

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)
(доработанная версия)

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>	22
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 Гибридизация библиотек палео-ДНК со специфическими зондами на основе последовательностей ДНК патогенов	33
2.5 Филогенетический и статистический анализ	35
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	37
3.1 Создание коллекции зубов и костных фрагментов древних людей, представляющих известные археологические находки	37
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>	50
3.4.1 Оценка ингибирования qPCR в древних образцах ДНК для первичного скрининга <i>Yersinia pestis</i>	52
3.4.2 Скрининг на наличие ДНК <i>Yersinia pestis</i> в образцах, представляющих древнее население Казахстана и прилегающих территорий России и Кыргызстана	53
3.5 Биоинформационный анализ наличия патогенных микроорганизмов в исследованных образцах ДНК	57
3.6 Высокопроизводительное секвенирование гибридных библиотек на патогены с использованием специфических зондов	72
3.6.1 <i>Yersinia pestis</i>	72
3.6.2 <i>Salmonella enterica</i>	74
3.6.3 Hepatitis B virus (HBV)	74
3.7 Филогенетический и статистический анализ	75
3.7.1 Результаты филогенетического анализа выявленных древних штаммов	

<i>Yersinia pestis</i>	75
3.8 Популяционный анализ древних людей, оцененный методом 1240К	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	102
ПРИЛОЖЕНИЕ А - Образцы из Института и музея антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	116
ПРИЛОЖЕНИЕ Б - Индексирование для создания библиотек ДНК	124
ПРИЛОЖЕНИЕ В - Тест на ингибирование ПЦР в реальном времени	131
ПРИЛОЖЕНИЕ Г - Библиотеки для секвенирования	139
ПРИЛОЖЕНИЕ Д - Коллекция образцов РГП “Института генетики и физиологии” КН МОН РК	147
ПРИЛОЖЕНИЕ Е - Акты внедрения	171

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АТФ - аденозинтрифосфат
БСА - бычий сывороточный альбумин
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ - дезоксинуклеозид трифосфат
Палео-ДНК – архео-, древняя дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР - полимеразная цепная реакция
УДГ - урацилдегидрогеназой
ЭБ - элюирующий буфер
ВАМ - 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
RAxML - Randomized Axelerated Maximum Likelihood
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, представляющим 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), биоинформатического скрининга на наличие палео-ДНК широкого спектра патогенных микроорганизмов и некоторых ДНК-содержащих вирусов. Для обнаруженных штаммов чумной палочки *Yersinia pestis* в работе применялись биотехнологические подходы реконструкции древних геномов на основе данных высокопроизводительного секвенирования древних индивидов и qPCR-основанной специфической идентификации *pla* гена активатора плазминогена. Для древних штаммов *Yersinia pestis* и вирус гепатита В был проведен филогенетический анализ и суммированы все последние достижения по анализу ДНК древних штаммов в эволюционном, медицинском и историческом контексте.

Актуальность темы исследования. В последние годы возможности палеогенетики существенно расширились благодаря развитию биотехнологий, совершенствованию методов работы с древними биоматериалами и развитию современных технологий биоинформационного анализа. Разработка биотехнологических методов анализа, позволяющих не только выявлять различия между древними и современными ДНК на основе деградации 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.

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.

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

5. Реконструкция геномов и филогенетический анализ наиболее значимых древних штаммов возбудителей заболеваний человека.

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

Объекты исследования и материалы. Объектами исследования были образцы костных фрагментов 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 биотехнологических 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. Полногеномное 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 гибридизационного захвата (Capture) 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. Большой массив данных (360 древних индивидов) с территории Центрально-Евразийской степи изучен впервые.

Для древних штаммов *Yersinia pestis* и *HBV* был проведен филогенетический анализ и суммированы все последние достижения по анализу ДНК древних и современных штаммов в эволюционном, медицинском, экологическом и историческом контексте.

Так, впервые, в сотрудничестве с большой группой ученых всего мира, установлена эволюционная история вируса гепатита В 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, отражающие известные исторические миграции людей. При этом казахстанские древние штаммы показали принадлежность к генотипу D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современными вирусами гепатита В.

Новизну исследования представляет обнаружение древнего штамма *Yersinia pestis* железного века в образце из некрополя Кызыл и средневековых штаммов *Y. pestis* в 3 образцах несторианского кладбища Кара-Джигач, которые являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы 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, а также в использовании мирового опыта современных биотехнологических 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 популяционная генетика 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 «ИМКВ 5206» Engineering Molecular Cell Biology по специальности «7М05115- Биомедицинская инженерия» КазНУ им. Аль-Фараби.

Кроме того, методики сбора древнего костного материала для палеогенетического анализа были апробированы и внедрены на базе Центра археологических исследований Торайгыров Университета г. Павлодар и РГП на ПХВ “Института археологии имени А.Х.Маргулана” г. Алматы (приложение Е).

Основные положения к защите:

1. Создана пригодная для анализа геномов древних патогенов и древних людей коллекция костных останков, библиотек палео-ДНК, данных высокопроизводительного 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.). Частыми были случаи венерических заболеваний. Такие 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 современными вирусами гепатита В (А 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 *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 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; координация с археологами; сбор археологических образцов; вся лабораторная часть: подготовка образцов, приготовление костной стружки, приготовление растворов для выделения ДНК, выделение палео-ДНК, тест на ингибирование, скрининг на наличие *pla* гена *Y.pestis* методом реал-тайм ПЦР, подготовка библиотек и подготовка пуллов для полногеномного секвенирования. Биоинформатический скрининг патогенных микроорганизмов в полученных образцах палео-ДНК. 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, одна из которых рекомендованная 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 115 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 25 рисунков, 5 таблицы и 6 приложений.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность исследований в области археогенетики

Применение методов молекулярной генетики и биотехнологии к анализу археологических артефактов, костных останков людей ранних исторических периодов и древних гоминид, привело к возникновению новой дисциплины - археогенетики. Термин «археогенетика» был предложен в 1990-х годах археологом Колином Ренфрью [1]. Первые опыты по выделению, изучению свойств и анализу сохранности ДНК в археологическом материале были сделаны Сванте Паабо [5]. Разработка протоколов исследования древней ДНК, использование новых современных технологий секвенирования ДНК и биоинформатической обработки данных, обобщение имеющихся данных по генетике человека, помогли ему и его исследовательской группе сделать удивительные открытия в области генетики древних гоминид [5].

Благодаря совершенствованию биотехнологических методов анализа ДНК, разработке методов секвенирования нового поколения, за относительно короткий период времени археогенетика стремительно развилась. Были получены новые знания о генетике человека, которые практически привели к пересмотру многих исторических концепций и новых открытий в области эволюции человека [2-5].

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. Стремительное развитие археогенетики в последнее десятилетие прошлого века привело к настоящему взрыву числа публикаций по популяционной генетике.

По мере того, как все больше информации о генетической структуре ядерной ДНК и мтДНК различных этнических групп со всего мира накапливалось, популяционные генетики использовали ее для выводов о доисторических и демографических событиях, а также для подтверждения сведений из исторических источников. При этом генетические данные надо согласовывать с данными археологии, лингвистики и палеоантропологии.

Сегодня анализы отцовских (Y-хромосома) и материнских линий (мтДНК) на основе ПЦР теряют популярность по сравнению с методами полногеномного секвенирования, так как теперь, благодаря современным технологиям, можно получить гораздо больше информативных данных при значительно низких затратах. 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 биотехнологических методов в археологии уже в течение нескольких лет, Колин Ренфрю продемонстрировал значительные результаты и суждения по этому поводу [1].

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

После смерти организма ДНК подвергается фрагментации, деградации и химическим модификациям, ее сохранность 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, часто лишь незначительные количества палео-ДНК остаются в археологических материалах. Кроме того, большая часть выделенной из археологического объекта ДНК обычно происходит от микроорганизмов, которые распространяются в разлагающихся тканях [12]. В то время как микробные последовательности редко совпадают с референсным геномом, используемым для идентификации эндогенных последовательностей, если используются соответствующие отрезки длины [13], загрязнение ДНК от близкородственных организмов представляет собой повторяющуюся проблему [14]. Люди, работающие с образцами во время раскопок, часто оставляют свою ДНК на археологическом материале. Поскольку контаминация ДНК может существенно повлиять на результаты популяционного, генетического или филогенетического анализа, проблема загрязнения чужеродными ДНК особенно актуальна для геномного анализа древних людей [15]. 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 решения вопросов этногенеза многих народов [18]. Имеется также политический аспект данных исследований. Известны примеры возвращения костных останков, найденных в одном географическом регионе, на историческую родину. В некоторых случаях, ДНК анализ является необходимым условием. Ранее для аборигенов Австралии, вопрос географического происхождения основывался на результатах исследования морфологии скелета, в частности, краниометрии, в настоящее время более информативные данные получают на основе анализа ДНК [19, 20].

ДНК, выделенная из древних тканей, содержит информацию, выходящую за рамки генетических данных человека. Также было показано, что она содержит древние ДНК бактерий и вирусов, присутствующих у человека на момент его смерти. Эти данные используются не только для определения причины смерти древних индивидов, определения культуры их питания и кулинарных навыков, но и для получения сведений о древнем микробном разнообразии с учетом их эволюционной истории, что важно, как для патогенных, так и полезных микроорганизмов [21, 22, 23, 24].

В археогенетике информация о ДНК различных этнических групп всего мира используется для анализа доисторических событий, исторических источников и археологической отчетности. Чтобы пролить свет на историческое прошлое, данные ДНК должны быть согласованы с открытиями археологов, лингвистов и палеоантропологов.

С исторической точки зрения, новые области науки можно охарактеризовать через развитие 3-х этапов, начиная с описательного периода, за которым следует сосредоточение внимания на механизмах и функциях, и заканчивая формулировкой экспериментов и проверкой гипотез. В настоящее время новая наука археогенетика находится на стадии изучения и анализа широкогеномных данных крупномасштабных популяций древних людей и сообществ, который невозможен без опоры на исторические сведения и источники.

Область исследования древней ДНК началась с работы Аллана Уилсона 1984 г. по равнинной зебре [25]. Исследовательская группа Уилсона смогла восстановить короткие последовательности ДНК. Однако авторы ограничились клонированием фрагментов и 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 обогащения 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 высокопроизводительного секвенирования ДНК археологических образцов. Для этой цели проводят анализ для сбора интересующих 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 [30-32].

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 находиться в останках погибших организмов. ДНК, извлеченная из таких останков, деградирует. Она также содержит большое количество дезаминированных

остатков цитозина, которые накапливаются на концах молекул, а также имеет ряд других менее хорошо охарактеризованных повреждений.

В живых клетках молекулы ДНК постоянно подвергаются химическим процессам, 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 замедляются. В этих случаях другие деструктивные факторы, в частности гидролизные и окислительные процессы, становятся ограничивающими сохранность ДНК в тканях.

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;
- поражения, которые приводят к включению неправильных нуклеотидов при репликации 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 40-180 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 гидролитической депуринизации, что способствует нарушению репликации из-за модифицированных оснований и возникновению одноцепочечных разрывов ДНК [10]. Действительно, щелочная обработка древних экстрактов ДНК указывает на наличие терминальных 5'-фосфатных и альдегидных 3'- концев.

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 последовательностями 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 (аналог тимина) во время репликации ДНК будет определять присоединение аденина (А), что приведет к замещению от С до Т или Г до А (в зависимости от последовательности). 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 цепь ДНК, показала, что подавляющее большинство замещений нуклеотидов в древних последовательностях ДНК находятся в диапазоне от С до Т, и что обработка ферментом урацилдегидрогеназой (УДГ) приводит к значительному снижению таких замещений.

В последнее десятилетие высокопроизводительные методы секвенирования позволили лучше понять закономерности фрагментации древней ДНК. Это связано с тем, что в основе этих методов лежат способы маркирования фрагментов ДНК путем присоединения адаптерных последовательностей нуклеотидов к концам молекул ДНК для построения библиотек секвенирования. Последующее секвенирование позволяет определить местоположение разрывов, поскольку проводится от адаптеров до терминальных последовательностей, до тех пор пока терминальные нуклеотиды поддаются лигированию и не удаляются ферментативной обработкой, используемой во время подготовки библиотек. Используя этот подход и референсный геном человека для определения геномных позиций было показано, что пурины: аденины (А) и гуанины (G) представлены 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 восстановления цепей ДНК, который использует свободные 3'- концы фрагментов ДНК, тем самым исключая определение точного местоположения 3'- концов. Первая попытка определить контекст последовательности вокруг 3'- концов была предпринята с использованием технологии секвенирования, которая маркирует 3'-концы полиаденилированными последовательностями [33].

Секвенирование полиаденилированных терминальных последовательностей помогло определить, какие именно нуклеотиды в древней ДНК больше подвергаются химической модификации, вызывающей одноцепочечные разрывы. Однако, неэффективное полиаденилирование альдегидных 3'- концов, может исключить 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, представлены непосредственно рядом с обоими концами древних фрагментов ДНК в ДНК, извлекаемой из костей, сохранившихся десятки тысяч лет [11, 24].

Анализ 3'-концов фрагментов древней ДНК, ставший возможным благодаря новым технологиям секвенирования [33] и недавно открытому методу подготовки одноцепочечных библиотек [17], однозначно показывает, что замены С на Т происходят одинаково на обоих концах фрагментов древней ДНК. Хотя такие условия окружающей среды, как влажность, температура, соленость и рН будут оказывать сильное влияние на сохранность ДНК. Путем экстраполяции из экспериментов *in vitro* [10] было подсчитано, что время жизни ДНК в стандартных условиях не более нескольких сотен тысяч лет. Действительно, недавно было показано, что период полураспада 242 п.о. митохондриальных фрагментов ДНК в костях птиц, раскопанных на небольшом участке в Новой Зеландии, составляет около 500 лет [34].

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. Есть слабая 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, который, вероятно, помимо депуринизации вызывает повышенный сигнал гуанина в более старых образцах, возможно, обусловленный ферментной деградацией и фрагментацией вскоре после смерти. Из всех изученных постмортальных модификаций оснований последовательностей ДНК только дезаминирование цитозина коррелирует с возрастом. Это показано на разных археологических образцах, из разных географических зон и разных условий захоронений. Поэтому дезаминирование 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, тем не менее, ее вклад в фрагментацию древней ДНК, который, вероятно, составляет лишь 10-40%, полностью основан на косвенных доказательствах. Кроме того, по-прежнему 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 выделены из древних останков [35, 36]. Только сохранение в замороженном состоянии может позволить ДНК выжить более миллиона лет. Когда станет

доступно несколько таких подробных исследований сохранности ДНК из различных сред, можно будет оценить вероятность обнаружения ДНК, учитывая условия окружающей среды на археологическом объекте. Однако даже в этом случае условия, имеющие отношение к сохранности ДНК, такие как количество проникающей воды, соленость, рН и рост микроорганизмов, скорее всего, будут варьировать в пределах конкретного участка или археологического слоя.

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. 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.

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, может быть использован 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 линий патогенов, 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 каждой конкретной 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 произошло множество событий, связанных с возникновением новых инфекционных агентов, сопровождавших человечество со времен неолита [42]. Приобретаемые пищевые и культурные навыки, развитие агрокультуры, обусловленное распространением растениеводства и животноводства связано с возникновением новых патогенов. Так, например, тесный контакт с домашними животными может объяснить повышение частоты случаев передачи зоонозных инфекций, а более высокая плотность населения обуславливает способность патогенов распространяться внутри и между группами [29].

На протяжении всей истории человечества было зарегистрировано множество эпидемий и пандемий и большинство их возбудителей все еще остаются неисследованными. 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. 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 эпидемии, названной «Черной Смертью», и описанными в истории последующими вспышками. 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 *Y. pseudotuberculosis*, но все еще остаются вопросы о его передаче. Благодаря непосредственному исследованию ДНК древнего возбудителя чумы *Y. pestis*, возможные эволюционные пути и условия превращения микроорганизма в чрезвычайно вирулентную форму, которая способна вызывать бубонную чуму [47].

Анализ геномов древних *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 - брюшной тиф, 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 вирусом гепатита В, что делает его глобальной проблемой здравоохранения [52]. Этот вирус является одним из наиболее распространенных патогенов человека, известных сегодня, однако его происхождение и история эволюции до сих пор остаются неясными и противоречивыми.

Вирус гепатита В представляет собой оболочечный ДНК-вирус, который принадлежит к семейству *Hepadnaviridae* и поражает гепатоциты: род *Avihepadnavirus* поражает птиц (таких как утки, гуси, цапли, аисты, журавли и попугаи), а род *Orthohepadnavirus* заражает млекопитающих [53].

