.04.2019 (3)	18,56	-1,8025
50	B7	AIG005.A01	04.04.2019 (3)	18,85	-1,5125
51	C7	AIG006.A01	04.04.2019 (3)	18,82	-1,5425
52	D7	AKU001.A01	04.04.2019 (3)	18,48	-1,8825
53	E7	AKU002.A01	04.04.2019 (3)	18,72	-1,6425
54	F7	AKU003.A01	04.04.2019 (3)	18,8	-1,5625

Продолжение Приложения Г

1	2	3	4	5	6
55	G7	BRO001.A01	04.04.2019 (3)	18,09	-2,2725
56	H7	GTK001.A01	04.04.2019 (3)	18,49	-1,8725
57	A8	AKT001.A01	04.04.2019 (3)	18,73	-1,6325
58	B8	AKR001.A01	04.04.2019 (3)	20,41	0,0475
59	C8	KLK001.A01	04.04.2019 (3)	18,48	-1,8825
60	D8	KLK002.A01	04.04.2019 (3)	18,84	-1,5225
61	E8	AKO001.A01	04.04.2019 (3)	18,77	-1,5925
62	F8	SMY001.A01	04.04.2019 (3)	18,5	-1,8625
63	G8	SMY002.A01	04.04.2019 (3)	18,67	-1,6925
64	H8	SMY003.A01	04.04.2019 (3)	18,13	-2,2325
65	A5	SMY004.A01	04.04.2019 (4)	19,04	-1,2675
66	B5	SMY005.A01	04.04.2019 (4)	18,78	-1,5275
67	C5	SMY006.A01	04.04.2019 (4)	18,77	-1,5375
68	D5	SMY007.A01	04.04.2019 (4)	18,83	-1,4775
69	E5	SMY008.A01	04.04.2019 (4)	18,89	-1,4175
70	F5	SMY009.A01	04.04.2019 (4)	18,75	-1,5575
71	G5	SMY010.A01	04.04.2019 (4)	18,72	-1,5875
72	H5	POS002.D03	04.04.2019 (4)	19,04	-1,2675
73	A6	KUS001.A01	04.04.2019 (4)	20,17	-0,1375
74	B6	KUS002.A01	04.04.2019 (4)	19	-1,3075
75	C6	KUS003.A01	04.04.2019 (4)	18,65	-1,6575
76	D6	KUS004.A01	04.04.2019 (4)	18,34	-1,9675
77	E6	KUS005.A01	04.04.2019 (4)	18,6	-1,7075
78	F6	KUS006.A01	04.04.2019 (4)	18,87	-1,4375
79	G6	KUS007.A01	04.04.2019 (4)	19,06	-1,2475
80	H6	KUS008.A01	04.04.2019 (4)	18,74	-1,5675
81	A7	KUS009.A01	04.04.2019 (4)	18,71	-1,5975
82	B7	KUS010.A01	04.04.2019 (4)	19,18	-1,1275
83	C7	KUS011.A01	04.04.2019 (4)	19,15	-1,1575
84	D7	KUS012.A01	04.04.2019 (4)	19,6	-0,7075
85	E7	KUS013.A01	04.04.2019 (4)	18,79	-1,5175
86	F7	KUS014.A01	04.04.2019 (4)	18,94	-1,3675
87	G7	KUS015.A01	04.04.2019 (4)	19,28	-1,0275
88	H7	KUS016.A01	04.04.2019 (4)	19,33	-0,9775
89	A8	KYY001.A01	04.04.2019 (4)	18,75	-1,5575
90	B8	KYY002.A01	04.04.2019 (4)	19,65	-0,6575
91	C8	KBU001.A01	04.04.2019 (4)	18,83	-1,4775
92	D8	KBU002.A01	04.04.2019 (4)	19,1	-1,2075
93	E8	KBU003.A01	04.04.2019 (4)	18,69	-1,6175
94	F8	BRE001.A01	04.04.2019 (4)	18,28	-2,0275
95	G8	BRE002.A01	04.04.2019 (4)	18,37	-1,9375
96	H8	BRE003.A01	04.04.2019 (4)	18,01	-2,2975
97	A5	BRE016.A01	05.04.2019 (5)	19,05	-1,255
98	B5	BRE022.A01	05.04.2019 (5)	19,03	-1,275
99	C5	BRE019.A01	05.04.2019 (5)	19,03	-1,275
100	D5	BRE021.A01	05.04.2019 (5)	18,92	-1,385
101	E5	BRE020.A01	05.04.2019 (5)	19,27	-1,035
102	F5	BRE025.A01	05.04.2019 (5)	19,12	-1,185
103	G5	BRE024.A01	05.04.2019 (5)	19,46	-0,845
104	H5	BRE023.A01	05.04.2019 (5)	19,22	-1,085
105	A6	BRE017.A01	05.04.2019 (5)	18,95	-1,355
106	B6	BRE018.A01	05.04.2019 (5)	18,86	-1,445
107	C6	BSB001.A01	05.04.2019 (5)	18,97	-1,335
108	D6	BSB002.A01	05.04.2019 (5)	19,23	-1,075
109	E6	BSB003.A01	05.04.2019 (5)	19,16	-1,145
110	F6	BSB004.A01	05.04.2019 (5)	19,4	-0,905
111	G6	MER001.A01	05.04.2019 (5)	18,95	-1,355
112	H6	MER002.A01	05.04.2019 (5)	18,86	-1,445
113	A7	SRO001.A01	05.04.2019 (5)	18,82	-1,485
114	B7	MMR001.A01	05.04.2019 (5)	18,88	-1,425
115	C7	NUL001.A01	05.04.2019 (5)	19,43	-0,875
116	D7	NUL002.A01	05.04.2019 (5)	19,5	-0,805

Продолжение Приложения Г

1	2	3	4	5	6
117	E7	TRG001.A01	05.04.2019 (5)	19,13	-1,175
118	F7	TRG002.A01	05.04.2019 (5)	19,77	-0,535
119	G7	TRG003.A01	05.04.2019 (5)	18,93	-1,375
120	H7	KLR001.A01	05.04.2019 (5)	19,1	-1,205
121	A8	ILI001.A01	05.04.2019 (5)	18,95	-1,355
122	B8	KSK001.A01	05.04.2019 (5)	19,22	-1,085
123	C8	KRL001.A01	05.04.2019 (5)	18,88	-1,425
124	D8	KSK002.A01	05.04.2019 (5)	19,05	-1,255
125	E8	NTK001.A01	05.04.2019 (5)	19,16	-1,145
126	F8	ZHR001.A01	05.04.2019 (5)	18,77	-1,535
127	G8	ZHR003.A01	05.04.2019 (5)	19,32	-0,985
128	H8	ZHR002.A01	05.04.2019 (5)	19,2	-1,105
129	A9	BKB002.A01	05.04.2019 (5)	19,4	-0,905
130	B9	BKB001.A01	05.04.2019 (5)	19,37	-0,935
131	C9	BKB003.A01	05.04.2019 (5)	19,15	-1,155
132	D9	BKB004.A01	05.04.2019 (5)	19,08	-1,225
133	E9	KRM001.A01	05.04.2019 (5)	19,81	-0,495
134	F9	AKB002.A01	05.04.2019 (5)	19,9	-0,405
135	G9	AKB003.A01	05.04.2019 (5)	19,69	-0,615
136	H9	POS002.D06	05.04.2019 (5)	19,25	-1,055
137	A5	UCH001.A01	06.04.2019 (6)	19,35	-0,2025
138	B5	UCH002.A01	06.04.2019 (6)	19,19	-0,3625
139	C5	UCH003.A01	06.04.2019 (6)	18,61	-0,9425
140	D5	UCH004.A01	06.04.2019 (6)	19,04	-0,5125
141	E5	CHB001.A01	06.04.2019 (6)	18,84	-0,7125
142	F5	CHB002.A01	06.04.2019 (6)	18,73	-0,8225
143	G5	CHB003.A01	06.04.2019 (6)	18,34	-1,2125
144	H5	KRV001.A01	06.04.2019 (6)	18,5	-1,0525
145	A6	SHS001.A01	06.04.2019 (6)	18,51	-1,0425
146	B6	SHS002.A01	06.04.2019 (6)	18,15	-1,4025
147	C6	SHS004.A01	06.04.2019 (6)	18,94	-0,6125
148	D6	SHS003.A01	06.04.2019 (6)	18,7	-0,8525
149	E6	BTH001.A01	06.04.2019 (6)	18,62	-0,9325
150	F6	BTH002.A01	06.04.2019 (6)	17,33	-2,2225
151	G6	BTH003.A01	06.04.2019 (6)	18,37	-1,1825
152	H6	BTH004.A01	06.04.2019 (6)	18,81	-0,7425
153	A7	BTH005.A01	06.04.2019 (6)	18,85	-0,7025
154	B7	ISK001.A01	06.04.2019 (6)	18,55	-1,0025
155	C7	ADJ001.A01	06.04.2019 (6)	18,84	-0,7125
156	D7	ADJ002.A01	06.04.2019 (6)	19,07	-0,4825
157	E7	ADJ003.A01	06.04.2019 (6)	19,26	-0,2925
158	F7	ADJ004.A01	06.04.2019 (6)	18,73	-0,8225
159	G7	ADJ005.A01	06.04.2019 (6)	18,64	-0,9125
160	H7	ADJ006.A01	06.04.2019 (6)	18,74	-0,8125
161	A8	ADJ007.A01	06.04.2019 (6)	18,82	-0,7325
162	B8	ADJ008.A01	06.04.2019 (6)	19,17	-0,3825
163	C8	ADJ009.A01	06.04.2019 (6)	19,36	-0,1925
164	D8	ADJ010.A01	06.04.2019 (6)	18,59	-0,9625
165	E8	ADJ011.A01	06.04.2019 (6)	18,79	-0,7625
166	F8	ADJ012.A01	06.04.2019 (6)	18,69	-0,8625
167	G8	ADJ013.A01	06.04.2019 (6)	18,68	-0,8725
168	H8	PRR001.A01	06.04.2019 (6)	18,77	-0,7825
169	A9	PRR002.A01	06.04.2019 (6)	18,6	-0,9525
170	B9	PRR003.A01	06.04.2019 (6)	18,74	-0,8125
171	C9	PRR004.A01	06.04.2019 (6)	17,21	-2,3425
172	D9	VOR001.A01	06.04.2019 (6)	18,55	-1,0025
173	E9	VOR002.A01	06.04.2019 (6)	18,04	-1,5125
174	F9	VOR003.A01	06.04.2019 (6)	18,52	-1,0325
175	G9	VOR004.A01	06.04.2019 (6)	18,48	-1,0725
176	H9	BRV001.A01	06.04.2019 (6)	18,53	-1,0225
177	A5	ALN001.A01	07.04.2019 (7)	19,43	-1,1875
178	B5	ALN002.A01	07.04.2019 (7)	19,46	-0,845

Продолжение Приложения Г

1	2	3	4	5	6
179	C5	ALN003.A01	07.04.2019 (7)	19,36	-0,945
180	D5	ALN004.A01	07.04.2019 (7)	19,02	-1,285
181	E5	ALN005.A01	07.04.2019 (7)	19,5	-0,805
182	F5	ALN006.A01	07.04.2019 (7)	19,67	-0,635
183	G5	ALN007.A01	07.04.2019 (7)	19,22	-1,085
184	H5	ALN008.A01	07.04.2019 (7)	19,22	-1,085
185	A6	ALN009.A01	07.04.2019 (7)	19,31	-0,995
186	B6	ALN010.A01	07.04.2019 (7)	19,38	-0,925
187	C6	CLK001.A01	07.04.2019 (7)	19,27	-1,035
188	D6	CLK002.A01	07.04.2019 (7)	19,24	-1,065
189	E6	CHK001.A01	07.04.2019 (7)	19,4	-0,905
190	F6	CHK002.A01	07.04.2019 (7)	19,46	-0,845
191	G6	CHK003.A01	07.04.2019 (7)	19,2	-1,105
192	H6	CHK004.A01	07.04.2019 (7)	19,15	-1,155
193	A7	CHK005.A01	07.04.2019 (7)	19,6	-0,705
194	B7	KEN001.A01	07.04.2019 (7)	19,41	-0,895
195	C7	KEN002.A01	07.04.2019 (7)	19,05	-1,255
196	D7	KEN003.A01	07.04.2019 (7)	19,34	-0,965
197	E7	AML001.A01	07.04.2019 (7)	19,83	-0,475
198	F7	AML002.A01	07.04.2019 (7)	19,59	-0,715
199	G7	AML003.A01	07.04.2019 (7)	19,55	-0,755
200	H7	AML004.A01	07.04.2019 (7)	19,47	-0,835
201	A8	AML005.A01	07.04.2019 (7)	20,18	-0,125
202	B8	AML006.A01	07.04.2019 (7)	19,2	-1,105
203	C8	AML007.A01	07.04.2019 (7)	19,7	-0,605
204	D8	AML008.A01	07.04.2019 (7)	18,92	-1,385
205	E8	AML009.A01	07.04.2019 (7)	19,32	-0,985
206	F8	AML010.A01	07.04.2019 (7)	19,13	-1,175
207	G8	AML011.A01	07.04.2019 (7)	18,95	-1,355
208	H8	AML012.A01	07.04.2019 (7)	19,11	-1,195
209	A9	TGP001.A01	07.04.2019 (7)	18,99	-1,315
210	B9	AGJ001.A01	07.04.2019 (7)	19,02	-1,285
211	C9	BIS001.A01	07.04.2019 (7)	19,16	-1,145
212	D9	BIS002.A01	07.04.2019 (7)	18,77	-1,535
213	E9	BIS003.A01	07.04.2019 (7)	18,74	-1,565
214	F9	KNL036.A01	07.04.2019 (7)	18,93	-1,375
215	G9	KNL037A01	07.04.2019 (7)	17,94	-2,365
216	A5	AML013.A01	08.04.2019 (8)	19,15	-1,42
217	B5	AML014.A01	08.04.2019 (8)	19,23	-1,075
218	C5	SMV001.A01	08.04.2019 (8)	19,24	-1,065
219	D5	SMV002.A01	08.04.2019 (8)	19,11	-1,195
220	E5	BGD001.A01	08.04.2019 (8)	18,58	-1,725
221	F5	BGD002.A01	08.04.2019 (8)	18,45	-1,855
222	G5	BGD003.A01	08.04.2019 (8)	18,86	-1,445
223	H5	BGD004.A01	08.04.2019 (8)	19,5	-0,805
224	A6	BGD005.A01	08.04.2019 (8)	19,37	-0,935
225	B6	KSZ001.A01	08.04.2019 (8)	18,97	-1,335
226	C6	KSZ002.A01	08.04.2019 (8)	18,5	-1,805
227	D6	KSZ003.A01	08.04.2019 (8)	18,81	-1,495
228	E6	KSZ004.A01	08.04.2019 (8)	18,81	-1,495
229	F6	KSZ005.A01	08.04.2019 (8)	19,64	-0,665
230	G6	KSZ006.A01	08.04.2019 (8)	19,2	-1,105
231	H6	KSZ007.A01	08.04.2019 (8)	19,17	-1,135
232	A7	AKC001.A01	08.04.2019 (8)	19,07	-1,235
233	B7	AKC002.A01	08.04.2019 (8)	19,18	-1,125
234	C7	BIY001.A01	08.04.2019 (8)	19,12	-1,185
235	D7	BIY002.A01	08.04.2019 (8)	19,17	-1,135
236	E7	BIY003.A01	08.04.2019 (8)	19,51	-0,795
237	F7	BIY004.A01	08.04.2019 (8)	21,25	0,945
238	G7	BIY005.A01	08.04.2019 (8)	18,71	-1,595
239	H7	BIY006.A01	08.04.2019 (8)	19,01	-1,295
240	A8	BIY007.A01	08.04.2019 (8)	18,9	-1,405

Продолжение Приложения Г

1	2	3	4	5	6
241	B8	BIY008.A01	08.04.2019 (8)	19,29	-1,015
242	C8	BIY009.A01	08.04.2019 (8)	19,43	-0,875
243	D8	BIY010.A01	08.04.2019 (8)	18,84	-1,465
244	E8	BIY011.A01	08.04.2019 (8)	19,2	-1,105
245	F8	BIY012.A01	08.04.2019 (8)	19,38	-0,925
246	G8	SBL001.A01	08.04.2019 (8)	19,13	-1,175
247	H8	KSH005.A01	08.04.2019 (8)	18,89	-1,415
248	A9	MBL001.A01	08.04.2019 (8)	17,69	-2,615
249	B9	BGY001.A01	08.04.2019 (8)	18,52	-1,785
250	C9	CTA001.A01	08.04.2019 (8)	18,59	-1,715
251	D9	ALH001.A01	08.04.2019 (8)	18,84	-1,465
252	E9	ALH002.A01	08.04.2019 (8)	19,29	-1,015
253	F9	DYU001.A01	08.04.2019 (8)	18,68	-1,625
254	G9	SHD001.A01	08.04.2019 (8)	19,09	-1,215
255	H9	SHD002.D06	08.04.2019 (8)	18,89	-1,415
256	A5	AKS001.A01	09.04.2019 (9)	18,64	-1,6225
257	B5	AKS002.A01	09.04.2019 (9)	18,6	-1,705
258	C5	KOK001.A01	09.04.2019 (9)	18,72	-1,585
259	D5	KOK002.A01	09.04.2019 (9)	18,99	-1,315
260	E5	KOK003.A01	09.04.2019 (9)	18,85	-1,455
261	F5	KNL022.A01	09.04.2019 (9)	18,95	-1,355
262	G5	KNL023.A01	09.04.2019 (9)	18,99	-1,315
263	H5	KNL024.A01	09.04.2019 (9)	18,56	-1,745
264	A6	KNL025.A01	09.04.2019 (9)	19,34	-0,965
265	B6	KNL026.A01	09.04.2019 (9)	18,86	-1,445
266	C6	KNL001.A01	09.04.2019 (9)	18,8	-1,505
267	D6	KNL002.A01	09.04.2019 (9)	18,98	-1,325
268	E6	KNL003.A01	09.04.2019 (9)	19,11	-1,195
269	F6	KNL004.A01	09.04.2019 (9)	18,81	-1,495
270	G6	KNL005.A01	09.04.2019 (9)	19,56	-0,745
271	H6	KNL006.A01	09.04.2019 (9)	19,22	-1,085
272	A7	KNL007.A01	09.04.2019 (9)	18,8	-1,505
273	B7	KNL008.A01	09.04.2019 (9)	19,14	-1,165
274	C7	KNL009.A01	09.04.2019 (9)	18,95	-1,355
275	D7	KNL010.A01	09.04.2019 (9)	19,05	-1,255
276	E7	KNL011.A01	09.04.2019 (9)	18,94	-1,365
277	F7	KNL012.A01	09.04.2019 (9)	18,81	-1,495
278	G7	KNL013.A01	09.04.2019 (9)	19,51	-0,795
279	H7	KNL014.A01	09.04.2019 (9)	19,06	-1,245
280	A8	KNL015.A01	09.04.2019 (9)	18,82	-1,485
281	B8	KNL016.A01	09.04.2019 (9)	18,96	-1,345
282	C8	KNL017.A01	09.04.2019 (9)	19,05	-1,255
283	D8	KNL018.A01	09.04.2019 (9)	19,22	-1,085
284	E8	KNL019.A01	09.04.2019 (9)	18,71	-1,595
285	F8	KNL020.A01	09.04.2019 (9)	19,06	-1,245
286	G8	KNL021.A01	09.04.2019 (9)	18,64	-1,665
287	H8	KNL027.A01	09.04.2019 (9)	19,08	-1,225
288	A9	KNL028.A01	09.04.2019 (9)	18,82	-1,485
289	B9	KNL029.A01	09.04.2019 (9)	19,1	-1,205
290	C9	KNL030.A01	09.04.2019 (9)	18,84	-1,465
291	D9	KNL031.A01	09.04.2019 (9)	18,67	-1,635
292	E9	KNL032.A01	09.04.2019 (9)	18,93	-1,375
293	F9	KNL033.A01	09.04.2019 (9)	18,18	-2,125
294	G9	KNL034.A01	09.04.2019 (9)	18,12	-2,185
295	H9	KNL035.A01	09.04.2019 (9)	19,16	-1,145
296	A5	BSK001.A01	10.04.2019 (10)	19,99	0,0875
297	B5	BSK002.A01	10.04.2019 (10)	19,15	-1,155
298	C5	BSK003.A01	10.04.2019 (10)	19,52	-0,785
299	D5	BSK004.A01	10.04.2019 (10)	19,29	-1,015
300	E5	BSK005.A01	10.04.2019 (10)	19,13	-1,175
301	F5	BSK006.A01	10.04.2019 (10)	19,43	-0,875
302	G5	BSK007.A01	10.04.2019 (10)	19,51	-0,795
303	H5	ESZ001.B01	10.04.2019 (10)	18,96	-1,345