Геном вируса гепатита В – 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 вирус гепатита В в настоящее время классифицируются на десять генотипов и многочисленные субгенотипы, которые показывают различные географические распределения [55]. Все генотипы предположительно являются в первую очередь результатом рекомбинаций [56]. В меньшей степени эволюция вируса гепатита В также обусловлена накоплением точечных мутаций [56]. Несмотря на то, что этот вирус широко распространен и хорошо изучен, его происхождение и эволюционная история все еще неясны и противоречивы [56, 57]. Вирус гепатита В у приматов, например у шимпанзе и горилл, филогенетически тесно связан с изолятами

вируса гепатита В человека, и в то же время отличается от них, поддерживая представление об африканском происхождении вируса [57]. Молекулярно-часовой анализ, датируемый происхождением вируса гепатита В, 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 вируса гепатита В [59]. Более того, исследования древней ДНК мумий, инфицированных данным вирусом, начиная с XVI- века н.э., выявили очень тесную взаимосвязь между древними и современными геномами вируса гепатита В [60], что указывает на отсутствие временных генетических изменений в вирусе за последние 500 лет [61]. Поэтому необходимы диахронические исследования древней ДНК вируса гепатита В, 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].

Вирус гепатита В 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 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 [49]. Обработка большого количества древней ДНК из человеческих останков для изучения эволюции патогенов, переносимые кровью, выявляет огромный потенциал данного исследования.

1.5 Общая характеристика возбудителя чумы - *Yersinia pestis*

Чума - зоонозная болезнь грызунов, вызванная бактериальным патогеном - грамотрицательной бактерией *Y. pestis*, является возбудителем бубонной, легочной и септической чумы, которая произошла от близкородственного экологического предка *Y. 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 в Средиземноморье [70]. Летописцы часто ссылались на случаи болезни в Египте 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 (возникшей 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 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] и до сих пор не охарактеризованы. Остаются гипотетическими источники 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 качество 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].

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 - *Y. pseudotuberculosis*.

В Казахстане и других странах Центральной Азии бактерия *Y. 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 избытия для инфекционных болезней - инвазии и персистенции - действующих в одной популяции диких животных [79].

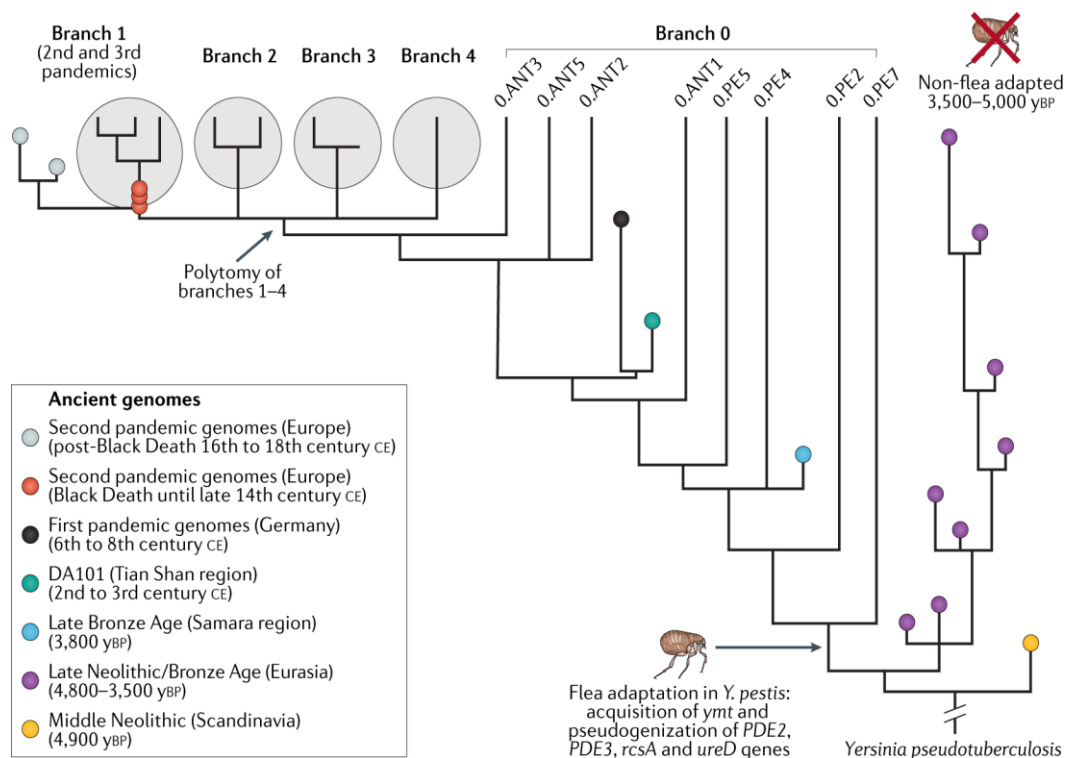
Споры о том, как бактерия *Y. pestis* вновь появляется после многолетнего отсутствия в Пребалхашской области Казахстана, продолжаются уже полвека, но механизм пока не ясен. Одна из теорий заключается в том, что чума сохраняется в своем резервуаре-хозяине (большой песчанке) в так называемых "горячих точках", 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 *Y. pestis*, основанную как на древних, так и на современных геномах. Древние штаммы, ранее характеризовавшиеся филогенетическим анализом, представлены цветными кругами описаны в примечании.

В настоящее время эволюционное древо бактерии *Y. pestis* характеризуется пятью основными филогенетическими ветвями (рисунок 1). Предковая, «нулевая» ветвь (ветвь 0) включает штаммы, распространенные в Китае, Монголии и других странах. 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].



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]

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 патогенностью чумного штамма, была его способность колонизировать членистоногих, обусловленная специфической 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 палео-ДНК 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 неопределенными. 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 А 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 распиливали 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).

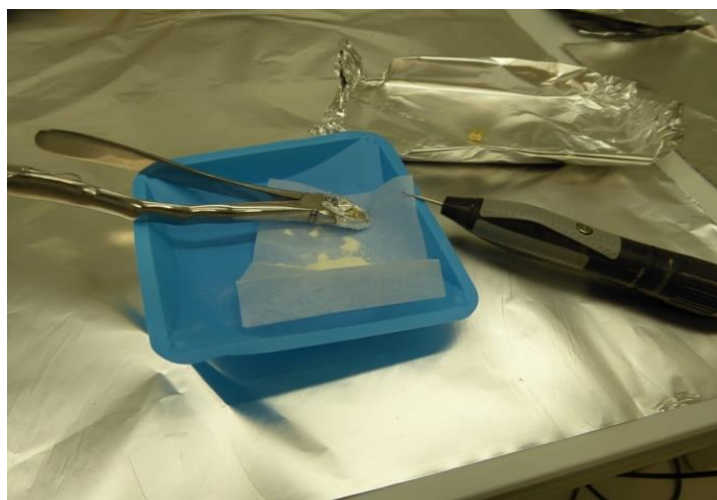


Рисунок 3 - Подготовка зубного порошка для выделения палео-ДНК

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 высокопроизводительного секвенирования на платформе HiSeq (Illumina). При подготовке библиотек использовали фермент USER (New England Biolabs (NEB)), который является необходимым требованием при работе с палео-ДНК [36].

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 использованием фермента УДГ и эндонуклеазы VIII [2]. Для этого, 25 мкл выделенной ДНК смешивали с 0.072 Е фермента USER в буфере Tango (Life technologies), 1.2 мМ аденозинтрифосфат (АТФ), 0.2 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА), 0.4 мМ дезоксинуклеозид трифосфат (дНТФ) и инкубировали 30 мин при 37°C и 1 мин при 12°C. Реакцию останавливали, добавив 0.1343 Е ингибитор урацил-гликозилазы (NEB), и ещё раз инкубировали 30 мин при 37°C и 1 мин при 12°C. После добавления 0,515 Е полинуклеотидкиназы Т4 (NEB) и 0.085 Е Т4 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 (ЭБ), содержащего 0.05 % Tween-20. Эти ферменты используются для удаления урацила, образуемых в результате дезаминирования цитозина из древней ДНК. Обработка приводит к значительному увеличению количества обнаруживаемых фрагментов палео-ДНК.

По 18 мкл пропущенного через колонку MinElute раствора использовали для второго этапа - лигирования адаптеров к обоим концам фрагментов ДНК. Элюат смешивали с 0.25 мкМ адаптерными последовательностями и 0.125 Е фермента Quick Ligase (NEB) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. ДНК очищали, как описано выше, и элюировали в 22 мкл ТЭБ. Затем ДНК инкубировали 0.4 Е фермента Bst полимеразой и 0.5 мМ дНТФ 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 п.н. в реакциях 0.025 Е фермента Pfu Turbo Polymerase (Agilent Technologies), 100 мМ дНТФ, 0.3 мг/мл БСА и 0.2 мкМ индексов в буфере Pfu Turbo в амплификаторе 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 [36].

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

Секвенирование пулов библиотек палео-ДНК, полученных методом Shotgun, проведено на платформе Illumina HiSeq 4000.

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 *Y. 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 анализа ПЦР в режиме реального времени [98], специфичного для (*pla*) гена активатора плазминогена, который находится на высококопируемой рРСР1 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). ПЦР в режиме реального времени проводили в объеме 20 мкл, состоящих из 1 единицы 10-кратного ПЦР буфера II, 2,5 mM MgCl₂, 250 μM смеси дНТФ, 5% диметилсульфоксида (ДМСО), 0,75 мг/мл БСА, 300 нМ 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, Германия). Для qPCR использовали около 50 нг древней ДНК.

Смесь для ПЦР в режиме реального времени объемом 20 мкл содержала 50 нг палео-ДНК, 1X ПЦР буфер, 2.5мМ MgCl₂, 250 мкМ смеси дНТФ, 5% ДМСО, 0.75 мк/мл БСА, 1X краситель EvaGreen, по 300 нМ специфических праймеров для ДНК *Y.pestis* (pla_Ef и pla_Er) и 0.05 ед./мкл ДНК-полимеразы Amplitaq gold. 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, Германия). Далее были сделаны библиотеки для полногеномного секвенирования.

2.3 Обработка данных биоинформатическими методами

Биоинформатическая обработка данных, полученных после высокопроизводительного секвенирования на платформе HiSeq (Illumina), проведена с использованием нескольких пакетов программного обеспечения, адаптированных к анализу древних ДНК: EAGER [100], HOPS [28], MEGA7, R [101]).

Первоначальную обработку сырых данных секвенирования проводили в программе EAGER. Эта программа считается одной из лучших для обработки биоинформатических геномных данных секвенирования NGS древней ДНК. Она идеально подходит для (палео)геномного анализа человека, животных, растений, микробов и даже микробиомов, и предварительно обрабатывает необработанные данные из FASTQ или предварительно обработанные BAM файлы. Программа EAGER была использована для сопоставления прочтений с референс последовательностью и для общего контроля качества результатов NGS и палеоДНК.

Биоинформационный анализ на наличия древних ДНК патогенных микроорганизмов и вирусов в секвенированных библиотеках образцов палео-ДНК проводили на основе данных полногеномного секвенирования образцов палео-ДНК с использованием референсных геномов для каждого патогена и программного обеспечения HOPS [28]. Данные секвенирования образцов палео-ДНК сопоставлялись с пользовательской базой данных RefSeq Genome, включающей все полные геномы вирусов и бактерий (по состоянию на 2017 г.), которая также представлена в пакете HOPS. Параметры картирования учитывали как минимум 90% идентичности (--minPercent Identity) с референсной ДНК патогена, совпадения по высшему процентному значению (--topPercent), а также минимальные совпадения (--minSupport) на 1 параметр в режиме BlastN. Все остальные параметры были использованы в настройках по умолчанию. Автоматизированное обнаружение и определение подлинности палеоДНК патогенов в археологических останках было сделано с помощью этих

программ. HOPS фокусируется на проверке данных MALT. Получается, что биоинформационный анализ HOPS с использованием референсных геномов для каждого патогена определил наличия ДНК патогенных микроорганизмов и вирусов, обрабатывая данные полногеномного секвенирования образцов палео-ДНК [28], которые в дальнейшем подтвердились. Кроме того, результаты картирования MALT были визуально проверены в анализаторе MEtaGenome Analyzer (MEGAN) [32].

Далее, полученные данные (графические результаты и филогения) обрабатывались с использованием специфических программ: MEGAN, MEGA7, RAxML, BEAST и других [32, 100-105].

Анализ главных компонент (PCA) проводили на основе захвата 1240000 однонуклеотидных вариаций (1240K SNP) [34] в отсеквенированных библиотеках образцов палео-ДНК человека (109 древних неродственным особям с территории Казахстана, Кыргызстана и России). Эта часть проведена группой популяционных генетиков. Была применена функция smartpca v16000 [11, 18] в пакете программ EIGENSOFT v6.0.1 к набору данных 1240K для запуска анализа главных компонент генома с опцией lsqproject для проецирования данных древних людей поверх PCA, рассчитанного на набор современных популяций Евразии (150 популяций, включая данные по современным казахам). Потом был применен анализ вкладовых смесей (ADMIXTURE v.1.3.0.), кластерный анализ от $K = 2$ до $K = 16$ на множестве древних и современных людей со всего мира. Для каждого протестированного K выполнено 10 независимых прогонов ADMIXTURE с другим случайным начальным числом, чтобы проверить сходимость логарифмических правдоподобий в разных прогонах. Для каждого K выбран для рассмотрения прогон с наибольшей логарифмической вероятностью. Для анализа ADMIXTURE были удалены варианты с частотой минорного аллеля (MAF) $< 0,01$, сокращен набор данных путем удаления всех SNP в неравновесном сцеплении (LD) с $r^2 > 0,4$, установив скользящее окно из 200 SNP с шагом 25 SNP, используя специальные команды в PLINK. Сокращенный набор данных состоял из 206 728 SNP. Дополнительно были удалены из анализа палео-ДНК с уровнем отсутствия в отсеквенированных последовательностях более 95% SNP. Таким образом в анализ были включены ДНК древних индивидов с уровнем не менее чем $\sim 10\ 000$ определенных SNP.

2.4 Гибридизация библиотек палео-ДНК со специфическими зондами на основе последовательностей ДНК патогенов

Для некоторых патогенов – *Y. pestis* и вирус гепатита В, проводили гибридизацию ДНК патогенов для секвенирования 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 вируса гепатита В в виду высокой частоты мутирования референсный геном создали на основе *de novo* сборки чтений последовательностей ДНК вируса гепатита В в древних образцах

с помощью программы NOVOPlasty [109] в диапазоне генома от 3000 до 3500 п.о.

Набор зондов для 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 гибридизации целых геномов *Y. pestis* [81] и *S. enterica* [45] с использованием 96-луночных планшетов в двух этапах. После чего, библиотеки были просеквенированы на платформе Illumina HiSeq 4000. Чтения последовательностей библиотек определялись 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 удалялись повторы с помощью Markduplicates (часть инструментов Picard; <http://broadinstitute.github.io/picard/>) и выровнено с помощью инструментария GATK [110]. Полученные в результате BAM- файлы карт 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, используя трехкратный порог покрытия 90% отобрали последовательности для каждого генома. Адаптеры удаляли путем обрезки 7 п.н. с каждого конца с помощью программы FastX-trimmer v.0.0.1472. После удаления адаптеров fastq файлы загружались в хранилище. Далее пары чтения для библиотек (tsv) использовались в качестве исходных данных для nf-core/eager вместе с остальными данными. Nf-core/eager был запущен с tsv, а следующие процессы 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. 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 секвенирования гибридизации библиотек древних последовательностей ДНК вируса гепатита В впервые была применена *de novo* сборка чтений данного вируса, которую проводили на основе данных секвенирования палео-ДНК с помощью программы NOVOPlasty [109] в

диапазоне генома от 3000 до 3500 п.о., допуская 15% несоответствий и 10% пробелов. Далее сравнивали показания с референсным геномом вируса гепатита В (GenBank: NC_003977) в программе Geneious 9.1.8., что позволяло восстанавливать сильно расходящиеся с референсной 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 1x порога охвата, чтобы получить окончательные 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]. 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 данные BAM- файлов использовались для создания таблиц с подробным описанием количества и нуклеотидного состава, охватывающих каждую геномную позицию, с помощью <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 вируса гепатита В.

2.5 Филогенетический и статистический анализ

Филогенетический анализ проводили с учетом вновь обнаруженных древних патогенных организмов и ранее опубликованных данных по древним и современным патогенам. Конструирование филогенетического дерева основывалось на использовании методов максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и принципу Байеса.

Так для *Yersinia pestis* в анализ включено 203 современных и 47 древних геномов *Y. pestis* [83]. По вирусу гепатита В – 136 геномов, 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 было использовано построение филогенетического древа в программе MEGA7 [101]. Реконструирование филогении проводили с использованием RAxML [113]. Для анализа молекулярной датировки проводили выравнивание SNP в качестве входных данных для установки в BEAUti, включая средние радиоуглеродные даты всех древних штаммов [103].

Выравнивание генома HBV для построения филогенетического дерева с помощью программы RAxML v. 8.2.12 [113] проводили, используя модель

замены GTRCAT и алгоритм быстрой загрузки с критерием начальной загрузки autoMRE.