Продолжение Приложения Г

1	2	3	4	5	6
304	A6	ESZ003.B01	10.04.2019 (10)	19,5	-0,805
305	B6	KKB001.B01	10.04.2019 (10)	19	-1,305
306	C6	KKB002.B01	10.04.2019 (10)	19,35	-0,955
307	D6	TAL003.B01	10.04.2019 (10)	16,42	-3,885
308	E6	TAL004.B01	10.04.2019 (10)	19,5	-0,805
309	F6	TAL005.B01	10.04.2019 (10)	19,07	-1,235
310	G6	SGZ001.B01	10.04.2019 (10)	19,24	-1,065
311	H6	SGZ002.B01	10.04.2019 (10)	19,22	-1,085
312	A7	KYZ002.B01	10.04.2019 (10)	19,34	-0,965
313	B7	BDY001.B01	10.04.2019 (10)	19,36	-0,945
314	C7	KRY001.B01	10.04.2019 (10)	18,97	-1,335
315	D7	KNT001.B01	10.04.2019 (10)	19,4	-0,905
316	E7	KNT003.B01	10.04.2019 (10)	18,96	-1,345
317	F7	KNT004.B01	10.04.2019 (10)	18,97	-1,335
318	G7	KNT005.B01	10.04.2019 (10)	19,37	-0,935
319	H7	BRE002.B01	10.04.2019 (10)	18,85	-1,455
320	A8	BRE003.B01	10.04.2019 (10)	18,21	-2,095
321	B8	BRE004.B01	10.04.2019 (10)	17,82	-2,485
322	C8	BRE006.B01	10.04.2019 (10)	18,11	-2,195
323	D8	BRE008.B01	10.04.2019 (10)	19,11	-1,195
324	E8	BRE011.B01	10.04.2019 (10)	18,54	-1,765
325	F8	BRE012.B01	10.04.2019 (10)	25,85	5,545
326	G8	BRE013.B01	10.04.2019 (10)	18,6	-1,705
327	H8	BRE014.B01	10.04.2019 (10)	19,06	-1,245
328	A9	KKM001.B01	10.04.2019 (10)	18,96	-1,345
329	B9	KSH002.B01	10.04.2019 (10)	18,09	-2,215
330	C9	KSH003.B01	10.04.2019 (10)	18,2	-2,105
331	D9	KSH004.B01	10.04.2019 (10)	18,13	-2,175
332	E9	SRK001.B01	10.04.2019 (10)	16,64	-3,665
333	F9	NUR002.B01	10.04.2019 (10)	20,74	0,435
334	G9	WAR001.B01	10.04.2019 (10)	19,07	-1,235

Приложение Д

Концентрации библиотек палео-ДНК для пула отрицательных контролей

Образцы	Размер [bp]	Концентрация [ng/μl]	Регион молярности [nmol/l]	В 500 мкл пуле	%
EXB062.A0501	142	1,34	17,6	9,16	45,37
LIB052.A0105	159	1,89	20,2	7,98	69,66
LIB052.A0106	223	11,4	91,3	1,77	90,48
EXB062.A1301	192	1,14	10,8	14,93	45,88
EXB062.A2701	192	1,14	10,8	14,93	45,88
EXB062.A2901	172	0,913	9,5	16,98	43,26
EXB062.A3101	164	1,28	13,5	11,95	58,74
EXB062.A3201	159	1,11	11,9	13,55	54,7
LIB052.A0101	154	1,27	14,1	11,44	60,01
LIB052.A0103	231	15,8	120	1,34	87,87
LIB052.A0104	175	8,51	81,3	1,98	89,94
EXB062.A0601	144	2,62	31	5,20	72,67
LIB052.A0102	141	3,3	38,7	4,17	75,89
LIB052.A0114	300	11,9	78,2	2,06	89,32
LIB052.A0115	214	7,2	59,2	2,72	87,29
LIB052.A0116	165	11,9	123	1,31	92,94
LIB052.A0117	171	15,5	161	1,00	94,46
LIB052.A0118	175	5,42	51,7	3,12	80,12
LIB052.A0119	178	10,3	99,8	1,62	89,15
LIB052.A0120	166	9,08	92,2	1,75	87,77
LIB052.A0121	192	9,59	95,3	1,69	89,22
LIB052.A0122	145	4,52	51	3,16	82,24
LIB052.A0123	162	3,1	32,2	5,01	72,27
LIB052.A0124	190	8,5	76,8	2,10	88,81
LIB052.A0125	203	14,7	129	1,25	90,94
LIB052.A0126	166	0,744	8,03	20,09	38,34
LIB052.A0127	128	5,62	77,7	2,08	82,68
LIB052.A0128	294	12	78,5	2,05	78,78
LIB052.A0129	165	5,94	59,8	2,70	85,86
LIB052.A0130	288	22	154	1,05	89,85
LIB052.A0131	206	19,5	169	0,95	93,11

Приложение Е

Концентрации библиотек палео-ДНК для пула образцов, представляющих
149 древних индивида

Образцы	Размер [bp]	Концентрация [ng/μl]	Молярность [nmol/l]	В 1500 мкл пуле	%
1	2	3	4	5	6
Pe-BKB002 1:10	212	6,3	48,4	1,72	87,81
AKB003 1:10	215	3,96	30	2,78	79,88
KZL003 1:10	198	3,19	26,6	3,13	80,77
CPA001 1:10	219	4,36	34,7	2,40	86,08
AKB002 1:10	219	4,15	30,9	2,70	83,91
KZL004 1:10	223	4,68	35	2,38	79,77
SRK004 1:10	238	7,56	54,3	1,53	83,33
KZL005 1:10	222	4,67	36,5	2,28	85,7
KNL005 1:10	243	6,05	42,4	1,97	79,86
KNL035 1:10	231	5,08	36,6	2,28	79,17
NUR003 1:10	216	6,34	47,6	1,75	86,02
BKB003 1:10	233	9,44	67	1,24	84,43
KNL034 1:10	267	9,16	60,9	1,37	81,37
KNL018 1:10	243	13,3	92,1	0,90	87,62
KKB002 1:10	243	12,1	81,2	1,03	81,6
BSK002 1:10	229	6,57	49,8	1,67	87,16
KZL001 1:10	242	7,62	53,6	1,55	83,39
BKB001 1:10	240	9,15	67,2	1,24	90,41
KEN003 1:10	259	10,9	76,1	1,10	85,6
KNL033 1:10	302	10,1	63,1	1,32	84,65
NZR001 1:10	240	9,65	66,9	1,25	81,1
SRK003 1:10	238	11,2	78,1	1,07	84,52
KKB001 1:10	242	11,6	79,1	1,05	86,75
KNL013 1:10	229	5,26	37,2	2,24	79,74
KNL014 1:10	256	5,17	35,5	2,35	79,79
NUR004 1:10	300	15,7	99,3	0,84	92,29
KEN002 1:10	251	11,3	79,1	1,05	87,41
SRK005 1:10	254	13,4	93,2	0,89	85,93
KNL031 1:10	231	8,6	60,9	1,37	84,18
CPA002 1:10	256	8,27	58,9	1,41	84,11
KNL017 1:10	291	8,63	56,9	1,46	81,15
BSK005 1:10	324	17,3	103	0,81	88,8
BSK006 1:10	248	9,31	66,4	1,26	88,24
BSK007 1:10	300	11,9	76,9	1,08	86,16
BSK004 1:10	301	10,1	64	1,30	81,79
SRK002 1:10	270	10	60,6	1,38	78,77
ZHR002 1:10	224	12,7	95,2	0,88	88,57
ZHR003 1:10	218	12,9	96,9	0,86	89,71
CLK002 1:10	212	19,9	158	0,53	94,88

Продолжения таблицы Приложения Е

1	2	3	4	5	6
NZR002 1:10	282	14,6	100	0,83	89,38
KEN001 1:10	288	13,8	90,4	0,92	84,26
BKB004 1:10	290	11	73	1,14	88,42
NUR005 1:10	317	13,8	86	0,97	85,72
CLK001 1:10	263	9,4	64,3	1,30	85,17
AIG001 1:10	235	5,63	39,8	2,09	84,25
AIG002 1:10	236	8,44	59,6	1,40	88,1
AIG003 1:10	235	8,52	60,7	1,37	88,74
AIG004 1:10	240	10,1	70,3	1,19	90,09
AIG005 1:10	238	13,2	92,8	0,90	90,9
AIG006 1:10	230	2,54	18,9	4,41	65,93
BRE016 1:10	232	12,3	89,3	0,93	89,93
BRE017 1:10	22	13,4	98,2	0,85	91,4
BRE018 1:10	22	8,91	65	1,28	85,44
BRE019 1:10	229	9,97	72,7	1,15	90,47
BRE021 1:10	228	10,1	73,5	1,13	91,06
BRE022 1:10	210	6,72	51,8	1,61	84,29
BRE027 1:10	210	8,79	68,1	1,22	88,11
BRE028 1:10	206	7,1	55,6	1,50	87,8
BRE020 1:10	213	7,33	55,9	1,49	88,82
BRE026 1:10	230	11,5	82,7	1,01	92,16
BSB001 1:10	230	11,5	82,2	1,01	88,53
BSB002 1:10	222	9,96	73,5	1,13	87,98
BSB003 1:10	234	11,6	81,6	1,02	90,84
BSB004 1:10	212	9,87	76,9	1,08	90,25
CSP001 1:10	227	8,88	63,9	1,30	86,58
CSP002 1:10	247	5,61	40,6	2,05	77,98
CSP003 1:10	242	11,5	79,7	1,05	88,94
CSP004 1:10	212	2,36	69,35	1,20	69,35
CSP005 1:10	234	8,47	60,8	1,37	60,85
KBU001 1:10	233	7,36	52	1,60	85,87
KBU002 1:10	217	3,35	25,4	3,28	75,62
KBU003 1:10	223	11	82,7	1,01	88,55
KLK001 1:10	212	8,58	66,7	1,25	86,96
KLK002 1:10	229	11,6	85,5	0,97	89,71
KUS002 1:10	204	4,55	36,1	2,31	82,8
KUS003 1:10	214	1,82	13,9	6,00	63,48
KUS004 1:10	236	1,41	10,4	8,01	63,17
KUS005 1:10	242	6,23	44	1,89	78,19
KUS006 1:10	209	10,3	81,9	1,02	90,22
KUS007 1:10	241	2,96	21,6	3,86	64,36
KUS008 1:10	246	12,4	86,2	0,97	92,1
KUS013 1:10	245	8,25	56,9	1,46	83,47
SRO001 1:10	248	10,5	71,8	1,16	90,44
WAR001 1:10	226	6,32	46,3	1,80	85,25

Концентрации библиотек палео-ДНК для пула образцов, представляющих 183 древних индивида

Образцы	Размер [bp]	Концентрация [ng/μl]	Регион молярности [nmol/l]	В 1500 мкл пуле	%
1	2	3	4	5	6
MER001.A0101	231	12,3	90,2	0,91	90,29
MER002.A0101	239	13,8	98,1	0,84	92,11
TRG001.A0101	222	13,9	105	0,78	90,68
TRG002.A0101	239	14,4	101	0,81	89,46
TRG003.A0101	234	7,53	55,8	1,47	85,47
KLR001.A0101	238	12,6	90,3	0,91	92,45
ILI001.A0101	244	10,7	75,8	1,08	85,27
KSK001.A0101	241	14,4	101	0,81	89,82
AKU001.A0101	211	5,55	43,1	1,90	86,46
AKU002.A0101	258	17,2	114	0,72	93,34
AKU003.A0101	210	8,5	67,2	1,22	91,46
BRO001.A0101	242	9,22	64,6	1,27	88,15
BTK001.A0101	235	13,2	96,9	0,85	89,32
KRL001.A0101	246	18,9	129	0,64	94,44
NTK001.A0101	244	9,81	70,6	1,16	90,78
AKR001.A0101	223	8,91	66,6	1,23	86,51
BIR001.A0101	232	15,8	117	0,70	90,78
BIR002.A0101	227	9,82	73,4	1,12	88,88
BIR003.A0101	227	15,1	116	0,71	91,07
BIR005.A0101	218	8,34	64,7	1,27	90
BIR011.A0101	231	12,4	94,1	0,87	91,34
KSH005.A0101	232	15,6	116	0,71	91,86
ASU001.A0101	214	11,1	86,7	0,95	92,06
SMY005.A0101	218	7,58	57,3	1,43	89,17
MBL001.A0101	231	11,5	84,1	0,97	89,36
ASU002.A0101	236	14,9	110	0,75	90,85
SMY006.A0101	215	4,25	32,3	2,54	79,99
BGY001.A0101	210	5,93	46,3	1,77	86,39
SBT001.A0101	222	4,93	36,6	2,24	78,83
SMY007.A0101	246	14,3	98	0,84	90,13
KZB001.A0101	240	8,42	59,7	1,37	85,78
TND001.A0101	217	12	91,7	0,89	90,39
TGP001.A0101	228	9,64	70	1,17	90,64
KZK001.A0101	220	13,8	105	0,78	92,58
SMY001.A0101	245	14,5	99,7	0,82	93,03
SGZ001.B0101	227	12,1	89,3	0,92	90,54

Продолжения таблицы Приложения Ж

1	2	3	4	5	6
KRM001.A0101	237	19,8	142	0,58	91,76
SMY002.A0101	231	21,6	158	0,52	91,66
KTS001.A0101	246	21,4	155	0,53	89,84
SMY003.A0101	217	10	74,8	1,10	89,51
AKE001.A0101	240	14,2	100	0,82	92,53
SMY004.A0101	242	18	126	0,65	90,31
SGZ002.B0101	230	11,7	85,3	0,96	89,28
KSH004.B0101	230	10,1	72,9	1,12	87,03
KNT005.B0101	251	13,3	90	0,91	92,13
KRY001.B0101	259	11,3	74,2	1,10	89,38
SRK001.B0101	217	6,99	52,1	1,57	86,57
KNL007.A0101	227	11,6	84,1	0,97	90,05
TAL003.B0101	228	8,9	63,8	1,28	89,47
KYZ002.B0101	256	14,1	93,1	0,88	92,91
KNL008.A0101	244	15,8	111	0,74	88,14
TAL004.B0101	232	11,6	83,9	0,98	87,95
BDY001.B0101	220	4,85	36,6	2,24	78,74
KNL021.A0101	234	15,7	114	0,72	90,61
TAL005.B0101	229	11,5	84,9	0,97	81,35
NUR002.B0101	247	20,3	139	0,59	93,03
ESZ003.A0101	229	11,8	85,1	0,96	89,4
KKM001.B0101	236	8,68	63,4	1,29	83,98
KNT001.B0101	230	5,75	40,9	2,00	86,95
KSH002.B0101	231	15,2	111	0,74	92,42
KNT003.B0101	227	8,78	65,4	1,25	89,02
KSH003.B0101	241	16,1	111	0,74	89,85
KNT004.B0101	237	9,76	69,1	1,19	89,91
BRE014.B0101	244	11,4	77,6	1,06	88,1
BRE023.A0101	236	12,5	89,3	0,92	87,58
KUS010.A0101	236	12,1	86,1	0,95	89,94
BIS001.A0101	228	6,69	48,9	1,68	84,51
KYY002.A0101	241	16,3	114	0,72	89,63
KUS009.A0101	236	7,22	51,2	1,60	86,02
BIR008.A0101	207	7,28	58,3	1,41	89,36
KYY001.A0101	243	19,7	138	0,59	92,16
SMY010.A0101	249	11,2	76,5	1,07	89,56
BIR007.A0101	217	11,2	87,9	0,93	89,42
KUS016.A0101	237	10,6	75,5	1,09	88,71
SMY008.A0101	235	10	71,6	1,14	87,7
BIR006.A0101	212	4,7	36,1	2,27	82,31
KUS015.A0101	241	9,89	68,8	1,19	89,36
SMY009.A0101	254	11,1	75,3	1,09	88,65
BIR004.A0101	250	17,3	126	0,65	91,94

Продолжения таблицы Приложения Ж

1	2	3	4	5	6
KUS014.A0101	230	6,43	46,9	1,75	85,59
BRE025.A0101	243	14,2	101	0,81	89,73
KUS012.A0101	257	9,33	257	0,32	88,23
BRE024.A0101	245	14,3	99,6	0,82	92,88
KUS011.A0101	236	10,1	72,3	1,13	89,78
AKS002.A0101	128	5,62	77,7	1,05	82,68
KSZ002.A0101	226	10,5	78,1	1,05	89,91
ADJ007.A0101	241	15,9	110	0,75	87,75
AKS001.A0101	251	19,6	141	0,58	89,84
KSZ001.A0101	229	14,7	109	0,75	90,17
ADJ006.A0101	204	7,14	57,2	1,43	89,52
AKC001.A0101	220	9,45	71,1	1,15	89,53
ADJ013.A0101	227	9,66	70,3	1,17	89,58
ADJ005.A0101	229	11,8	87,9	0,93	87,62
KSZ007.A0101	220	9,99	75,1	1,09	88,59
ADJ012.A0101	216	11,7	92,5	0,89	92,72
ADJ004.A0101	231	8	57	1,44	86,98
KSZ006.A0101	230	12,7	95,2	0,86	89,76
ADJ011.A0101	245	14,1	97	0,85	89,76
ADJ003.A0101	218	2,35	17,5	4,68	66,99
KSZ005.A0101	238	11,2	81,1	1,01	88,43
ADJ010.A0101	221	9,42	70,9	1,16	88,99
KSZ004.A0101	229	11,9	85,7	0,96	91,81
ADJ009.A0101	225	5,28	38,5	2,13	84,9
KSZ003.A0101	220	6,3	47,4	1,73	83,54
ADJ008.A0101	217	2,56	19,3	4,25	74,36
CTA001.A0101	241	17,6	122	0,67	92,02
CHB002.A0101	232	14,2	104	0,79	92,41
DYU001.A0101	239	9,76	68,1	1,20	86,7
UCH001.A0101	231	14,1	162	0,51	89,31
KRV001.A0101	232	26,5	195	0,42	89,39
ALH002.A0101	225	12,8	94,6	0,87	91,06
SHS003.A0101	214	10,3	78,5	1,04	91,86
BIS003.A0101	243	14,7	104	0,79	88,88
ALH001.A0101	229	13,5	101	0,81	89,22
SHS001.A0101	237	10,9	77,5	1,06	91,81
BIS002.A0101	237	11,5	81,4	1,01	85,99
ADJ002.A0101	230	18,3	132	0,62	92,82
SHS002.A0101	242	11,5	81,3	1,01	89,02
AGJ001.A0101	242	16,6	118	0,69	89,8
ADJ001.A0101	231	13,2	95,9	0,85	90,81
SHS004.A0101	228	14,7	111	0,74	90,04

Продолжения таблицы Приложения Ж

1	2	3	4	5	6
UCH004.A0101	213	2,44	18,8	4,36	71,92
CHB003.A0101	245	14,2	97,1	0,84	90,04
UCH003.A0101	227	36,3	271	0,30	93,5
CHB001.A0101	232	15,2	110	0,75	90,67
AKC002.A0101	216	10,5	80,3	1,02	88,25
AML007.A0101	243	14,7	100	0,82	92,71
BTH004.A0101	244	28	202	0,41	88,24
AML014.A0101	228	16,5	122	0,67	89,83
AML006.A0101	240	16,6	116	0,71	91,06
BTH003.A0101	230	13,7	100	0,82	89,99
AML013.A0101	244	15	109	0,75	90,29
AML005.A0101	240	26,2	193	0,42	90,5
BTH002.A0101	223	9,93	73	1,12	89,64
AML012.A0101	223	5,39	39,2	2,09	86,56
AML004.A0101	220	2,85	21,3	3,85	70,82
BTH001.A0101	223	10,3	77,2	1,06	87,97
AML011.A0101	217	9,89	77,2	1,06	89,17
AML002.A0101	226	10,8	79,3	1,03	91,09
ISK001.A0101	222	11,3	81,9	1,00	87,95
AML010.A0101	229	16,2	118	0,69	90,2
AML003.A0101	232	7,89	56,4	1,45	87,32
AML009.A0101	231	18,4	133	0,62	92,3
AML001.A0101	231	12,2	88	0,93	86,85
AML008.A0101	240	15,8	113	0,73	92,39
BTH005.A0101	256	16,6	118	0,69	87,82
KNL020.A0101	202	5,78	46,4	1,77	84,79
KNL003.A0101	226	10,7	78,8	1,04	89,69
SMV001.A0101	222	12,2	93,4	0,88	90,68
KNL019.A0101	213	6,63	51,1	1,60	87,65
KNL002.A0101	223	7,66	56,5	1,45	87,64
PRR004.A0101	236	10,5	72,2	1,14	88,71
KNL012.A0101	209	4,61	35,9	2,28	78,3
KNL001.A0101	224	9,83	72	1,14	89,08
PRR003.A0101	224	5,51	39,9	2,05	83,99
KNL011.A0101	224	5,48	40,1	2,04	82,14
KNL025.A0101	224	14,3	103	0,80	90,71
PRR002.A0101	218	5,72	42,8	1,92	85,15
KNL010.A0101	201	5,43	43,8	1,87	86,53
KNL024.A0101	235	9,94	70,6	1,16	85,34
PRR001.A0101	217	5,83	43,9	1,87	83,63
KNL009.A0101	216	7,26	55,9	1,47	88,65
KNL023.A0101	224	11,9	87,2	0,94	93,28
KNL006.A0101	225	5,87	42,8	1,92	86,96
KNL022.A0101	237	4,05	28,7	2,86	77,02