Во всех случаях результирующее ML-дерево создавалось на основе усреднения корневых точек, и временной сигнал набора геномных данных оценивали с использованием регрессии генетических расстояний от корня до кончика (измеренных в заменах на сайт) относительно дат выборки генома. Для оценки времени дивергенции и филогении вируса гепатита В использовали программное обеспечение BEAST v1.10 [104], и для *Y. pestis* с использованием статистической программы BEAST2 [114]. Поскольку большинство байесовских филогенетических систем (таких как BEAST2 [114]) основаны на раздваивающихся деревьях и, следовательно, плохо справляются с разрешением многократно пересекающихся узлов, мы дополнили данный анализ при помощи программы TreeTime v.0.8.4 [115], используя подход максимального правдоподобия.

Временной сигнал сопоставлялся для всех штаммов с учетом их возраста и совпадал с радиоуглеродным датированием. Для анализа 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. Для этого сравнили постоянное, экспоненциальное и байесовское значения [115] с учетом численности населения в группе древних индивидов и исходные данные филогенетического древа (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 плазидах 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. Их можно найти здесь: <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 референсного генома. Мы восстанавливали непокрытые регионы из BAM-файлов. Код R можно найти здесь: https://github.com/aidaanva/LNBAplague/blob/main/Stone_Age_Plague_v5.Rmd.

Реконструирование конечного филогенетического древа было проведено с использованием RAxML [113]. Эта программа для последовательного и параллельного анализа больших филогенетических деревьев на основе максимального правдоподобия.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

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 описаны в отношении типа питания и других физиологических особенностей. Согласно требованиям к объему выборки образцов древних людей для анализа древних патогенов необходимо проверить не менее сотни образцов, чтобы обнаружить в них патогенные микроорганизмы.

Возбудители инфекционных заболеваний, сопровождающихся бактериемией, такие как возбудители чумы, сыпной тиф и т.д., переносятся с кровью во внутренние ткани зубов (пульпа). После смерти больного ДНК этих возбудителей сохраняется там, и, в силу особенностей анатомического строения зубов, проникновение инородных микроорганизмов в пульпу практически не происходит.

Следует отметить, что методы отбора костных 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 *Y. pestis* [21, 87]; *Borrelia recurrentis* [116] и *S. enterica* [45, 108]. Даже *Micobacterium leprae*, которая обычно проявляется заболеванием в хронической форме, была извлечена из древних зубов [49]. 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].

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, так как древние патогенные микроорганизмы и вирусы можно обнаружить в пульпе интактного зуба.

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.

В 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.). Три 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 (черепях) 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 Кыргызстан. В образцах из Кыргызстан, датированных от эпохи бронзы до эпохи средневековья, представлены как множественные, так и единичные захоронения.

35 древних индивидов (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 захоронений



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 Д.

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.

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. Эти образцы с множественных захоронений, такие как Айғырлы, Бидайық, Бирлік, Богдановка, горная Бития, Бисоба, Воробьево, Кайынбулак, Каспан, Караоба, Кенсу, Коконовка, Кызыл, Маймер, Нурлы, Сапибулак, Чилпек, Шадринск.

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 представлены в таблице 1:

Таблица 1 - Данные по радиоуглеродному датированию

Наименование	14C	14C калибровка (2-sigma)
AIG005.A0101	1889±22	63-210 н.э.
ALN001.A0101	1736±21	244-380 н.э.
ALN002.A0101	1822±25	131-324 н.э.
ALN005.A0101	1696±22	258-402 н.э.
CHK004.A0101	1213±21	722-885 н.э.
KZL004.A0101	3109±22	1432-1301 д.н.э.
CHK001.A0101	2361±22	506-390 д.н.э.
CSP001.A0101	2254±50	400-202 д.н.э.
KEN001.A0101	2170±23	357-165 д.н.э.
CSP003.A0101	2560±321	802-592 д.н.э.
CSP005.A0101	2597±23	808-774 д.н.э.
BIY001.A0101	2295±22	403-257 д.н.э.
BIY003.A0101	2227±23	378-205 д.н.э.
BIY012.A0101	2266±23	396-213 д.н.э.
KOK002.A0101	2125±22	341-57 д.н.э.
SMV001.A0101	2288±22	401-236 д.н.э.
AIG003.A0101	2236±24	384-207 д.н.э.
BSB001.A0101	2493±24	771-540 д.н.э.
BIR013.A0101	2491±33	786-490 д.н.э.
BRE013.A0101	1821±21	131-241 н.э.

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 Кыргызстана.

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.

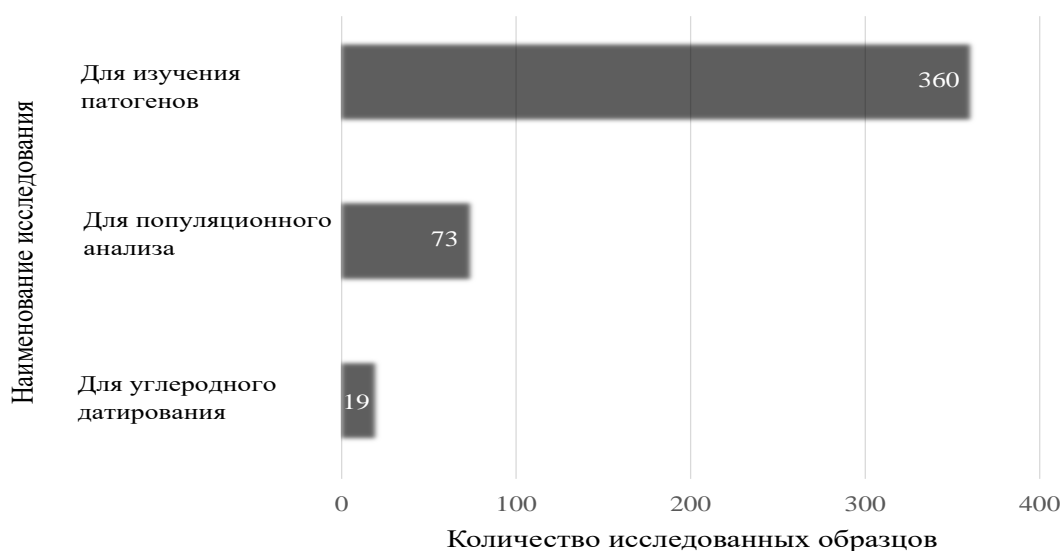
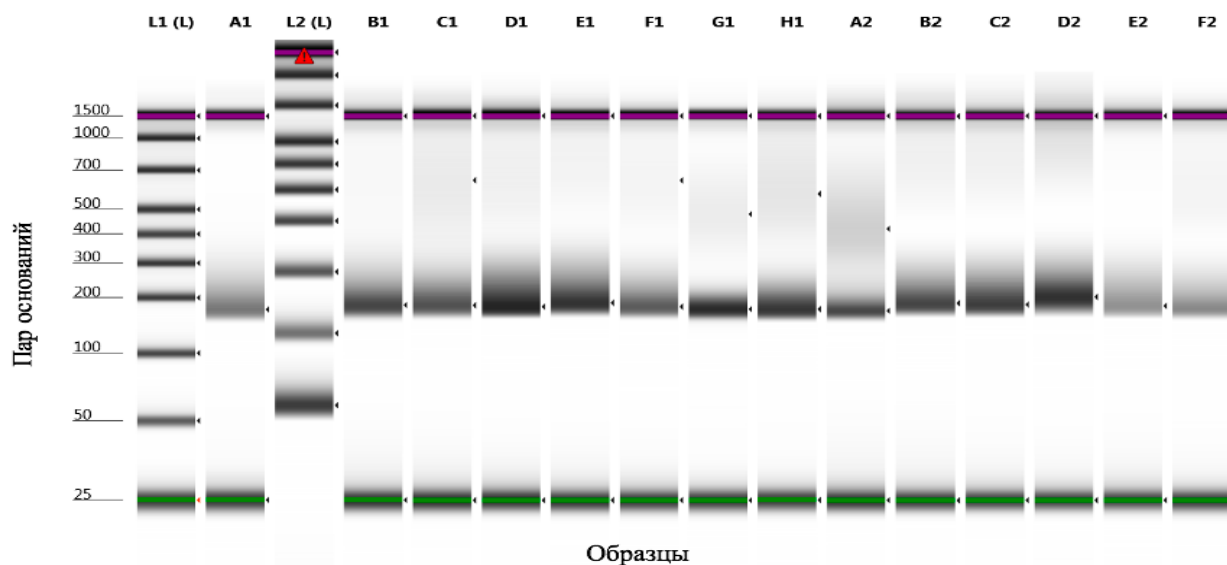


Рисунок 7 - Информация по исследованиям древних образцов

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

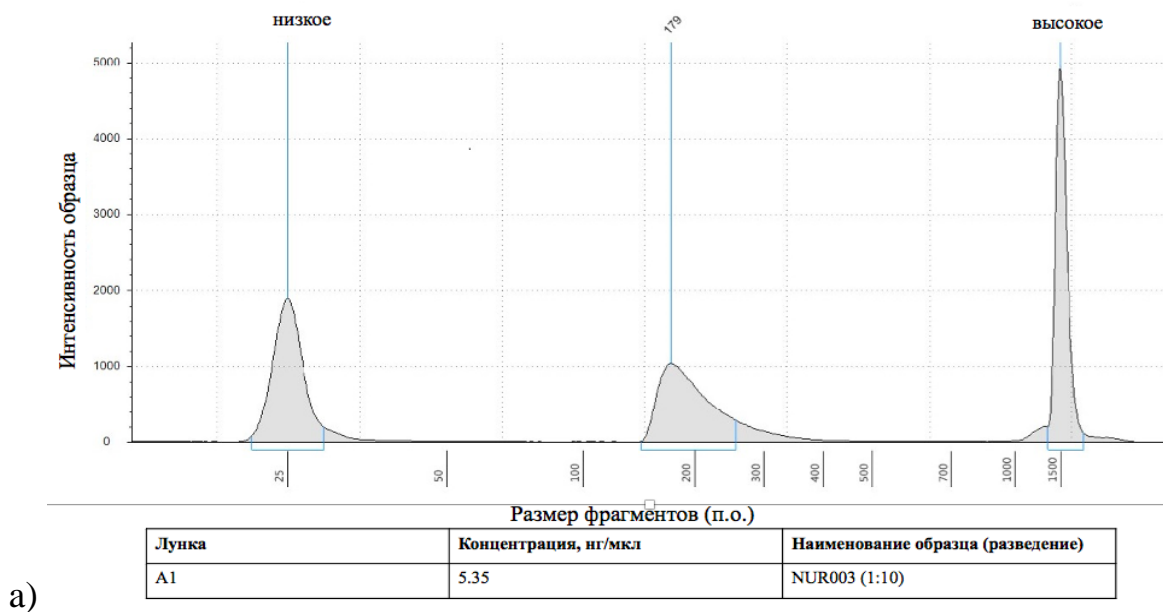
Ниже представлены результаты качественной (рисунок 8) и количественной (рисунок 9) оценки библиотек палео-ДНК.



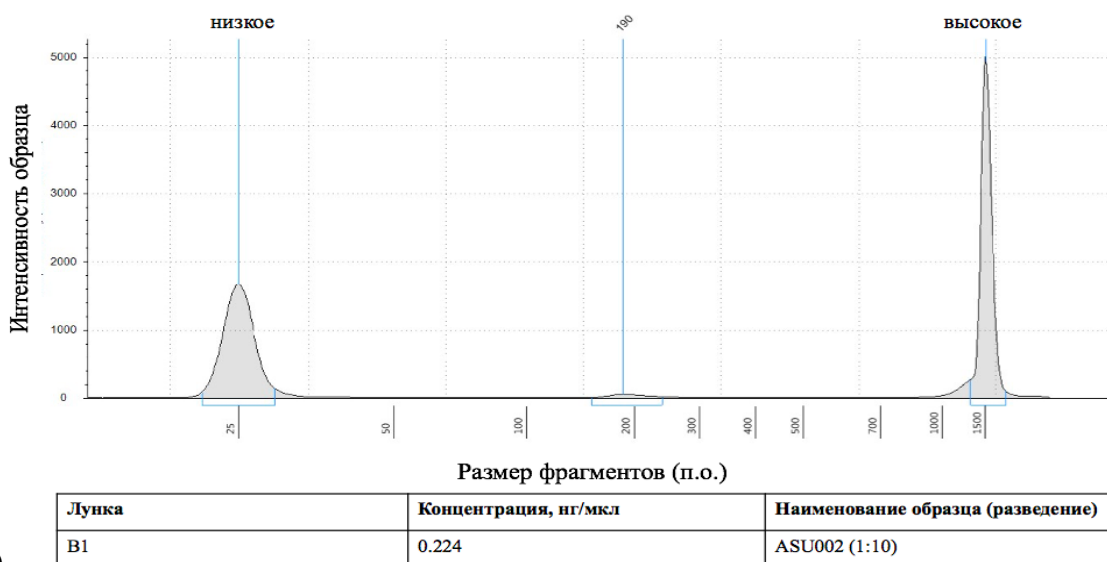
L1 (L) и L2 (L) – маркерные наборы фрагментов ДНК 25-1500 п.о. (Ladder, Agilent technologies);

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



а)



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 высокопроизводительного секвенирования. Низкая

концентрация ДНК в образце может быть объяснена по-разному, учитывая свойства древней ДНК, описанные ранее. Однако, это не помешало дальнейшему анализу, так как для образцов с низким количеством ДНК было проведено несколько циклов амплификации. Все библиотеки ДНК в дальнейшем были амплифицированы и просеквенированы.

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 фрагментации 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 высокопроизводительного секвенирования и интенсивно разрабатываемого программного обеспечения, позволяющего по химическим модификациям дифференцировать древние ДНК от современных, с использованием баз данных бактерий и вирусов и классифицировать в палео-ДНК микроорганизмы, оценить их патогенность.

3.3.1 Количественная и качественная оценка просеквенированных библиотек

Для количественной оценки просеквенированных библиотек образцов палео-ДНК был проведен количественный реал-тайм ПЦР (qPCR). Его результаты использовали для подсчёта концентрации при индексировании. Для постановки реал-тайм ПЦР был использован DyNAmo SYBER Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя вместе с праймерами IS7 и IS8 (приложение Б, таблица Б.1). Библиотеки были дважды проиндексированы [126]. При этом обязательно ставили по 2 отрицательных контроля (приложение Б, таблица Б.2) 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, США) с использованием

чипа Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 (Agilent Technology, США). 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.

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 Г, таблица Г.1) 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 Г, таблица Г.2), и второй из 183 образцов (приложение Г, таблица Г.3).

Секвенирование пулов библиотек палео-ДНК, полученных методом Shotgun, проведено на платформе Illumina HiSeq 4000.

Сырые данные секвенирования древних последовательностей ДНК были проанализированы с помощью биоинформационных подходов с использованием пакетов программного обеспечения EAGER [100], HOPS [28], адаптированных к характеристикам древних ДНК [117].

Было оценено качество прочтений, произведено картирование чтений, удалены дубликаты ПЦР, определен уровень контаминации, содержание эндогенной ДНК, соотношение митохондриальной и ядерной ДНК и др.

Оценка уровня загрязнения образцов палео-ДНК экзогенными ДНК составляет важную часть анализа. 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 их частотой [115, 120, 123]. Третий набор методов использует образцы химического повреждения, характерные для древних ДНК [108].

Сложность секвенирования древней ДНК привела к разработке специализированных лабораторных протоколов, направленных на снижение загрязнения и максимизацию количества молекул, выделяемых из древних останков.

Одной из общих особенностей древних образцов ДНК является наличие неправильно кодирующих повреждений, которые вызывают включение неправильных нуклеотидов во время амплификации ДНК.

Использование урацил-N-гликозилазы не получило широкого распространения в исследованиях с древней ДНК, поскольку количество молекул в таких образцах часто настолько мало, что фермент может разрушить все амплифицируемые последовательности. Поэтому наши библиотеки были

частично обработаны [36], тем самым уменьшая молекулярные "повреждения" в виде дезаминированных цитозинов, характерных для палео-ДНК. При частичной обработке УДГ получают библиотеки, выделенные с каждой стороны по одному нуклеотиду и заменой $C \rightarrow T$ в 5' и $G \rightarrow A$ в 3' концах, как показано в нижнем графике на рисунке 10, но встречаются случаи, когда информации недостаточно. В исключительном случае, мы проводим экспериментальную часть повторно с выделения ДНК и подготовки библиотек. 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].

В качестве критериев достоверности данных следует рассматривать известные характеристики повреждения палео-ДНК. В виду того, что несколько типов химического повреждения (дезаминирование цитозинов, депуринизация, фрагментация, окисление) могут повлиять на сохранность ДНК после смерти, определенные характеристики были количественно определены более тщательно.

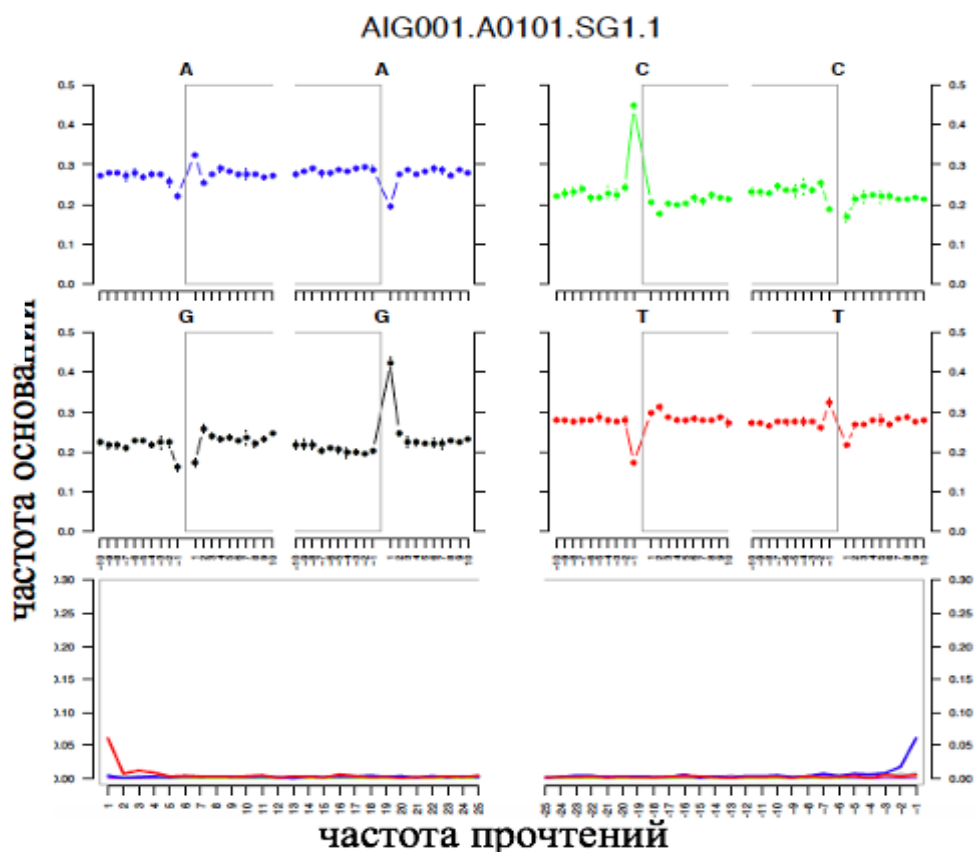
Первый - депуринизация, представляет собой гидролитический механизм, при котором пуриновые основания вырезаются из цепей ДНК. Таким образом, повышенная частота аденина (А) и гуанина (G) по сравнению с цитозином (С) и тиминем (Т), непосредственно предшествующими 5'- концам фрагментов палео-ДНК, часто считается критерием аутентичности [108].

Второй тип повреждения, обычно идентифицируемый среди данных палео-ДНК, - это гидролитическое дезаминирование С, в результате чего основание цитозина превращается в урацил (и обнаруживается как аналог тимина) [124]. Это 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 происхождения ДНК, обнаруживаемой в костных останках, в том числе ДНК эндогенных патогенных микроорганизмов.

Таким образом, прочтения анализируются по степени дезаминирования на каждой позиции всех прочтений образца. Более высокое соотношение замен цитозина на тимин на 5' конце прочтения, и аденина на гуанин на 3' конце (рисунок 10) прочтения характеризует древнюю ДНК [35].

Следует учесть, что восстановление данных высокого качества часто затруднено из-за вышеупомянутых характеристик палео-ДНК и, следовательно, требует специальной обработки образцов. Например, когда остатки урацила древней ДНК, полученные в результате посмертного дезаминирования цитозина, могут быть полностью или частично [111] быть удалены из молекул палео-ДНК с использованием фермента УДГ, чтобы избежать их вмешательства.

Рисунок 10 показывает пример качества чтения библиотек, частично обработанных палео-ДНК урацил-ДНК-гликозилазой.



Примечание – Четыре верхних мини-графика показывают частоту оснований вне и внутри считывания (открытая серая рамка соответствует считыванию), основания отмечены: синим – аденин, зеленым – цитозин, чёрным – гуанин, красным – тимин. Нижние графики представляют собой специфические замены позиций с 5' (слева) и 3' концов (справа), частота замены оснований показана на нижнем графике: красная линия – C → T в 5' и синяя линия - G → A в 3' концах

Рисунок 10 – Качество библиотек для палеогенетического анализа на примере одного образца

Для оценки повреждения палео-ДНК мы применили программное обеспечение mapDamage 2.0 [115] в пакете программ EAGER [100], с помощью которого были отфильтрованы последовательности эндогенных палео-ДНК от современных ДНК (контаминация) по характерным заменам C>T и G>A на 5' и 3' концах фрагментов древней ДНК. Для дальнейшего анализа были обрезаны по 2 нуклеотида на концах фрагментов палео-ДНК. Это позволило провести количественную оценку просеквенированных последовательностей эндогенных ДНК. Ранг прочтений палео-ДНК составил от 992228 до 20912844.

Результаты анализа данных секвенирования библиотек палео-ДНК, полученные с помощью программного обеспечения EAGER, представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что некоторые образцы представляли очень высокое содержание эндогенной ДНК: АКВ002, АКВ003, ВКВ002, ВКВ003, ВРЕ017,

BRE020, BRE022, BSK002, BRE028, BRE018, BSK002, CPA002, CSP005, KZL001, KZL004 и NUR005. Самое высокое содержание эндогенной ДНК было у образца из некрополя Каспан - CPA002 (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, KLK001, 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.

Таблица 2 – Результаты полногеномного секвенирования с использованием программного обеспечения – EAGER [100].

Образец	Число прочтений после С&М картирования	Кол-во удаленных дубликатов	Кол-во прочтений RMDup без дубликатов	Содержание эндогенной ДНК (%)	Циклы амплификации для анализа 1240К	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	<u>0,049</u>		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

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
BSB004	1025530	141	3013	0,308	2	657,55	55,56
BSK002	5823309	118965	1775365	32,53	1	120,14	57,19
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	0,04		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	0,036		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	0,02		520,34	50
ZHR003	1744673	220	3407	0,208	2	11006,14	54

Полученные характеристики образцов представляли достаточное качество, которое позволяло использовать их, как для анализа древних популяций человека, так и для анализа патогенов. Для выявления ДНК патогенных микроорганизмов с применением программного обеспечения HOPS эти образцы можно использовать. При этом надо учитывать, что в случае обнаружения патогенов в этих образцах, требуется верификация [28], при необходимости повторным выделением палео-ДНК, приготовлением новых библиотек для высокопроизводительного секвенирования.

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

Исследования показывают, что первые случаи заболевания *Y. pestis* датируются около 5000 лет назад [23]. Антисанитарные условия и скопление людей и животных сделали её опасной болезнью. 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 силватические циклы заболевания зависят от передачи специфических для вида блох-переносчиков.

Наш анализ ДНК древних штаммов *Y. pestis* и её вероятного предка *Y. 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].

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. Наши совместно исследованные геномы *Y. pestis* из позднего неолита и бронзового века (LNBA), где был включен образец ранне-железного века Кызыл (KZL002), позволил 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. 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 вспышек, характеризованный тесным контактом с инфицированными людьми [81, 135]. Также, есть случаи чумы, вызванные при контакте с инфицированными животными или их употреблением в пищу [136], что больше соответствует 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 *Y. 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 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 всех 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 В приведена таблица с результатами теста на ингибирование qPCR для всех проанализированных образцов палео-ДНК (приложение В, таблица В.1).

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 образцы 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 лишь в 330 образцах палео-ДНК, выделенных из пульпы зубов древних индивидов, представляющих археологические находки с территории Казахстана и приграничных областей России и Кыргызстан. На образцах палео-ДНК, выделенных их костных фрагментов, данный анализ не проводился.

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±005.

Рисунок 11 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 Cq и перекрывающиеся кривые ампликона в каждой позиции демонстрировали температурную однородность и равную обработку образца и стандарта независимо от положения блока.

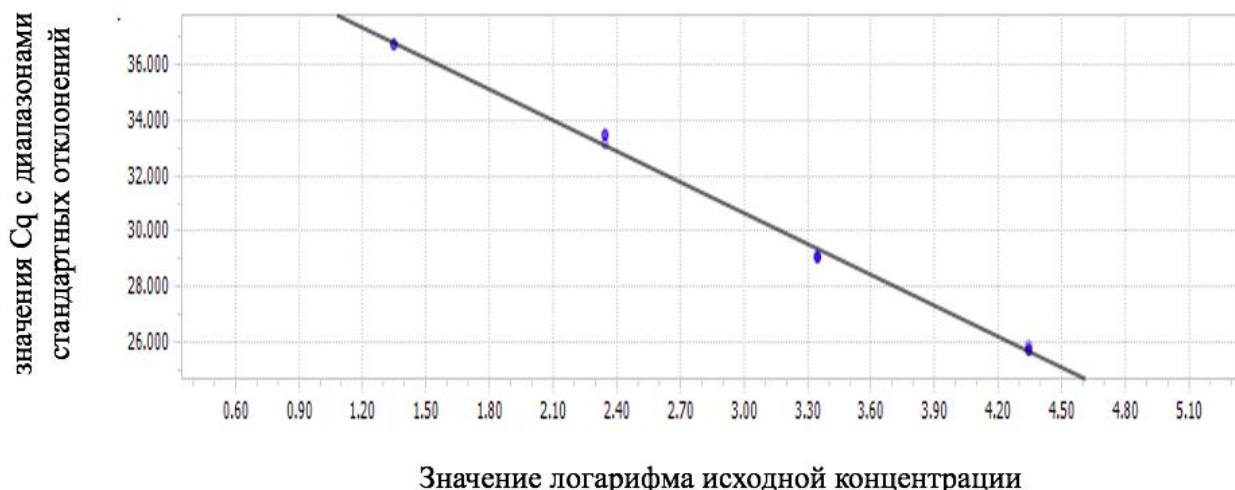
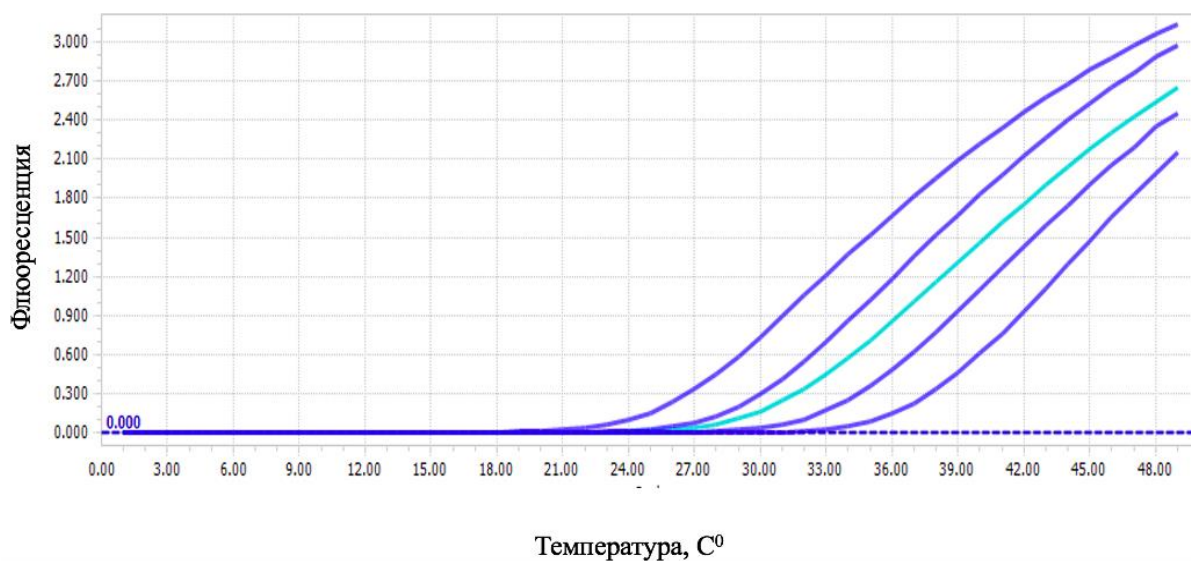


Рисунок 11 - Стандартная кривая ПЦР в реальном времени

Рисунок 12 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)

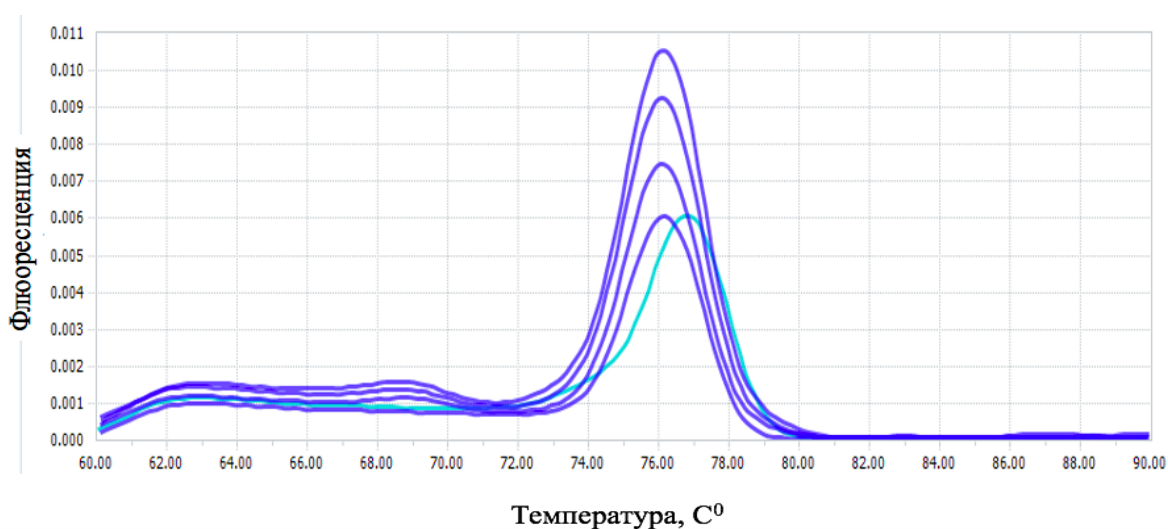
Рисунок 12 - Амплификационная кривая положительного на *Y.pestis* образца KZL002.A01 в сравнении со стандартами

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 13 представляет температуру плавления положительного на *Y. pestis* образца, который был получен в результате скрининга *pla* гена *Y. pestis* с помощью ПЦР в режиме реального времени.



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 13 - Температура плавления положительного на *Y. pestis* образца KZL002.A01 в сравнении со стандартами

При подтверждении наличия ДНК *Y. pestis* в образцах палео-ДНК ориентировались не на интенсивность флуоресцентного сигнала и концентрации ампликонов, а на амплификационные кривые (рисунок 12) и температуры плавления (рисунок 13). Как показано, в таблице 3, некоторые ложноположительные образцы показали высокий уровень сигнала (C_q) 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 3.

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 3).

Таблица 3 – 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	-

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.

3.5 Биоинформационный анализ наличия патогенных микроорганизмов в исследованных образцах ДНК

Устанавливая наличие патогенных микроорганизмов в древних останках человека, надо учитывать совокупно степень возможной постсмертной контаминации костного материала колониями микроорганизмов из окружающей среды и копияность 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, расстояния редактирования. Таким образом, установление патогенов в древних костных останках человека требует тщательного анализа и верификации.

Полногеномное секвенирование ДНК позволяет проводить крупномасштабные 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.

Представленная коллекция древних костных останков (приложение Д) 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. Концентрации библиотек палео-ДНК подбирались согласно стандартизированным методам количественной и качественной оценки (данные qPCR и анализа на TapeStation) для пула отрицательных контролей (приложение Г, таблица Г.1) и двух пулов исследуемых образцов (приложение Г, таблицы Г.2 и Г.3).

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).

Как уже упоминалось выше, 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 [1].

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.

Данные полногеномного секвенирования исследованных образцов палео-ДНК были проверены 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.