Продолжения таблицы Приложения Ж

1	2	3	4	5	6
KNL004.A0101	227	6,54	47	1,74	86,57
SMV002.A0101	209	6,77	53,1	1,54	86,01
BRE013.B0101	276	14,9	92	0,89	92,45
ESZ001.B0101	232	6,88	48	1,71	86,44
BRE012.B0101	231	7,51	54,8	1,50	86,67
KNL037.A0101	224	13	96,1	0,85	91,92
BRE011.B0101	253	9,97	66,7	1,23	87,89
KNL036.A0101	220	6,09	45,6	1,80	85,6
BRE008.B0101	244	7,09	49	1,67	84,1
KNL030.A0101	211	5,43	42	1,95	83,63
BRE006.B0101	243	8,23	56,4	1,45	83,82
KNL029.A0101	234	11,5	81,5	1,01	89,21
BRE004.B0101	236	7,25	51,2	1,60	90,04
KNL028.A0101	235	12,5	88,3	0,93	87,42
BRE003.B0101	230	9,04	65,5	1,25	90,36
KNL027.A0101	234	11,4	82,5	0,99	87,16
BRE002.B0101	227	9,36	70,2	1,17	88,29
KNL026.A0101	220	10,6	78,9	1,04	87,77

Общая информация по собранным образцам для исследования палео-ДНК

№	Археологическое название	Объекты	Захоронения	Образец	Культура	Археологи / антропологи	Географическое расположение	Вид захоронения	Датирование C14 // археологическая датировка	Место сбора образца	Объем образца для палео-ДНК, мг
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Кумсай (KUS)	1	о- 4, з - 6	зуб	Ямная	Бисенбаев А., Мамиров Т., Мамедов А. / Китов Е., Хохлов А.	Мугальжарский район, Актюбинская область, Казахстан	М	3200 – 2600 лет	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	76.1
2		2	о- 6, з - 1								16.2
3		3	к - 6, з - 6								67.8
4		4	к - 45, з - 1								72.4
5		5	к -128, з -3								94.5
6		6	к - 128, з - 4								45.0
7		7	к - 134, з - 1								22.0
8		8	к - 134, з - 3								69.5
9		9	о- 134, з - 8								73.5
10		10	к -134, з -10								84.6
11		11	к -134, з -12								126.0
12		12	к - 139, з -1								52.8
13		13	к - 158, з -4								109.0
14		14	к - 158, з -7								70.0
15		15	к - 158, з -8								87.2
16		16	к - 158, з -9								37.3
17	Кырыкоба (КYY)	17	о- 1, з- 1	зуб	Кимак	Самашев З., Онгар А. / Китов Е., Китова А.	ВКО, Казахстан	М	800 -1000 н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	92.4
18		18	о- 1, з - 2								56.3
19		19	к - 10								грязный
20	Каспан 2 (CSP)	1	к - 3	зуб	Сакская	Бейсенов А., Джумабекова Г., Базарбаева Г. / Китов Е.	Кербулакский район, Алматинская область	М	2254±50 14С; 400-202	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	53.2
21	Сарозек (SRO)	1	к - 41	зуб	Сакская	Китов Е.	Кербулакский район, Алматинская область, Казахстан	Череп Эмиль Султана	700 -300 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	49.4

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
22	Каспан 6 (CSP)	1	к - 1	зуб	Сакская	Бейсенов А., Джумабекова Г., Базарбаева Г. / Китов Е.	Кербулакский район, Алматинская область	М	2597±23	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	86,6
23		2	к - 4						66,7		
24		3	к - 1						35,2		
25		4	к - 1, ч- #2						73,2		
26	Святили- ще Айгырлы (AIG)	1	индивид 1	зуб	Сарматская	Онгар А./ Китов Е.	Мангышлак, Казахстан	М	VI-V до н.э. - II-IV век н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	72,5
27		2	индивид 2								102,3
28		3	индивид 6								112,5
29		4	индивид 4	зуб					102,6		
30		5	индивид 5						зуб		91,8
31		6	индивид 3								68,8
32	Берел (BRE)	1	к - 2	зуб	Сакская	Самашев З. / Китов Е.	ВКО, Катон- Карагайский район, примерно 154 км восточнее с. Улкен Нарын.	М	IV-III до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	50,8
33		2	к - 9								55,5
34		3	к - 13								67,9
35		4	к - 16								53,2
36		5	к - 32								141
37		6	к - 34								73,2
38		7	к - 37								91,8
39		8	к - 41								150,3
40		9	к - 42								81,7
41		10	к - 72								75,3
42		11	к - 81								149,3
43		12	о- 82С								59,7
44		13	о- 82								58,0

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
45	Бисоба (BSB)	1	к - 3, з - 1	зуб	Сарматская	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	М	2493±24 14С; 771-540	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	89.9
46		2	к - 3, з - 3						140.5		
47		3	к - 3, з - 3						106.2		
48		4	к - 8, з - 1						83.6		
49	Мереке-1 (MER)	1	к - 1, з - 9	зуб	Катакомбная	Китов Е.	Казталовский район, ЗКО, Казахстан	М	2200-1900 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	98.9
50		2	к - 1, з - 10								67.0
51	Нурлы (NUL)	1	о - 6, к - 1	зуб	Сакская	Китов Е.	Нурлы, Енбекшиказахский район, Алматинская область, Казахстан	М	700 -300 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	73.2
52		2	к - 8, о - 4	зуб							М
53	Кайн-булак II (KBU)	1	к - 4, з - 1	зуб	Сарматская	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	М	500 - 300 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы,	91.7
54		2	к - 4, з - 2								50.6
55		3	к - 4, з - 4								48.4
56	Майемер-II (MMR)	1	к - 1	зуб	Сарматская	Китов Е.	Катон-Карагайский район, ВКО, Казахстан	Е	700 -500 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	64.0
57	Тургень-2 (TRG)	1	к - 8	зуб		Китов Е.	Енбекшиказахский район, Алматинская область, Казахстан	М	Бронза - Средние века	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	59.5
58		2	к - 10, з - 3								55.4
59		3	к - 12, з - 3								62.5
60	Кылышьяр (KLR)	1	к - 6	зуб	Канджу	Китов Е.	Ордабасинский район, Туркестанская область, Казахстан	Е	200-400 н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	21.3 (small зуб)

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
61	Илийский (ILI)	1	к - 1, з - 2	зуб		Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	93.2
62	Красно-сельский - I (KSK)	1	КП, Р-1, К-4, пакет No. 31	зуб		Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	70.3
63	Акбулак (AKU)	1	к - 29, з - 1	зуб		Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	53.5
64		2	з - 1								49.2
65		3	к - 29, з - 2								53.0
66	Борнео-Октябрьский (BRO)	1	памятник-2	зуб	Канджу	Китов Е.	Жуальинский Жамбылская область	Е	200-400 н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы,	53.2
67	Бутакты-1 (BTK)	1	к - 1	зуб		Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е	Бронза - Средние века	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	80.5
68	Каргалы I (KRL)	1		зуб		Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е	1200 до н.э. - 340 н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	62.4
69	Красно-сельский- I (KSK)	1	КП, Р-1, К-3, пакет No. 18	зуб	Сарматская	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	Е	V-III до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	111.7
70	NTK-2013 (NTK)	1	13-40-39 - 20	зуб		Кнутов А.		Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	58.5
71	Актогай I (AKT)	1	о- 4	зуб	Андронический период	Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е	XIX-XV до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	95.3

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
72	Акадыр-2 (AKR)	1	20/3/2, к - 20, з - 3	зуб	Ямная	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	Е	3200 - 2600 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	56.8
73	Мавзоль Каялык (KLK)	1	индивид 1	зуб	Карлукская	Китов Е.	Саркандский район, Алматинская область, Казахстан	М	VIII-XI н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	51.2
74		2	индивид 2								53.3 +33.7
75	Ак-Койгас-5 (AKO)	1	к - 5	зуб	Андронический период	Китов Е.	Павлодарская область, Казахстан	Е	XVIII-XV до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	55.3
76	Жиренкопа VI (ZHR)	1	о- 1, з - 1	зуб	Сарматская Ямная	Китов Е.	Хобдинский район, Актюбинская область, Казахстан	М	600-300 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	78.0
77		2	о- 1, з - 3								67.2
78		3	о- 2, з - 1								91.0
79	Сапидулак (SBL)	1	о- 7, з - 1	зуб	Сарматская	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан		VI-III до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы, 22.11.18	64.7
80	Нуркен II (NUR)	1	к - 2А	зуб	РЖВ Коргантас	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Казахстан	М	2504±27 14С; 768-747	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	101.4
81		2	к - 2В								140.8
82		3	к - 10								60.1
83	Назар-1 (NZR)	1	к - 2	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Казахстан	М	2545 ± 32	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	4
84	Назар-2 (NZR)	2	к - 1						2507 ± 30		55.4

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						
85	Бирлик (BIR)	1	к - 1	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Павлодарская область, Баянаульский район, Бирлик, Казахстан	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	68.3						
86		2	к - 6								106.5						
87		3	к - 8								75.7						
88		4	к - 9								62.1						
89		5	к - 11								31.9						
90		6	к - 2	зубы	РЖВ Коргантас				2245 ± 27 14C; 380-354		47.1						
91		7	к - 12		РЖВ, Тасмолинская						14C 2519±2314 C; 790-546	54.0					
92		8	к - 15 (левый)		РЖВ, Тасмолинская						2545 ± 324 14C; 790- 546	115.6					
93		9	к - 19		РЖВ Коргантас						14C; 2216 ± 2714	46.4					
94		10	к - 21		РЖВ Коргантас						IV-II д н.э.	58.0					
95		11	к - 23		РЖВ, Гунны						III-V н.э.	112.4					
96		12	к - 25		РЖВ Коргантас						IV-II до н.э.	67.2					
97		13	к - 29		РЖВ Коргантас						2491±33 14C; 786-490	101.4					
98	Бакы- булак (ВКВ)	1	к - 2		зуб						РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Казахстан	М	2432 ± 28 14C; 727-719 2505 ± 34)	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	56.6
99		2	к - 14														36.8
100		3	KSU-15, верхнее з.														93.8
101		4	к --15, нижнее з.														78.6