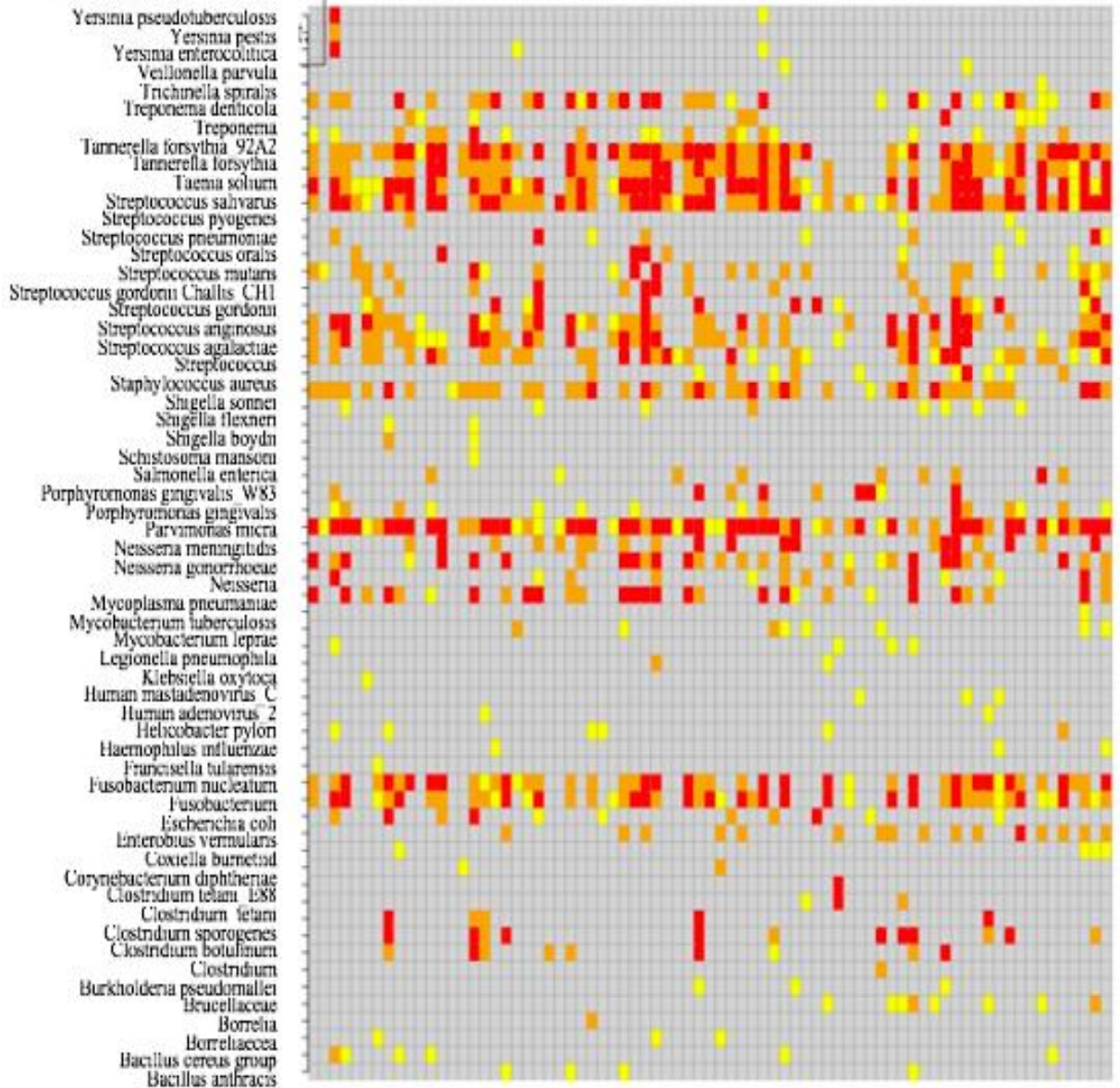
HOPS удовлетворяет всем этим критериям и позволяет получить метагеномные профили древних образцов.

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. Рисунок 14 представляет один пример данных метагеномного скрининга наших древних образцов, показывая таксономическое размещение секвенированных считываний от каждого микробного патогена, чтобы успешно их идентифицировать. Результаты этого анализа дают представление об уровнях таксономической идентификации, которые следует учитывать при поиске любого из известных запрошенных видов бактерий и вирусов в экспериментальных наборах древних данных.

Несмотря на то, что некоторые образцы показывали высокую (отмеченную красным цветом) долю смоделированных считываний ДНК патогенов на референсный геном, при дальнейшем анализе лишь часть из них была подтверждена в отношении к древним патогенам.

Доля смоделированных считываний ДНК патогенов на референсный геном

- слабая доля
- средняя доля
- сильная доля



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 археологических останков Казахстана и близлежащих территорий

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 копииности. 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 (дезаминирование, депуринизация) и оценка копииности, 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 (рисунок 15). Если секвенированные считывания относятся к референсным видам, распределение расстояний редактирования снижается, 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 значениям. 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 HOPS) [28, 142], мы получаем 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 в метагеномной выборке нет репрезентативного референсного генома в базе данных, и, следовательно, ошибочно отнесены к ближайшему генетическому совпадению,

которое может принадлежать к другому виду или даже роду. Картирование на него, как правило, приводит к увеличению количества несоответствий в чтении, что проявляется в распределении расстояний редактирования.

Напротив, если последовательное считывание совпадает с референсным геномом вида, то распределение расстояний редактирования снижается, при этом большинство чтений могут отсутствовать, либо содержать несколько несоответствий, в основном в результате повреждения ДНК или эволюционное отличие современных от древнего генома. Программа суммирует форму распределения расстояния редактирования, 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 эндогенной ДНК.

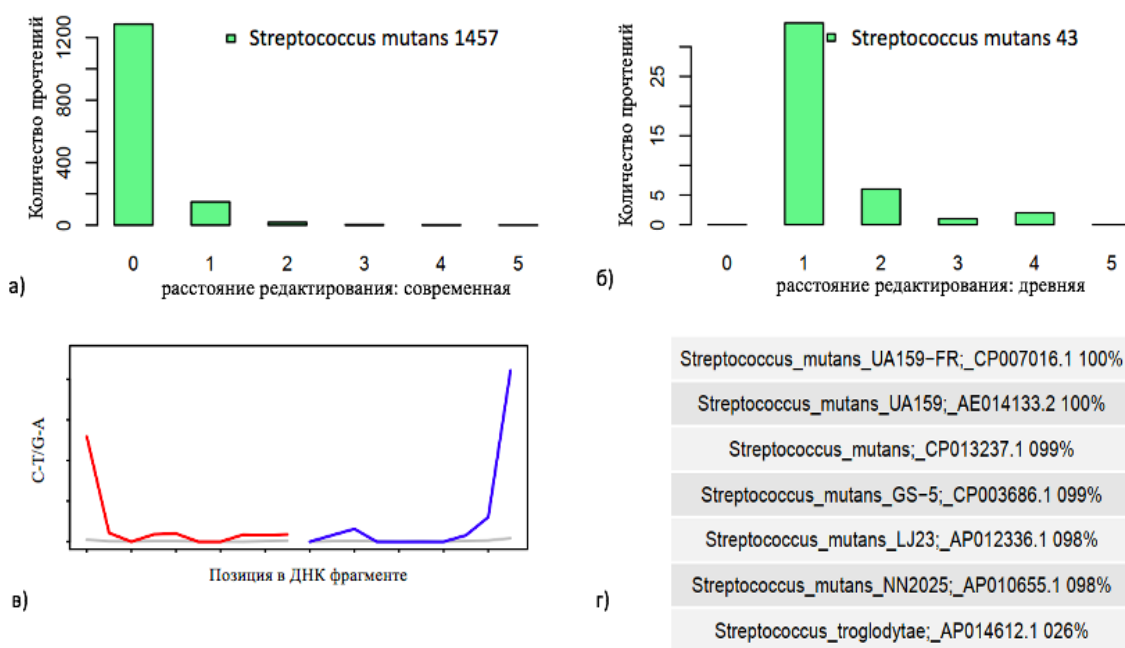
Древнее происхождение ДНК оценивается путем анализа кодирований повреждения ДНК. Наиболее заметной из наблюдаемых модификаций является дезаминирование цитозина в урацил, который считывается полимеразой как тимин. Это приводит к C>T-замещений в конце 5', и соответственно G>A замены в конце 3' [127]. Параметры постобработки требуют наличия только одного ошибочного кодирования, по крайней мере, в одном чтении, чтобы квалифицироваться как повреждение, что увеличивает до максимума чувствительность и позволяет функционировать в значительной степени независимо от глубины чтения (рисунок 15).

Наш дальнейший анализ был связан с оценкой палео-ДНК специфичной модификации считанных последовательностей ДНК патогенов, расстояний редактирования от референсных геномов древних и современных штаммов, исключения дубликатов, оценке копийности. На основании этих данных был определен уровень контаминации из окружающей среды и установлено наличие древних патогенов в костных останках.

Один из примеров положительного образца древних патогенов в данном исследовании представлены на рисунке 15 (*Streptococcus mutans*). Как пример из рисунка 15, выявленные последовательности данного образца были сравнены в базе данных BLAST (рисунок 15, г), где 100% совпадение со *S. mutans*, и дальнейшее сравнение с референсным геномом расстояния редактирования выявило 1457 п.о. (рисунок 15, а), которые относятся к современным и 43 п.о. (рисунок 15, б) в расстоянии редактирования для древних образцов. Таким образом, сравнивали все выявленные положительные образцы. Выравнивания оцениваются на наличие C>T и G>A несоответствий, типичных для палео-ДНК (рисунок 15, в).

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.

KB004.A0101.SG1.1_S0_L006_R1_001.fastq



- а) Расстояния редактирования *S. mutans* с количеством прочтений 1457 п.о. и сравнение с референсным штаммом сведенная к 0;
- б) Расстояния редактирования для древних образцов *S. mutans* с количеством прочтений 43 п.о. и отличающийся от референсного значения;
- в) Красная линия – С → Т в 5' и синяя линия - G → А в 3' концах, характерных для палео-ДНК, частично обработанных УДГ;
- г) Сравнение с базой референсных организмов в BLAST

Рисунок 15 – Положительный образец на *S. mutans*, выявленный скринингом с помощью программного обеспечения HOPS

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), Карапоки (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*, KLK002 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 mansonii*, 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: *B. recurrentis* – тиф; *C. botulinum* и *C. sporogenes* – ботулизм; *E. vermicularis* – гельминтоз (острицы); *H. influenzae* - гемофильная инфекция, *Hepatitis B* – гепатит В, *N. gonorrhoeae* – гонорея, *N. meningitidis* - менингококковый менингит, *S. enterica* и *S. mansonii* –

сальмонеллез, *S. anginosus*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. pyogenes* – стафилококковые и стрептококковые инфекции воспалительного характера, включая кариес; *T. forsythia* и *T. denticola* – парадонтоз; *V. parvula* – воспалительные инфекции гнойного характера (таблица 4).

Таблица 4 – 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>Haemophilus influenzae</i>	CPA002, CSP003, NZR002	3
<i>Hepatitis B</i>	BRE026, BRE028, BRE008, AKB003	4
<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>Mycobacterium tuberculosis</i>	NZR002	1

Продолжение таблицы 4

1	2	3
<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
<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>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
<i>Salmonella enterica</i>	CHB002, CPA002, KNL001, KNL019, KNL022, KNL025, KNL026, KNL028, KNL037, KSZ005, SGZ001	11

Продолжение таблицы 4

1	2	3
<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>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 pyogenes</i>	BKB002, CSP004, KNT004, KSZ001, MER001, PRR001, TRG002	7
<i>Trichinella spiralis</i>	BRE022, KNT001, NUR005, TND001	4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KNL014, MBL001	2
<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>Yersinia pseudotuberculosis</i>	BSK007, KNL014, MBL001, SGZ001	4

На рисунке 16 представлена диаграмма, показывающая, что самое большое процентное соотношение патогенных микроорганизмов и вирусов по итогам скрининга патогенов с использованием программного обеспечения – HOPS [28], приходит на *T. forsythia* и составляет 27%, затем *P. gingivalis*, *T.*

denticola – 22%. *F. nucleatum*, *N. meningitidis* и *S. gordonii*, *V. parvula*, *S. anginosus* составляет от 14-11%. Самое низкое значение, до 1% приходит на такие патогенные микроорганизмы, как *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *T. spiralis*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *Hepatitis B*, *H. influenzae*, *C. chauvoei* и *B. recurrentis*.

Tannerella forsythia
 Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola
 Fusobacterium nucleatum, Neisseria meningitidis
 Streptococcus gordonii
 Veillonella parvula
 Streptococcus anginosus
 Fusobacterium hwasookii, Streptococcus pneumoniae,
 Parvimonas micra, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis,
 Neisseria sicca
 Clostridium butulinum, Enterobius vermicularis, Escherichia coli,
 Neisseria gonorrhoeae, Salmonella enterica
 Clostridium sporogenes, Salmonella mansonii, Streptococcus
 agalactiae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius
 другие

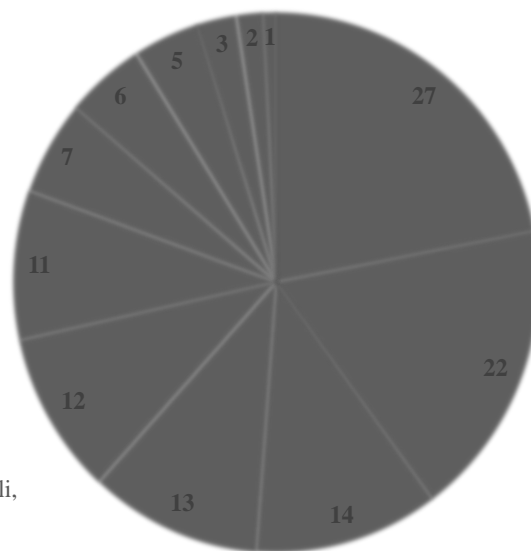


Рисунок 16 – Спектр наиболее часто встречающихся патогенных микроорганизмов в изученной выборке древних индивидов

В результате анализа древних патогенов в археологических находках территории современного Казахстана и близлежащих регионов соседних государств, очевидно, что самыми распространенными патогенами древнего мира эпохи бронзы и железного века (рисунок 16) были микроорганизмы, вызывающие кариес, заболевания десен и других мягких тканей ротовой полости (*T. denticola*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *T. forsythia*, *V. 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, отмечены у отдельных индивидов, представляющих разные некрополи. Частыми были случаи венерических заболеваний. География таких заболеваний, как сальмонеллез, весьма специфична. Это заболевание 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 *S. enterica* в древних

образцах с территории современного Казахстана, относятся к Алматинской области (Ориқты, Таргап). Один случай сальмонеллеза отмечен в Центральном Казахстане (Копа) и один – в Западном Казахстане (Сегизсай). Положительные образцы на *S. enterica*, выявленные скринингом HOPS [28]:

- 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 Ориқты, 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).

Наличие *S. enterica* в данных образцах требует верификации в результате дополнительных лабораторных исследований наличия последовательностей этой бактерии в изученных образцах палео-ДНК методами qRT-PCR.

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 HOPS анализа, чумная палочка *Y. 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 *Y. 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 17) имеет отношение к ранней истории второй пандемии чумы.

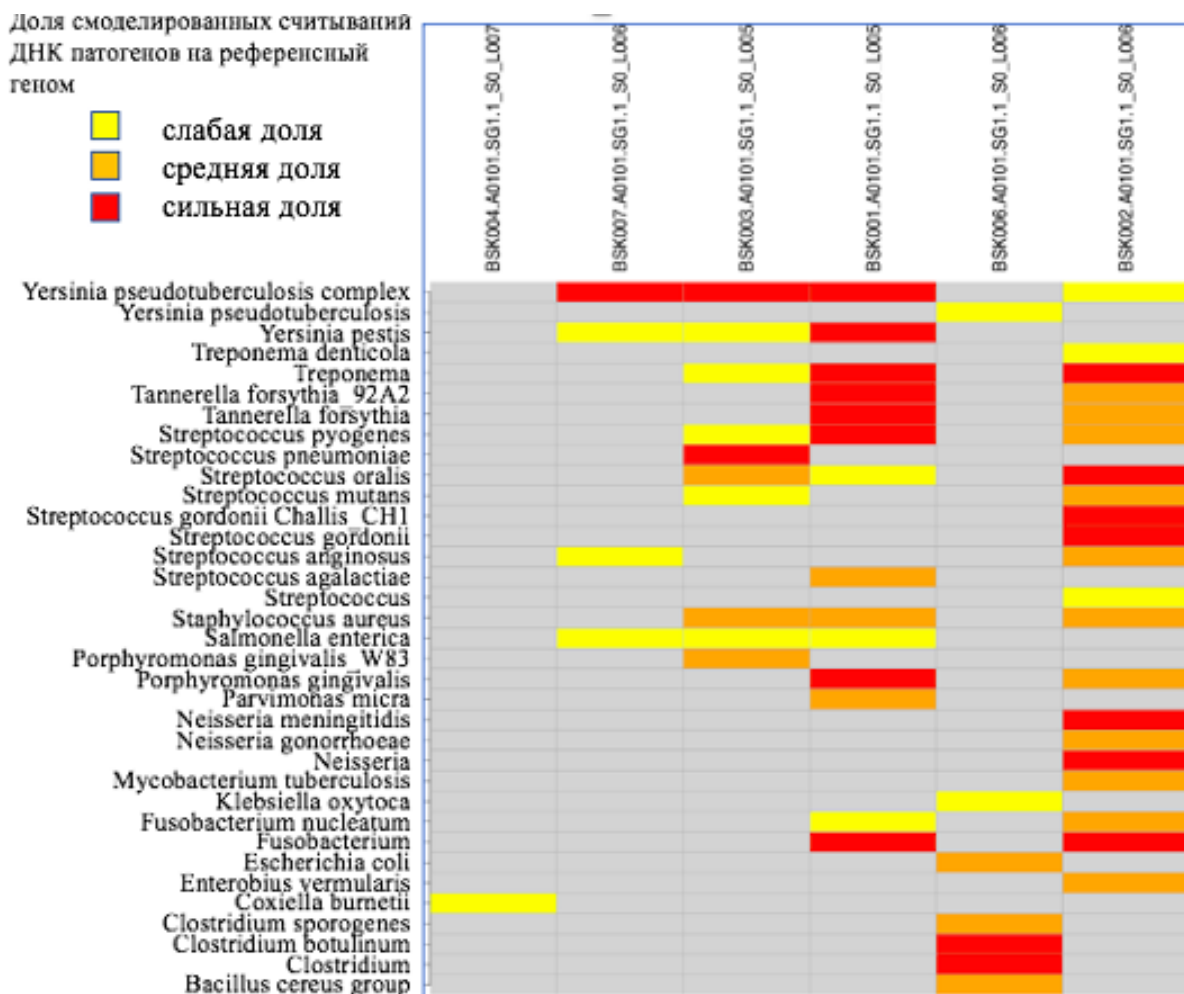


Рисунок 17 – Карта расположения несторианских кладбищ Кара-Джигач и Бурана в Кыргызстане

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 Славиным было предложено изучить эти образцы.