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
102	Кара-шоки (KSH)	1	к - 7	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Жанатоған, Казахстан	М	2649±31 14С; 894-790	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	69.2
103	Майку-бель-2 (MBL)	1	к - 14	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Павлодарская область, Баянаульский район, Казахстан	М	VIII-IV века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	62.9
104	Бегазы (BGY)	1	к - 7	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Актогайский район, Казахстан	М	2559 ± 40	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	68.9
105	Кызыл-кой (KZK)	1	к - 8	зуб		Бейсенов А.	Карагандинская область, Шетский район, Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	45.0
106	Кызыл (KZL)	1	к - 3 (левая сторона)	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Актогайский район, Шабанбайбы, Казахстан	М	VIII-IV века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	58.1
107		2	к - 3 (правая сторона)	РЖВ, Тасмолинская	47.2 +41.0						
108		3	к - 4	РЖВ, Тасмолинская	2491±33						55.8
109		4	к - 5	РЖВ, Тасмолинская	3109±22						48.7 +27.0
110		5	строение 8	Культура Бегазы-Дандыбай	Бронзовый век, этап Донгал						66.2

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
111	Кызыл-Субар (KZB)	1	к - 2	зуб		Бейсенов А.	Карагандинская область, Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	81.4
112	Карамола (KRM)	1	к - 6	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Темиршин, Казахстан	М	2291 ± 30 14С; 405-354	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	54.8
113	Акбеит (AKB)	1	к - 2	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район	М	2583±44	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	40.4
114		2	к - 7						2494 ± 30		41.3
115	Бидаик (BDY)	1	к - 1	зуб	РЖВ Коргантас	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Казахстан	М	2269 ± 35	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	50.3
116		3	к - 3						одинаковые образцы		2137±27
117	Караоба, Коргантас (КВО)	1	к - 16	зуб	РЖВ Коргантас	Самашев З. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Мадийский	М	IV-II до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	55.7
118	Кайрактас (KTS)	1	к - 4	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	ВКО, Аягозовский район, Емелтау, Казахстан	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	55.8
119	Копа (CPA)	1	к - 3	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Нуркен, Казахстан	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	49.3
120		2	к - 4								57.0
121	Актерек (AKE)	1	KSU11	зуб	Усуньское время	Бейсенов А.	Карагандинская област	Е	III в. до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х	46.5

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
122	Серекты I (SRK)	1	к - 11	зуб	РЖВ, Коргантас	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Нуркен, Казахстан	М	IV-II до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	53.9			
123		2	к - 15								32.9			
124		Серекты II (SRK)	1								раскопки # 2, к - 4	РЖВ, Тасмолинская	VIII-IV век до н.э.	55.7
125			2								к - 5	45.0		
126	Аксу-Аюлы IV (ASU)	1	к - 3	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А., Ломан В.	Карагандинская область	М	РЖВ, Тасмолинская	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	32.2			
127	Сары-буйрат-2 (SBT)	1	к - 2	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Нуркен, Казахстан	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А., Алматы 25.12.18	58.8			
128	Тандайлы II (TND)	1	к - 2	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Казахстан	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	53.9			
129		2	к - 4	зуб							62.0			
130	Самсы-2018 (SMY)	1		зуб	Новые образцы раннего средневековья	Китов Е.	Алматинская область, Джамбульский район, Самсинский п., Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы 25.12.18	79.0			
131		2									69.0			
132		3									54.6			
133		3	о- 1, пакет 1								40.5			
134		4	о- 1, пакет 3								48.8			
135		5	к - 3, #5								78			
136		6	к - 3, #2								42.8			
137		7	к - 4								69.5			
138		8	к - 5								82.7			
139		9	к - 5, запад								66.8			

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
140	Таргап (TGP)	1	к - 1	зуб				Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х	54.1
141	Бирск-2 (BIS)	1	з - 694	зуб	бахмутинская культура	Мухаметдинов В., Бахшиева А.Китов Е. / Русланова Р.	Республика Башкортостан	М	III-V с. н.э.	образцы были переданы в ИОГЦ 19.11.18 г. из Уфы, Башкортостан Китовым Е.	71.2
142		2	з - 702, #11								43.6
143		3	з - 710								41.0
144	Уч-Эмчек (UCH)	1	#568	зуб - ПВ		Кибиров А., Миклашевская Н., 1952 / Бужилова А. Березина Н.	Калинина (с 1993 года Жайылский район), Кыргызстан	М	IV век	Научно-исследовательский Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	85.2
145		2	#584	зуб - ЛВ	87.7						
146		3	#598	зуб - ПН	77.0						
147		4	#608	зуб - ПВ	112.3						
148	Чегиртне-Арык (СТА)	1	#581*	зуб - ПВ		Кибиров А., Миклашевская Н., 1952, / Бужилова А. Березина Н.	Акталинский район, Кыргызстан	Е	IV век	Научно-исследовательский Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	69.8
149	Чеш-Тюбе (СНВ)	1	#748*	зуб - ЛВ М2		Кибиров А., Миклашевская Н., 1957 / Бужилова А. Березина Н.	Таласская долина, Кыргызстан	М	бронзовый	Научно-исследовательский Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	90.1
150		2	#622	зуб - ПН М3	49.7						
151		3	#749	зуб - ЛВ	59.2						
152	Айгыр-Жал (AGJ)	1	#668/К18	зуб - ПН М3		Кибиров А., Миклашевская Н./Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	Научно-исследовательский Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	86.2

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
153	Альш (ALH)	1	#596/К2	зуб - ПВ М2	Кенкольское время	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	I н.э.	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	67.8
154		2	#625*/К54	зуб - ПН							68.2
155	Дюр-бельжин (DYU)	1	#576*/К1	зуб - ЛВ М2	-	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Акталинский район, Кыргызстан	Е	Первая половина тысячелетия	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	51.0
156	Куртикова щель (KRV)	2	#578*/К2	зуб - ЛН	-	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Покровский район, Кыргызстан	М	Первая половина тысячелетия	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	54.3
157	Шамси (SHS)	1	#557*/К17	зуб- ПВ	Усуньское время	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Чолпонский район, Кыргызстан	Е	I н.э.	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	68.4
158		2	#599*	зуб- ЛН				Е	Усуньское		65.7
159		3	#617	зуб ЛВ				М			91.0
160		4	#620*	зуб- ЛВ							70.5
161	Шадринск (SHD)	1	#25/1	зуб- ПН		Акимова М. / Бужилова А. Березина Н.	Шадринский район, Россия	М	V-III века до н.э.	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	65.9
162		2	#25/2	зуб- ПН							57.5
163	Боровое (BRV)	1	#240/#15/	зуб ЛН РМ2	-	Генинг В., Урал С. / Бужилова А. Березина Н.	Шадринску Акмолинская область	Е	II века до н.э.-I н.э.		53.3

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
164	Адж (ADJ)	2	#559	Зуб ПН	-	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Адж, Кыргызстан	М	Первая половина тысячи- летия	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	78.0
165		4	#561	зуб- ПН	-						76.7
166		5	#569	зуб- ПН	-						84.1
167		6	#570/К9	зуб- ПВ	-						62.3
168		7	#572	зуб- ЛВ	-						57.8
169		8	#573	зуб- ЛН	-						75.6
170		9	#588/К16	зуб- ЛН	-						65.7
171		10	#590/К10	зуб- ЛН	-						67.6
172		11	#618	зуб- ПВ	-						61.0
173		15	#660	зуб- ЛВ	-						76.0
174		16	#664	зуб- ПН	-						57.5
175		17	#666/К1	зуб - ЛВ	-						63.2
176		18	#667*	зуб - ПН	-						77.0
177	Чильпек (СНК)	1	#8186	зуб - ЛВ	-	Воеводский М. / Бужилова А. Березина Н.	рядом с Караколь, Кыргызстан	М	2361±22 14С; 2444±23 2450±22 1213±21 I до н.э. - I н.э.	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	63.8
178		2	#8187	зуб - ЛН	-						71.1
179		3	#8188	зуб - ЛВ	-						48.3
180		4	#8189	зуб - ЛВ	-						55.0
181		5	#8191	зуб - ПВ	-						65.9
182	Челкар (CLK)	1	#283/1	зуб - ПН М2	-	Мошкова М., Кушаев Г. / Бужилова А. Березина Н.	Кустанайская область, Казахстан	М	VI-IV века до н.э.	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	54.2
183		2	Челкар #283/3	зуб - ЛН М2	-						137.4
184	Ак-Таш (AKS)	1	#542/К1	зуб- ПВ	-	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	57.1
185			#545/К5	зуб- ЛВ	-						86.2
186	Иссык- Куль (ISK)	3	#4197	зуб - ПВ	-	Поярков Ф. / Бужилова А. Березина Н.	Семиреченская область, Кыргызстан	М	II-V века, уйсуньская культура	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	60.1

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
187	Алай/Нура I, II, Туяк II (ALN)	1	#360/1	зуб- ПН	Саккское время	Экспедиция Киргизской ССР / Бужилова А. Березина Н.	Алай/Нура/Туяк, Кыргызстан	М	1736±21	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	94.0
188		2	#360/3	зуб- ПВ					1822±25 14С; 131-324		56.8
189		3	#360/4	зуб- ЛВ					V-I до н.э.		55.1
190		4	#360/5	зуб- ЛВ					1725±18		70.8
191		5	#360/6	зуб- ЛВ					1696±22		114.1
192		6	#360/8	зуб- ПВ					2439±22		64.3
193		7	#360/10	зуб- ПВ М1					2332±22		66.5
194		8	#360/7	Молочный зуб - ПН М					V-I до н.э.		68.9
195		9	#360/12	зуб- ЛН							98.6
196		10	#360/14	зуб- ЛВ							90.5
197	Кара-Саз (KSZ)	1	#540	зуб - ПН М2		Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Кошкорская область, Кыргызстан	М	IV век	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	81.5
198		2	#548	зуб - ПН М1							73.5
199		3	#586/К4	зуб - ЛН М1							84.2
200		4	#593	зуб - ЛН М2							67.7
201		5	#602	зуб- ПН							77.6
202		6	#647	зуб- ПН							103.5
203		7	#649*	зуб- ПВ							65.1
204	Курайлы (KRY)	1		зуб		Бисенбаев А. // Китов Е.	Актюбинская область, Мартокский район	Е	1666±1314 С; 344-413	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	62.3

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
205	Ак-Чий (АКС)	1	#544	зуб - ЛВ		Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	53.5
206		2	#650*	зуб - ЛН							58.3
207	Байтал- чи (ВТН)	1	#580	зуб- ПВ		Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	56.8
208		3	#587	зуб- ПВ							88.6
209		4	#629	зуб- ПН							87.9
210		5	#648	зуб- ПН							57.4
211		6	#652*	зуб- ПН							59.6
212	Кен-Су (КЕН)	1	#551	зуб - ПВ		Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Чолпонский район, Кыргызстан	М	2170±23	М.В.Ломоносова	63.8
213		2	#651*	зуб - ЛН					2386±24		71.6
214	Кен-Су 2	1	#556	зуб - ПН	Различные названия с черепом и катологом	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Чолпонский район, Кыргызстан	М	IV век		45.8
215	Шмако- во (SMV)	1	#26/1	зуб-ПН		Генинг В., Хохлова С. / Бужилова А. Березина Н.	Белозерский район, Россия	М	2288±22 14С; 401- 236	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	80.9
216		1	#26/2	зуб- ПВ					IV-III века до н.э.		60.1
217	При- речное (PRR)	1	#232/1	зуб- ЛН		Мирнов С., Мошкова М. / Бужилова А. Березина Н.	Чапаевский район; ЗКО, Казахстан	М	II век н.э.	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	100.3
218		2	#232/2	зуб- ЛН							66.2
219		3	#232/3	зуб- ЛН							66.7
220		4	#232/5	зуб- ЛН							77.0

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
221	Алма-Луу (AML)	1	#360/19	зуб- ПН	-	Экспедиция Киргизской ССР / Бужилова А. Березина Н.	Тянь-Шань, Кыргызстан	М	I-IV века	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	55.2
222		2	#360/20	зуб- ПВ							60.5
223		3	#360/21	зуб- ЛВ							54.9
224		4	#360/24	зуб							79.3
225		5	#360/26	зуб- ПН							66.2
226		6	#360/27	зуб- ЛВ							68.5
227		7	#360/28	зуб- ПВ							53.0
228		8	#360/29	зуб- ЛН							72.6
229		9	#360/31	зуб- ПН							44.9
230		10	#360/32:	зуб- ЛВ							104.5
231		11	#360/34	зуб-ПВ							55.3
232		12	#360/37	зуб- ЛН							65.0
233		13	#360/38	зуб- ПВ							87.2
234		14	#360/39	зуб- ЛВ							60.9
235	Коконовка (КОК)	1	# 225/2	Молочный зуб - ПН		Могильников В. / Бужилова А. Березина Н.	Коконовка, Омский район, Омская область, Россия	М	IV-III века до н.э.	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	28.3
236		2	#225/3	зуб- ЛН					2125±22		63.2
237		3	#225/4	зуб- ЛВ					IV-III века до н.э.		86.3
238	Воробьево (VOR)	1	#22/1	зуб- ЛВ		Стоянов В., Хохлова С. / Бужилова А. Березина Н.	Шадринский район, К -ская область, Россия	М	V-II века до н.э.	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	85.2
239		2	#22/2	зуб- ПН							76.3
240		3	#22/3	зуб							84.5
241		4	#22/4	зуб- ПН							70.1
242	Богдановка (BGD)	1	#228/1	Молочный зуб - ЛН		Могильников В. / Бужилова А. Березина Н.	Район Горького, Омская область, Россия	М	II-I века до н.э.	Научно-исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	60.4
243		2	#228/2	зуб- ЛВ							54.3
244		3	#228/3	зуб- ЛН							57.1
245		4	#228/4	зуб- ЛВ							120.5
246		5	#228/5	зуб- ПВ							49.5

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
247	Бишкекские Несторианские кладбища Кара-Джигач и Бурана (BSK)	1	176/4, м.19	зуб	получен в 1888 году из Императорской археологической комиссии в дар, акт сверки №2398 от 13.03.2018, акт сверки №355 от 27.02.2008	Пантусов Н. 1885-1886 гг. / Срок регистрации 1940 г. на 2 листах, собрание поступило в фонды остеологии и дата инвентаризации: 17.03.2017 г. Жиров Е.В. и Селезнева В.И.	Кладбище Кара-Джигач, Бишкек, Чуйская область, Чуйский район, Кыргызстан	М	1338-1339	Музей антропологии и этнографии имени Петра Великого Российской академии наук (Кунсткамера), Санкт-Петербург, Россия	85.2
248		2	176/5, м.22								50.8
249		3	176/7, м.28								94.7
250		1	5559/1, м.6								66.3
251		2	5559/2, м.9								63.2
252		1	188/1, м.4								57.0
253		2	188/2, м.10								67.4
254	Сегизсай /1 (SGZ)	1	к - 2. з - 4.	зуб	Савромо - сарматский период	Бисенбаев А. // Китов Е.	Актюбинская область	М	V-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	59.5
255	Сегизсай /2 (SGZ)	2	к - 1. з - 2.								Восточный скелет
256	Горная Бития (BIY)	1	#228/12	зубы		Могильников В./ Бужилова А. Березина Н.	Омский район, Омская область, Россия	М	2295±22	Научно-исследовательский Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	62.8
257		3	#228/15								53.4
258		12	#228/31								86.1
259		2	#228/14								63.8
260		4	#228/19								56.4
261		5	#228/20								68.1
262		6	#228/21								60.2
263		7	#228/23								58.1
264		8	#228/24								66.7
265		9	#228/25								45.4
266		10	#228/26								59.3
267	11	#228/27	60.5								

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
268	Талды II (TAL)	1	к - 4.	зуб	Царский курган, тасмолинская культура	Бисенбаев А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	52.8
269		2	к - 5						2540±40 14С; 800-		56.5
270		3	к - 8						2529±23		62.9
271	Каракемер (KKM)	1	к - 3	зуб	Тасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Абайский район, ВКО, Казахстан	Е	VII-VII века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	154,7
272	Карашоки (KSH)	1	к - 8	зуб	Царский к -. Тасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район	М	2649±31	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	50.2
273		2	к - 6						VII-VI века до н.э.		48.3
274	КарашокиVI/1 (KSH)	3	к - 1	зуб	Тасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район	М	2515±27 14С; 791-542	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	67.8
275	37 воинов (WAR)	1		зуб	Тасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Актогайский район, 54 км к юго-востоку от села Кызылтау или 45 км к северо-востоку от ж / д станции Жарык)	Е	2451±32 14С; 755-411	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	52.4
276	Серекты II (SRK)	1	к - 6	зуб	Царский курган. Тасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район	М	VIII-VI века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	62.2
277	Кызылшилик /8 (KYZ)	1	к - 8	зуб	Тасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Павлодарская область, Баянаульский район	Е	2530±29 14С; 796-545	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	55.5

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
278	Кенколь- ские захороне- ния (KNL)	1	#679/К9	зуб- ПВ		Кожемяков П., Кожамбердиев И., Миклашевская Н., 1956, 1957, Киргизская экспедиция / Бужилова А. Березина Н.	Таласская долина, Кыргызстан	М	I-II века, VII-VIII века	Научно- исследовательский Институтт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	67.9
279		2	#681/К12	зуб- ПВ	-						51.5
280		3	#682/К1	зуб- ЛВ							68.6
281		4	#683/К14	зуб- ПН							64.3
282		5	#684/К14	зуб- ЛВ							61.9
283		7	#686/К11	зуб- ЛВ							58.1
284		8	#687/К15	зуб- ПН							95.6
285		9	#688/К4	зуб- ПН							59.7
286		10	#689/К5	зуб- ПН							90.1
287		11	#690/К3	зуб- ЛН							46.9
288		12	#691/К16	зуб- ПВ							67.7
289		13	#692/К4	зуб- ПН							64.0
290		14	#693/К13	зуб- ПВ							61.8
291		15	#694/К2	зуб- ПН							101.2
292	16	#695/К10	зуб- ПН		82.2						
293	17	#696/К4	зуб- ЛВ		97.8						
294	19	#697/К7	зуб- ПН		85.5						
295	20	#699/К33	зуб- ПВ		105.8						
296	21	#700/К34	зуб- ПН	-	52.5						
297	22	#701	зуб- ПВ	-	74.4						
298	23	#702	зуб- ПН	-	50.6						
299	24	#703/К32	зуб- ЛН	-	69.7						
300	25	#704/К32	зуб- ЛВ	-	64.7						
301	26	#705/К32	зуб- ПВ	-	79.5						
302	28	#706/К28	зуб- ЛВ	-	111.0						
303	30	#709/К19	зуб- ЛВ	-	51.6						
304	31	#710/К36	зуб- ПВ	-	57.7						
305	32	#711/К24	зуб- ПН	-	121.2						
306	33	#712	зуб- ПВ	-	61.6						
307	34	#713/К31	зуб- ЛН	-	45.6						
308	35	#714/К33	зуб- ПВ	-	56.7						
309	36	#715/К19	зуб- ПВ	-	70.0						
310	37	#716/К29	зуб- ПН	-	55.4						
311	38	#717/К27	зуб- ЛН	-	63.2						
312	39	#718/К20	зуб- ЛВ	-	58.0						
313	40	#719/К20	зуб- ПН	-	68.9						
314	42	#721/К27	зуб- ЛН	-	51.4						