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, датированных 1338–1339 гг. н.э [94, 142], с

надписями, конкретно указывающими причину смерти от «эпидемии». (на сирийском языке *mawt'an'a*) [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 референсных последовательностей и наличием дезаминирования, связанного с палео-ДНК.



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 18 - Скрининг образцов из Бишкекских несторианских кладбищ (BSK) Кара-Джигач и Бурана на наличие патогенов, включая штаммы *Yersinia*, методом HOPS

Для того, чтобы проверить гипотезу о связи штаммов *Y. pestis* из несторианских кладбищ Кыргызстана, мы рассмотрели их разнообразие. Рисунок 18 демонстрирует наличие штаммов *Yersinia* в исследованных образцах из Бишкекских несторианских кладбищ, включая опасный штамм *Y. pestis* и его филогенетических предшественников (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*). Используя синтез археологических, исторических и древних геномных данных, мы демонстрируем явное участие бактерии чумы *Y. pestis* 1338–1339 гг в этом событии. Здесь также можно заметить, что выявленные при первичном скрининге с применением специфических праймеров к *pla* гену активатора плазминогена (раздел 2.2.5) и результаты (раздел 3.4.2) показывали лишь BSK001 и BSK003, но в данном анализе при скрининге с помощью программного обеспечения HOPS три из семи образцов с несторианских кладбищ показали положительные на *Y. pestis*: BSK001, BSK003, и BSK007. 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 XIV- 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 аналоги с гуннскими могильниками Забайкалья.

Стоит отметить, что вирус гепатита В, появился в Казахстане 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 Высокопроизводительное секвенирование гибридных библиотек на патогены с использованием специфических зондов

Однако, чтобы окончательно удостовериться в том, что найденные с помощью NOPS древние опасные патогены, действительно присутствуют в зубах древних людей, мы использовали высокопроизводительное секвенирование гибридных библиотек на патоген (Capture) с использованием специфических зондов к *Y. pestis* и вируса гепатита В, как описано в разделе 2.4.

3.6.1 *Yersinia pestis*

Применение данного подхода (вторичный скрининг на *Y. pestis*) позволило подтвердить наличие эндогенных древних штаммов *Y. 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

анализа полного генома *Y. pestis* показали 6,87х- и 2,60х-кратное среднее покрытие, соответственно, а также обогащение 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 оказался ниже, ~ 0,12 раз.

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 гибридизацию библиотек на *Y. pestis* с использованием специфических зондов.

Подтверждение результатов наличия древнего штамма *Y. 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 *Y. 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 *Y.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 *S. enterica* относится как раз к таким микроорганизмам.

Несмотря на высокое генетическое разнообразие *S. 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.

Первичные сведения, которые предстоит исследовать по *Salmonella enterica*, подтвержденные для образцов CPA002.A0101; KNL026.A0101; TGP001.A0101; KSZ005.A0101, так как характеризуются более слабым сигналом и находятся в процессе обработки.

Образец CPA002.A0101 из сакского некрополя Копа (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

3.6.3 Вирус гепатита В (HBV)

Применение специфических зондов на основе современного референсного генома вируса гепатита В позволило достоверно установить наличие древних вирусов гепатита В 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.

Возможность выделения ДНК вируса гепатита В из археологических человеческих останков была показана только недавно [46]. До настоящего времени реконструировано только 19 древних ДНК вирусов гепатита В 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 вирусов гепатита В.

3.7 Филогенетический и статистический анализ

Филогенетический анализ проводили для *Y. pestis* и HBV (раздел 2.6) с учетом вновь обнаруженных древних линий патогенных организмов и ранее опубликованных данных по древним и современным линиям патогенов.

Филогенетический анализ проведен в MEGA7 [42], который позволил выбрать дальнейшие действия, используя разные алгоритмы для построения филогенетических деревьев. Реконструирование филогении проводили с использованием RAxML [113]. Мы провели оценку расхождения во времени и статистического анализа с использованием байесовского подхода в программе BEAST v1.10 [104, 114] и BEAST2 [114], которая минимизирует замены связанные со смещением частот деградированной ДНК.

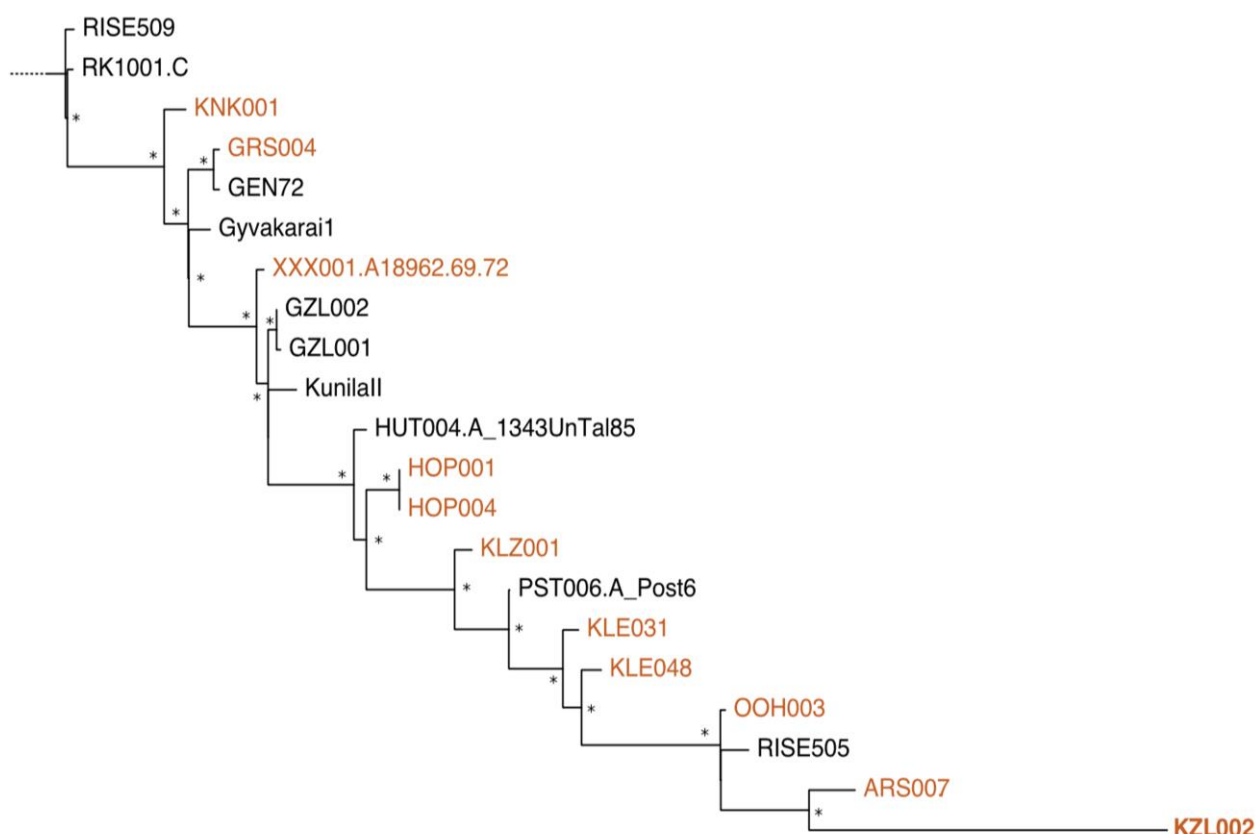
Для анализа были использованы базы данных Института наук по изучению истории человечества сообщества Макса Планка (Max Planck Institute for the Science of Human History) Йена, Германия, и, в дальнейшем, Института эволюционной антропологии сообщества Макса Планка (Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology), являющихся лидерами в области изучения 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 (*Y. pestis*), Гуннар Нейман и Александр Хербиг (*S. enterica*), Артур Кочер, Родриго Баргуэро и Александр Хербиг (вирус гепатита В).

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 референсный геном *Y. pseudotuberculosis* IP32953, который использовался в качестве внешней группы для построения филогенетического дерева.

При первичном скрининге, 30 современных геномов *Y. pestis* были исключено из анализа по причине обнаружения в них непоследовательных 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.



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-Палоуки, Чехия; HOP004 - Хостивис-Палоуки, Чехия; KLZ001 - Калужный I, Россия; KLE048 – Клейнайтинген, Германия; OOH003 – Оберотмашаузен, Германия; ARS007 – Арбулак сум, Монголия; и один образец ранне-железного века KZL002 – Кызыл, Казахстан

Рисунок 19 - Филогенетическая ветвь *Y. pestis* образцов бронзового века, включающая образец из Казахстана KZL002

На рисунке 19 показана филогенетическая ветвь, отражающая положение древнего штамма *Y. pestis* из образца некрополя Кызыл.

Анализ литературных данных показывает, что современные штаммы *Y. pestis* с измененными генетическими профилями являются редкостью [41].

Поскольку потенциально неправильные сборки или ложноположительные SNP могут повлиять на эволюционные выводы и оценки разнообразия, 30 линий были исключены, и 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, используя их в дальнейшем.

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 программного обеспечения [104, 114] было исследовано время расхождения между *Y. pestis* и его ближайшим родственником *Y. pseudotuberculosis* (рисунок 20). 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*.

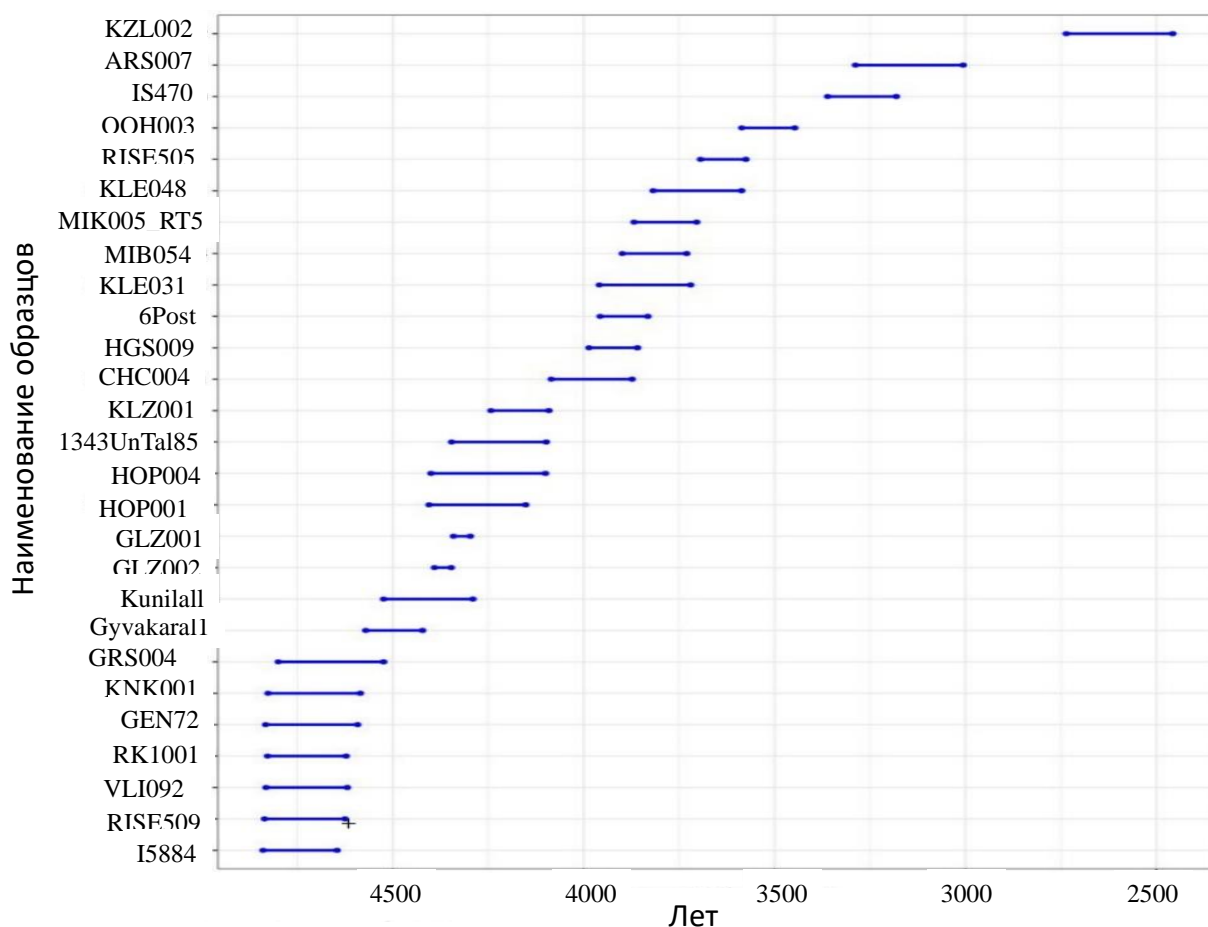
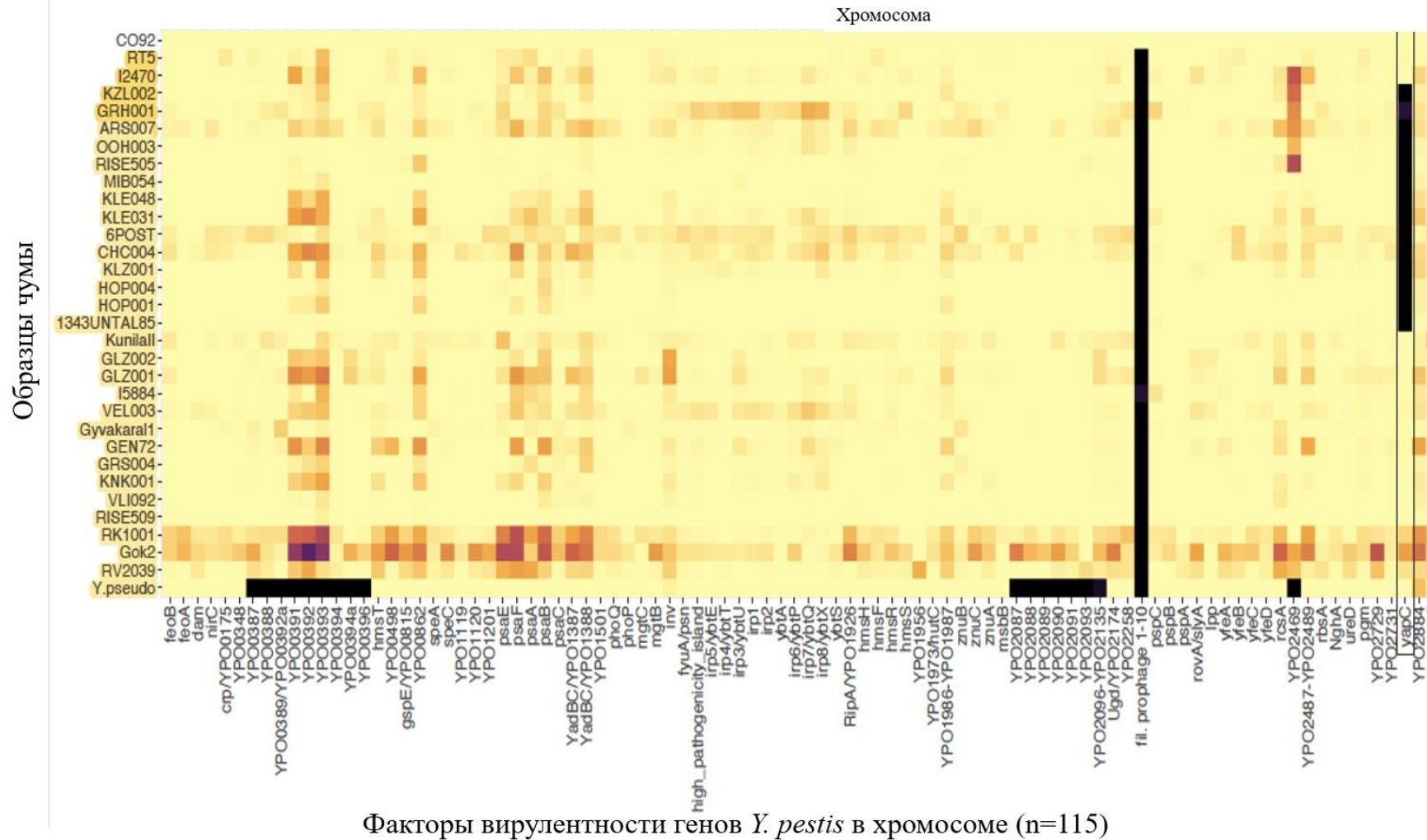


Рисунок 20 – Молекулярная датировка LNBA-линий *Y. pestis* [152]

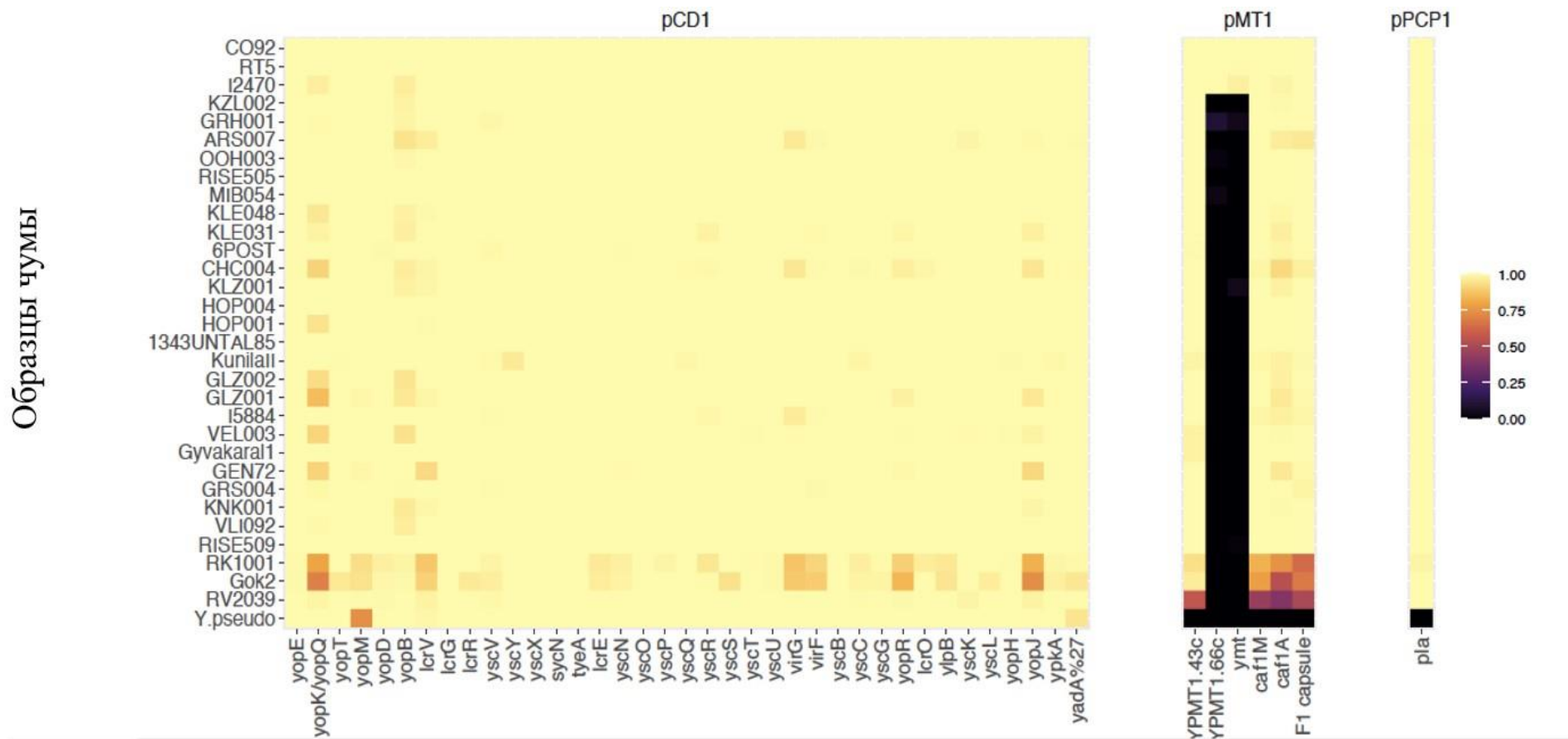
Современное разнообразие и геномный состав геномов LNBA-демонстрирует иные характеристики по сравнению с линиями, адаптированными к блохам, которые ответственны за более поздние эпидемии чумы. Чтобы проверить, произошли ли геномы монофилетической ветви LNBA-от одной популяции, которая обеспечивала постоянный источник патогена без параллельной диверсификации, мы изучили потенциальную корреляцию между генетическим и 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.



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 21 - 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 22 - Факторы вирулентности *Y. pestis* в плазмидах в плазмидах pCD1 (n=37, pMT (n=6), pPCP1 (n=1) [152]

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 *YPMT1*, 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 21 и 22).

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

Первым событием стала потеря 35 kb области, в которую входит ген *uapC*, у предковой линии 1343UnTal85 (могильник Тамула, каменный век, Эстония). За этим последовала потеря участка размером 1,5 kb, отмеченная у предка SNC004 (RISE139) (могильник Хоцивель, ранний бронзовый век, Польша). Далее была потеряна область размером 2 kb, что отмечено у предковых штаммов линий OOH003 (Погребение Обероттмарсхаузен, средний бронзовый век, Германия) и RISE505 (Кытманово, бронзовый век, Россия). Делеция размером 37 kb, включающая гены *ymt* и *YPMT1* 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 CO92, которые в сумме составили более 83 kb обнаружена в линиях GRH001 и KZL002 [152].

Таким образом, определяется взаимосвязь геномов OOH003, RISE505, ARS007, GRH001 и KZL002. Используемый алгоритм филогении определяет кладу OOH003 и RISE505 предковой для ARS007, GRH001 и KZL002 (рисунок 23). Это значит, что потеря области 37 kb произошла после отделения от общей предковой для OOH003 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 (T6SS), в частности системы секреции T6SS-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 линий, 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 *Y. 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+, знак «+» указывает на адаптацию к блохам как переносчикам), 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 штамма в линиях LNBA-.

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 датированная бронзовым веком, представляет все генетические адаптации для высокоэффективной формы передачи блох [47] (линия LNBA+). 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.

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.

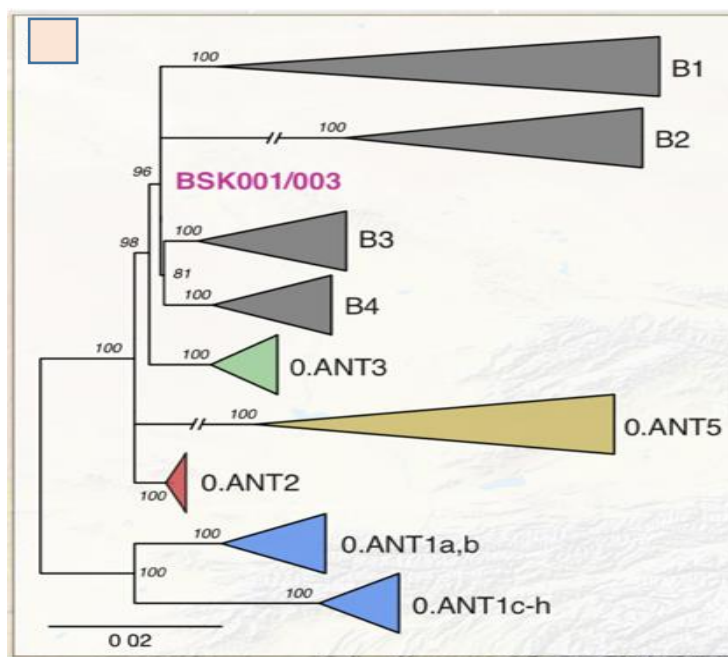
Как уже говорилось выше, полногеномные данные от 7 человек из Бишкекских несторианских кладбищ Кара-Джигач и Бурана, имеющие косвенные свидетельства наличия эпидемии в 1338–1339 гг. (надписи на надгробиях) были тщательно исследованы на наличие ДНК *Y. pestis*, с применением разных подходов (qPCR, HOPS 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 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_{Ref}C/A_{BSK001/003}; CO92 позиция - 3103976_{Ref}G/A_{BSK001/003}; CO92 позиция - 4512914_{Ref}T/G_{BSK001/003}. Два из трех идентифицированных вариантов SNP локализованы в районах с высоким числом мультиаллельных сайтов [140], а третий соответствует повреждению палео-ДНК. Эти вариации расценены нами как ложноположительные 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.



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

Рисунок 23 – Филогенетическое древо *Y. pestis*, построенное с помощью программы RAxML, отражающее позицию BSK001/003 по отношению к O.ANT ветвям, характерным для первой пандемии чумы [172].

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. Стоит учесть, что современные ветви свернуты на рисунке 23 для повышения четкости филогенетического дерева.

Филогенетический анализ максимального правдоподобия поместил BSK001/003 штаммы в предковую форму для опубликованных геномов второй пандемии чумы (рисунок 23), 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 23 – 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 диагностических SNP, определяющих ветви 1-4 и 0.ANT3, а также производное состояние во всех позициях SNP, ведущих от 0.ANT3 к N07 (рисунок 23). Таким образом, мы пришли к выводу, что BSK001/003 представляет собой штамм, являющийся прямым прародителем политомии ветви 1-4 (рисунок 23– B1-B4 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], 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 озеро 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 трансазиатских 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 вирусов гепатита В

Вирус гепатита В является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире, вызывая около миллиона смертей ежегодно. Недавние исследования древней ДНК показали, что вирус гепатита В 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, 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 вирусы гепатита В делятся на десять 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 вирус гепатита В, 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.

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, 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 24). 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 вирус гепатита В 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 вирус гепатита В. Из включенных в данное исследование образцов, представляющих Центрально-Евразийский регион, положительными на вирус гепатита В оказалось 4 образца, 2 из них относятся к раннему железному веку (АКВ003 – 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 вирусами гепатита В [118]. У всех древних индивидов определена принадлежность к D генотипу.

На сегодняшний день большинство вирусов гепатита В в Евразии относятся к генотипам А и D [41]. Мы собрали набор современных геномов вируса, включающий в себя описанное в настоящее время разнообразие вируса, добавив ранее опубликованные древние геномы вируса гепатита В [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 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.

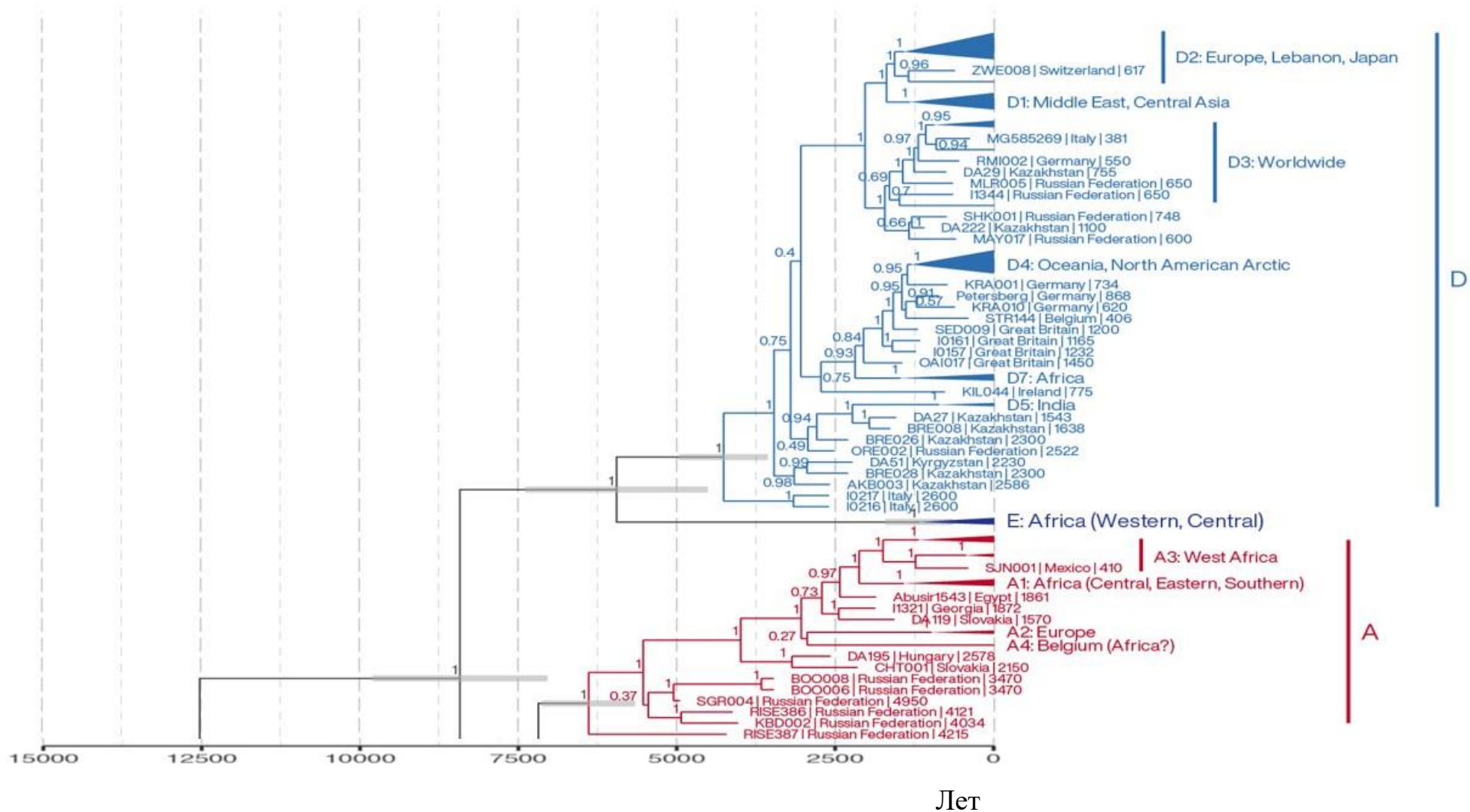


Рисунок 24 – Калиброванное по времени филогенетическое древо HBV с генотипами A и D [182]

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 24 представлена калиброванное по времени филогенетическое древо вируса гепатита В с генотипами А и D [183]. Казахские образцы охватывали 2500-3000 лет, тогда как ранние известные формы вируса гепатита В 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 Кыргызстана мы провели популяционный анализ наших археологических материалов.

3.8 Популяционный анализ древних людей

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 изученных палео-ДНК древних индивидов с территории современного Казахстана и близких районов России и Кыргызстана, с учетом всех опубликованных данных по древним и современным популяциям Евразии. В анализ включены все представленные в данной работе образцы, за исключением образцов с низким содержанием эндогенной ДНК человека.

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, Байдак, 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 Казахстанской 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, сяньбей-хунны.

Поскольку включенные в данный анализ, датированные разным временем, древние индивиды с некрополя Берел (таблица 5) демонстрируют разнообразие древних патогенов (рисунок 25), это может свидетельствовать об активном общении разных популяций и богатой миграционной истории горного Алтая.

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.

Таблица 5 – 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.
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_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.

Стоит отметить, что древние патогены горного Алтая 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 5).