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
315	Бидаик (BDY)	1	к - 5	зуб	Гасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район .	М	2208±19 14С; 359-204	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	55.4
316	Нуркен II/2 (NUR)	1	к - 1	зуб	Гасмолинская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралинский район	М	2504±27 14С; 785-540	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	50.6
317	Елеке-Сазы (ESZ)	1	к - 3	зуб	Сакский период	Самашев З. // Китов Е.	ВКО, Тарбагатайский район, плато Елеке-Сазы	М	2479±25 14С	Областной историко-краеведческий музей, Усть-Каменогорск, ВКО, Казахстан	57.2
318	Елеке-Сазы II/4 (ESZ)	2	к - 4						2525±25		59.2
319	Каракоба (ККВ)	1	к - 9.	зуб	Скифский период	Самашев З. // Китов Е.	ВКО, Катон-Карагайский район	М	1185±18 14С; 775-887	Коллекция профессора Самашева З.С., Областной историко-краеведческий музей, Усть-Каменогорск, ВКО, Казахстан	52.1
320		2	к - 11.						ВКО, Катон-Карагайский район		М
321	Коктобек II / (КОТ)	1	к - №4	зуб и височная кость	РЖВ	Тулбаев А., Жуматаев Р.	Расположен в 3 км восточнее села Кокжира Тарбагатайского района ВКО	М	IX—VII века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	55.3 ; 55.1
322		2	к - №1	кость							62.0
323		3	к - №3	2 зуба							57.3
324	Акжайлау (AKZ)	1	к - №4	зуб и височная кость	РЖВ	Тулбаев А., Жуматаев Р.	расположена на северо-восточной окраине села Акжайлау, ВКО	М	IX—VII века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	166.6
325		2	к - №5	кость							101.1

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
326	Коныр-Тобе (KNT)	1	к - 1, з- 16, женщина	зуб		Байбосынов К. Китов Е.	Карагандинский регион (склон горы Северный Кызылтау, 6 км к западу от вимовочного района Коныртобе)	М	1741±14 14С; 245-343	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	55.0
327		2	з- 17, мужчина						III-IV н.э.		43.0
328		3	к - 1, з- 6. мужчина						1762±14		53.4
329		4	к - 1, з-1.						1724±12		55.1
330	Айна-булак (AIN)	1	к - №6	2 мол-х зуба и кости	Андроновская культура	Тулбаев А., Жуматаев Р.	Расположен в 7-8 км к юго-востоку от г. Зайсан, Зайсанский район, ВКО, Казахстан	М	XVII—IX века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	108.5
331		2	к - №7	зуб и кости	Афанасьевская культура				III—II тысячелетия до н. э.		100.6
332		3	к - №9	височная кость, 2 зуб							153.2
333		4	к - №21	фрагмент длинной кости							50.0
334	Сабындыколь / (SAK)	1	з - №2	зуб и височная кость	Афанасьевская культура	Тулбаев А., Жуматаев Р.	Расположен в 25 км к северо-западу от северной усадьбы села Кызылагаш, Жарминский район, ВКО	М	III—II тысячелетия до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	109,6
335		2	з - №6	височная кость и 2 зуб							III—II тысячелетия до н. э.
336	Рахат (RAA)	1	к - №3	зуб и височная кость	Сакская культура	Бексеитов Г.	Рядом с Рахат, Енбекши-казахский район, Алматинская область, Казахстан	Е	V – II века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	63.0 ; 51.2

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
337	Берел (BRE)	1	к - 44.	зуб	Царская долина	Самашев З. // Китов Е.	ВКО, Катон-Карагайский район Примерно 154 км восточнее с. Улкен Нарын.	М	2179±13 14С; 354-182	Коллекция профессора Самашева З.С., Государственный историко-культурный музей-заповедник «Берел», Областной историко-краеведческий музей, Усть-Каменогорск, ВКО, Казахстан	59.1
338		2	к - 80А/80Е						1728±13 14С; 254-380		55.0
339		3	к - 69						1728±13 14С; 254-380		49.8
340		4	к -13						IV-П до н.э.		48.9
341		5	к - 90А						1730±13		63.7
342		6	к - 90						1720±25		69.3
343		7	к - 76В						1958±22)		53.7
344		8	к - 68/2						1821±21		49.4
345		9	к - 68/1						1733±18		57.0
346	Шиликты (SHI)	1	з - 2, к - №4, скелет №1	фрагмент длинной кости	РЖВ	Тулэбаев А., Жуматаев Р.	расположен в долине Шиликты, в 70 км к югу от города Зайсан, Зайсанский район, ВКО	М	IX—VII века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	52.5
347		2	з - 2, к - №4, череп №2	фрагмент кости							54.2
348		3	з - 3, к - №2	фрагмент кости							56.7
349		4	з - 3, к - №5	фрагмент кости							57.7
350		5	з - 4, к -7b, череп №1	фрагмент кости							56.4
351		6	к - 7b, череп №2	фрагмент кости							50.8
352		7	4, к - №7b	височная кость и 2 зуб							53.6 -55.5
353		8	к - №16	фрагмент кости							53.2
354		9	к - №3	2 зуб							61.5

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
355	Ориқты /1 (ORI)	1	могила №1	зуб и височная кость	РЖВ	Бексеитов Г.	Посёлок Ориқты, Енбекши - казахский район, Алматинская область, Казахстан	М	IX—VII века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	54.5 ; 52.7
356	Ориқты /2 (ORI)	2	могила №2	фрагмент длинной кости							51.8 ;
357	Ориқты /3 (ORI)	3	могила №3	зуб и височная кость							50.0 ; 50.5
358	Ориқты /4 (ORI)	4	могила №4	фрагмент длинной кости							54.0
359	?	1	к - №2	височная кость		Омаров Г.	?	Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	52.5
360	Бесоба (БЕО)	1	к - №16	зуб и височная кость		Омаров Г.	Рядом с п.Бесоба, Каркаралинский район, Карагандинская область	Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	57.1 ; 51.1

Примечания:

к-курган, з –захоронение, фр –фрагмент;

Е –единичные; М – множественные;

Акт внедрения

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
 НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АЛЬ-ФАРАБИ»

СОГЛАСОВАНО
 и.о. проректора по научно-инновационной деятельности

Рамазанов Т.С.
 « 2021 г.



УТВЕРЖДАЮ
 Член правления - проректор по академическим вопросам,
 Председатель комиссии

Жакыпова Ф.Н.
 2021 г.

АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс

Комиссия НАО «Казахского национального университета имени аль-Фараби» в составе: председателя: Жакыповой Ф.Н. Член правления - проректора по академическим вопросам; а также членов: и.о. директора департамента по академическим вопросам Байгараева Н.А., директора департамента по науке и инновационной деятельности Мухамбетжанова С.К., декана факультета биологии и биотехнологии Заядана Б.К., председателя методсовета факультета биологии и биотехнологии Асрандиной С.Ш., заведующей кафедрой биотехнологии Кистаубаевой А.С. составили настоящий акт о том, что в 2021-2022 учебном году на кафедре биотехнологии внедрены результаты научно-исследовательской работы в учебный процесс преподавателя кафедры биотехнологии, PhD докторанта Л.З.Муералиной по теме диссертации: «Палеогенетический анализ патогенных микроорганизмов в археологических находках с территории Казахстана», а также по теме следующих проектов научно-исследовательской работы докторанта, которая связана с проектами 1. «Анализ знаковых феноменов, представляющих раннюю историю Великой степи, для решения вопросов этногенеза казахов» (2018-2020 гг.) по теме 2. AP08856654 «Палеогенетический анализ патогенных микроорганизмов в археологических останках человека, представляющих Центрально-Евразийский регион» на 2020-2022 годы и 3. AP09058648 «Анализ древних геномов Salmonella enterica из человеческих останков с территории Центральной Азии» на 2020-2022гг.

№ п/п	Форма внедрения (наименования нового курса, спецкурса, раздела лекций, лаб. работы, установки, учебные пособия и т.п.); курс, специальность	Объем внедрения (количество работ, лекционных и лабораторных часов)	Краткое содержание внедренной работы
1	Внедрение в курс: «Engineering Molecular Cell Biology» результатов исследования по теме диссертации «Палеогенетический анализ патогенных микроорганизмов в археологических находках с территории Казахстана» Двудипломная образовательная программа «7M05115 - Биомедицинская инженерия»,	Модуль 1. Lecture 4. Introduction to Bioinformatics. Tools and programming. Main commands using Linux. Bioinformatic analysis in the study of ancient DNA.	Рассмотрены современные научные подходы использования биоинформатических методов, которые используются для познания относительно недавней отрасли, как археогенетика.

Казахстанско-Британский технический университет. Договор	Лекция 5. Algorithm, analyse data in biomedicine. Ten millennia of hepatitis B virus evolution. Lecture 6. Introduction using different tools: EAGER, HOPS, IGV, RStudio, and other. Модуль 2. Lecture 13. Using engineering in genetics and criminalistics. Ancient genomic time transect from the Central Asian Steppe unravels the history of the Scythians.	Внедрены полученные научные результаты по изучению древних патогенных микроорганизмов.
--	---	--

1. Gneechi-Ruscione, G.A., Khussainova, E., Kahbatkyzy, N., Musralina, L., Spyrou, M.A., Bianco, R.A., Radzeviciute, R., Gomes Martins, N.F., Freund, C., Iksan, O., Garshin, A., Zhaniyazov, Z., Bekmanov, B., Kitov, E., Samashev, Z., Beisenov, A., Berezina, N., Berezin, Y., Biró, A.Z., Évinger, S., Bissembaev, A., Akhatov, G., Mamedov, A., Onggaruly, A., Voyakin, D., Chotbayev, A., Kariyev, Y., Buzhilova, A., Djansugurova, L., Jeong, C., Krause, J. // Ancient genomic time transect from the Central Asian Steppe unravels the history of the Scythians (2021) Science Advances, 7 (13), art. no. eabe4414, Cited 1 time. DOI: 10.1126/sciadv.abe4414.

2. Arthur Kocher, Luka Papac, Rodrigo Barquera, Felix M.Key, Maria A.Spyrou, Ron Hübler, Adam B.Rohrlach, Franziska Aron, Raphaela Stahl, Antje Wissgottflorian Van Bömmel, Maria Pfefferkornalissa Mittnik, Vanessa Villalba-Mouco, Gunnar U.Neumann, Maïté Rivollat, Marieke S. Van de Loosdrecht, Kerttu Majander, Rezeda I.Tukhbatova, Lyazzat Musralina et al. // Ten millennia of hepatitis B virus evolution SCIENCE• 8 Oct 2021• Vol 374, Issue 6564• pp. 182-188• DOI: 10.1126/science.abi5658

Материалы к настоящему акту рассмотрены на заседании методического совета факультета биологии и биотехнологии (протокол №3 от 17.10.2021 г.)

Члены комиссии:

директор департамента по науке и инновационной деятельности _____ Мухамбетжанов С.К.

и.о. директора департамента по академическим вопросам _____ Байгараев Н.А.

декан факультета биологии и биотехнологии _____ Заядан Б.К.

председатель метод.совета факультета биологии и биотехнологии _____ Асрандина С.Ш.

заведующая кафедрой биотехнологии _____ Кистаубаева А.С.