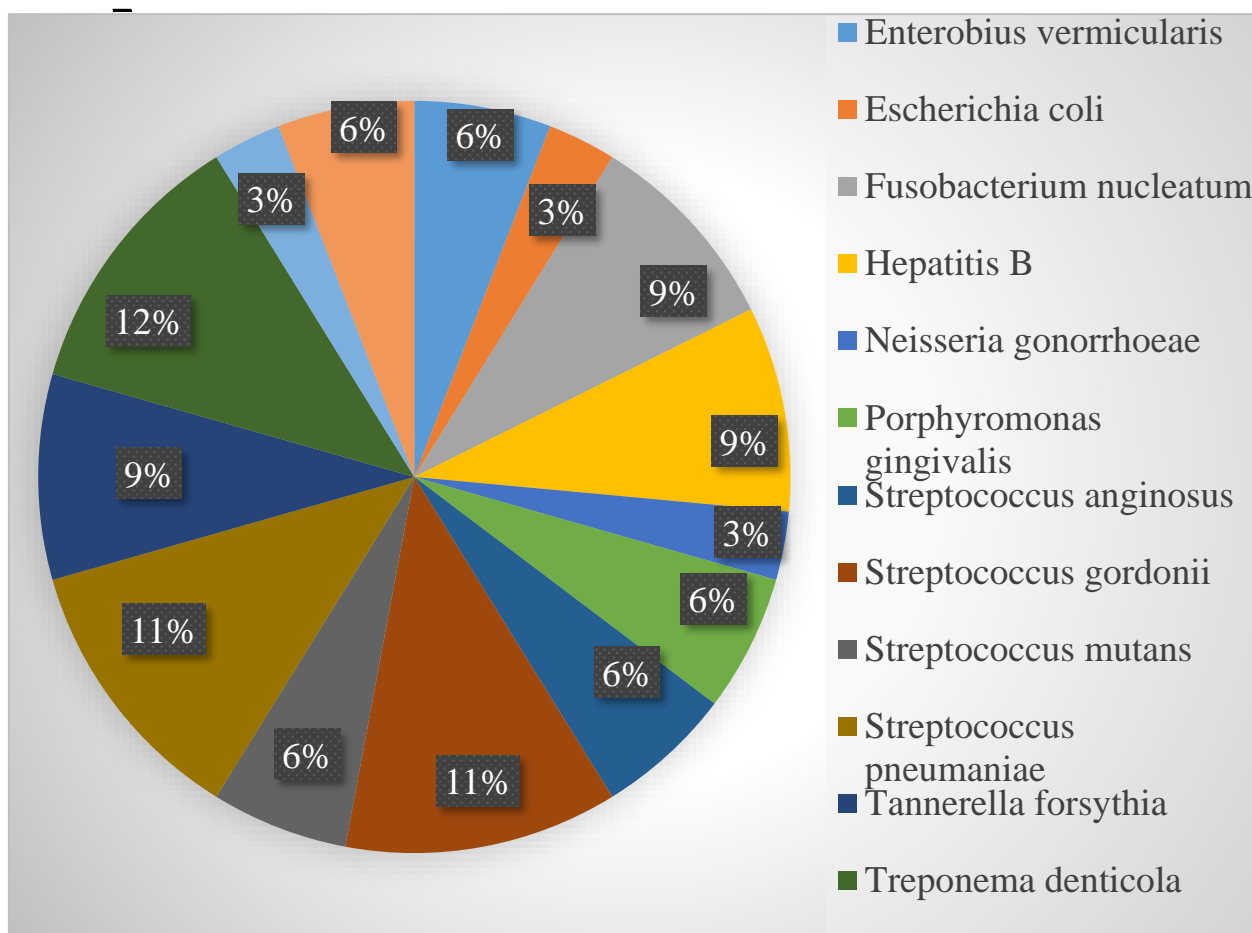


Рисунок 25– Разнообразие патогенных микроорганизмов и вирусов в костных останках человека с некрополя Берел.

Данные свидетельствуют 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 вирусов гепатита В с территории Казахстана к филогенетической группе D определяет возможность проникновения вируса гепатита В в Центрально-Евразийские степи из Европы. Тот факт, что генотип D вируса гепатита В 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 вирусы гепатита В 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.

Анализ также 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 вирус гепатита В 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 вирус гепатита В 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 (205 древних индивидов), Кыргызстана (120 древних индивидов) и России (35 древних индивидов).

Получено 360 качественных образцов палео-ДНК и созданы соответствующие библиотеки для высокопроизводительного 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 высокопроизводительного 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). 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) вируса гепатита В, датированных периодом от ~10 500 до ~400 лет назад показал, что казахстанские древние вирусы гепатита В характеризуются генотипом D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современным вирусам гепатита В (A и D генотипы).

Наличие древних штаммов *Y. 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 *YPMT1*). 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 *Y. pestis* в Центральной Евразии и Европе осуществлялось параллельными путями. Широкое географическое распространение линий LNBA- и тот факт, что *Y. 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 *Y. 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.

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 вирус гепатита В и *Y. pestis*, с популяционной историей древних индивидов-носителей патогенов согласуется с историей связанных человеческих сообществ.

Данные высокопроизводительного 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; 4 индивида – носителя штамма *Y. pestis*. Данные полногеномного секвенирования 360 образцов введены в базу PANDORA (Институт эволюционной антропологии сообщества Макса Планка, Лейпциг, Германия).

Выводы:

1. Для анализа древних патогенов 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 (205 древних индивидов), Кыргызстана (120 древних индивидов) и России (35 древних индивидов).

2. Скрининг на патогенные организмы выявил наличие 36 древних штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов в изученных палео-ДНК. Самыми распространенными патогенами были микроорганизмы, вызывающие кариес, заболевания десен и других мягких тканей ротовой полости (*T. denticola*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *T. forsythia*, *V. parvula* и др.). Встречались случаи венерических заболеваний. Такие опасные заболевания, как гепатит В, чума (*Y. pestis*), сальмонеллез (*S. enterica*) отмечены только у единичных индивидов.

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

4. Штамм *Y. pestis* раннежелезного века из некрополя Кызыл кластеризуется с другими образцами LNBA, для которых подтверждено присутствие предкового, менее инфекционного варианта *pla* гена. В результате протяженных делеций и псевдогенизации некоторые штаммы лишены генов, ответственных за вирулентность (ген адгезии *yapC*), отклонение 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 *Y. pestis* из несторианских кладбищ Кыргызстана (BSK001 и BSK003) являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы 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-Després 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. Fu, Qiaomei, Alissa Mittnik, Philip L. F. Johnson, Kirsten Bos, Martina Lari, Ruth Bollongino, Chengkai Sun, et al. 2013. “A Revised Timescale for Human Evolution Based on Ancient Mitochondrial Genomes.” *Current Biology: CB* 23 (7): 553–559.
12. Noonan J.P., Hofreiter M., Smith D., Priest J.R., Rohland N., Rabeder G., Krause J., Deter 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., Marić 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. Haak, Wolfgang, Iosif Lazaridis, Nick Patterson, Nadin Rohland, Swapan Mallick, Bastien Llamas, Guido Brandt, et al. 2015. “Massive Migration from the Steppe Was a Source for Indo-European Languages in Europe <<https://doi.org/10.1038/nature14317>>.” *Nature* 522: 207–211.
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. Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P- L. F. & Orlando, L. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* **29**, 1682–1684 (2013).
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. Huson D.H., Auch A.F., Qi J., Schuster S.C. MEGAN analysis of metagenomic data (2007) *Genome Research*, 17 (3) , pp. 377-386.
33. Meyer M., Kircher M. Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing // *Cold Spring Harb. Protoc.* -2010, pdb.prot5448.
34. Price, A. L. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **38**, 904–909. <https://doi.org/10.1038/ng1847> (2006).
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. Franziska Aron, Gunnar U Neumann, Guido Brandt 2020. Half-UDG treated double-stranded ancient DNA library preparation for Illumina sequencing. protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bmh6k39e>
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., Vågene 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, Sagiyeu 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 Valtue~na 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. Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014)
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. Sagulenko, P., Puller, V. & Neher, R. A. TreeTime: maximum-likelihood phylodynamic analysis. *Virus Evol.* **4**, vex042 (2018)
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., Korneliussen T.S., Dalal J., Renaud G., Albrechtsen A., Nielsen R., Malaspinas 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 К., 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., Dzharparova 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. Neumanna, 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. Hąuszczoo, 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., Gnechchi 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., Mitnik 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., Shneider 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., Ramsel

P.C., Akar M., Yener K.A., Ballesterio 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 Bissembaev, 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Образцы из Института и музея антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова

Таблица А.1 – Информация отобранная для анализа образцов из каталога [23]

#	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 А.1

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 перенаправлен 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 А.1

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.	множественные
10	Шамси, Чолпонский р-н, Киргизская ССР; А.К. Кибиров, Н.Н.Миклашевская, 1952 г.	#557: ПВ М2		I пол. I тыс. н.э.	единичные
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: ЛП 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.	множественные
12	Иссык-Куль /оз./, Семиреченская обл.; Поярков, 1896 г.	#4197: ПВ Р1;	#4195, 4196, 4198*: нет зуб	IV вв	множественные

Продолжение таблицы А.1

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 не было зубов	#643* нет зубов	Усунь- ское время	единич- ные

Продолжение таблицы А.1

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 А.1

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: левая височная кость, отправлена в Йену	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 А.1

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: ЛВ клык	#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 А.1

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.	множественные
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.	множественные
37	Воробьёво, Шадринский р-н, К - ская обл.; В.Е.Стоянов, 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, височная кость отправлена в Йену	V-II д.н.э.	множественные
<p>Примечание: * Информация на черепе верная, могли сделать ошибку, внося в Каталог [23] ПВ - правый верхний; ПН – правый нижний; ЛВ - левый верхний; ЛН - левый нижний</p>					

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Индексирование для создания библиотек ДНК

Таблица Б.1 - 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
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

Продолжение таблицы Б.1

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_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
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

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0671	GTACCGAG	P5_Jen_8nt_0330	CATTAGCA	KSZ001.A010
P7_Jen_8nt_0665	GGAАCTTC	P5_Jen_8nt_0323	ATGGCCTA	AKS001.A010
P7_Jen_8nt_0628	CAGACCTT	P5_Jen_8nt_0733	CGAGTACG	KKM001.B010
P7_Jen_8nt_0223	ATGCTTAG	P5_Jen_8nt_0304	AACTACCT	SBT001.A010
P7_Jen_8nt_0278	TATATTGA	P5_Jen_8nt_0353	GAGCAAGG	ADJ006.A010
P7_Jen_8nt_0284	TCCTGAGA	P5_Jen_8nt_0741	CGTACGCC	AKC001.A010
P7_Jen_8nt_0672	GTAGAAGT	P5_Jen_8nt_0705	AATGCTCG	ADJ013.A010
P7_Jen_8nt_0678	TAGTAGAG	P5_Jen_8nt_0305	AACTAGTC	ADJ005.A010
P7_Jen_8nt_0611	ACTTGCAG	P5_Jen_8nt_0702	AAGGTTCA	KSZ007.A010
P7_Jen_8nt_0609	ACTGGAGC	P5_Jen_8nt_0784	TCCGCTCT	ADJ012.A010
P7_Jen_8nt_0600	AAGGTTCA	P5_Jen_8nt_0792	TACTCCT	ADJ004.A010
P7_Jen_8nt_0230	CCAATGGA	P5_Jen_8nt_0789	TGGACTAT	KSZ006.A010
P7_Jen_8nt_0619	AGTTATGC	P5_Jen_8nt_0393	TGGTTAAG	ADJ011.A010
P7_Jen_8nt_0612	AGAAGCAT	P5_Jen_8nt_0732	CCTTCCGA	ADJ003.A010
P7_Jen_8nt_0671	GTACCGAG	P5_Jen_8nt_0302	AACGCCAT	KSZ005.A010
P7_Jen_8nt_0621	ATAGCTTG	P5_Jen_8nt_0304	AACTACCT	ADJ010.A010
P7_Jen_8nt_0695	TTCCGGTC	P5_Jen_8nt_0783	TCATTGCT	KSZ004.A010
P7_Jen_8nt_0631	CATTGCCA	P5_Jen_8nt_0315	AGTCAGTC	ADJ009.A010
P7_Jen_8nt_0266	GGTCAGAT	P5_Jen_8nt_0747	CTTAAGAA	KSZ003.A010
P7_Jen_8nt_0605	ACGAGGAA	P5_Jen_8nt_0771	GTAGCAAT	ADJ008.A010
P7_Jen_8nt_0615	AGATGCGA	P5_Jen_8nt_0775	TAGCTGAT	CTA001.A010
P7_Jen_8nt_0667	GGAGTATG	P5_Jen_8nt_0762	GCTCCATC	UCH002.A010
P7_Jen_8nt_0219	AGTTGAAC	P5_Jen_8nt_0385	TCTAGAGG	CHB002.A010
P7_Jen_8nt_0212	AATAAGGA	P5_Jen_8nt_0774	TACTACGG	DYU001.A010
P7_Jen_8nt_0286	TCGCGGAT	P5_Jen_8nt_0321	ATGCGAAG	UCH001.A010
P7_Jen_8nt_0237	CGTAGGCA	P5_Jen_8nt_0764	GGAAGCTC	KRV001.A010
P7_Jen_8nt_0646	CTGCCTCG	P5_Jen_8nt_0720	ATATGGAT	ALH002.A010
P7_Jen_8nt_0686	TCTCCGTC	P5_Jen_8nt_0730	CCATTGAG	SHS003.A010
P7_Jen_8nt_0203	AACGCGCA	P5_Jen_8nt_0772	GTCCGAAT	BIS003.A010
P7_Jen_8nt_0295	TTATAACT	P5_Jen_8nt_0722	ATTAATAG	KUS011.A010
P7_Jen_8nt_0241	CTATTCAT	P5_Jen_8nt_0739	CGGTAAGA	AKS002.A010
P7_Jen_8nt_0257	GCGACCTG	P5_Jen_8nt_0361	GCGGTAGA	KSZ002.A010
P7_Jen_8nt_0636	CGCCTATG	P5_Jen_8nt_0344	CTAATTGG	ADJ007.A010
P7_Jen_8nt_0628	CAGACCTT	P5_Jen_8nt_0367	GGCCGCGA	SHS002.A010
P7_Jen_8nt_0289	TCTCTCTG	P5_Jen_8nt_0765	GGACCGTC	ALH001.A010
P7_Jen_8nt_0294	TGGAAGGT	P5_Jen_8nt_0332	CCAATGGT	SHS001.A010
P7_Jen_8nt_0209	AAGACCAG	P5_Jen_8nt_0738	CGCTCTGG	BIS002.A010
P7_Jen_8nt_0647	CTTCATGG	P5_Jen_8nt_0744	CTCGCGAG	ADJ002.A010
P7_Jen_8nt_0643	CTCTATCG	P5_Jen_8nt_0789	TGGACTAT	AGJ001.A010
P7_Jen_8nt_0632	CCGAATTG	P5_Jen_8nt_0360	GCGCCTCA	ADJ001.A010
P7_Jen_8nt_0670	GTAATTAT	P5_Jen_8nt_0310	ACGTCTGG	SHS004.A010
P7_Jen_8nt_0685	TCGGTCAT	P5_Jen_8nt_0364	GGATCGAG	UCH004.A010
P7_Jen_8nt_0622	ATAGTCAA	P5_Jen_8nt_0766	GGCAGGCC	CHB003.A010
P7_Jen_8nt_0657	GATCTTCC	P5_Jen_8nt_0314	AGAAGGTA	UCH003.A010

Продолжение таблицы Б.1

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_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_0251	GAACTAAG	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	GGAACTTC	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_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
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

Продолжение таблицы Б.1

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_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
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	AAGGTTCA	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
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_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_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

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5
P7_Jen_8nt_0241	CTATTCAT	P5_Jen_8nt_0331	CCAAGAGA	CSP003.A0101
P7_Jen_8nt_0280	TCAACTTG	P5_Jen_8nt_0330	CATTAGCA	CSP004.A0101
P7_Jen_8nt_0638	CGGAAGAG	P5_Jen_8nt_0360	GCGCCTCA	CSP005.A0101
P7_Jen_8nt_0693	TTAGGATG	P5_Jen_8nt_0731	CCTATATG	AIG001.A0101
P7_Jen_8nt_0635	CCTTCAGG	P5_Jen_8nt_0754	GATCGCTC	AIG002.A0101
P7_Jen_8nt_0296	TTCGTCGG	P5_Jen_8nt_0371	GTAGAAGC	AIG003.A0101
P7_Jen_8nt_0255	GCCTAACT	P5_Jen_8nt_0775	TAGCTGAT	AIG004.A0101
P7_Jen_8nt_0243	CTGAGTTC	P5_Jen_8nt_0386	TCTGATAA	AIG005.A0101
P7_Jen_8nt_0283	TCCGTATA	P5_Jen_8nt_0766	GGCAGGCC	AIG006.A0101
P7_Jen_8nt_0628	CAGACCTT	P5_Jen_8nt_0737	CGCCTTGC	SRO001.A0101
P7_Jen_8nt_0690	TGCTAACG	P5_Jen_8nt_0385	TCTAGAGG	WAR001.B010
P7_Jen_8nt_0288	TCGTCGCC	P5_Jen_8nt_0320	ATGATCTG	BRE016.A0101
P7_Jen_8nt_0689	TGATCTCA	P5_Jen_8nt_0376	TAACGCTT	BRE017.A0101
P7_Jen_8nt_0641	CTCAGTCT	P5_Jen_8nt_0326	CAACGCAG	BRE018.A0101
P7_Jen_8nt_0626	ATGGTACT	P5_Jen_8nt_0789	TGGACTAT	BRE019.A0101
P7_Jen_8nt_0604	ACCGTTGA	P5_Jen_8nt_0722	ATTAATAG	BRE020.A0101
P7_Jen_8nt_0615	AGATGCGA	P5_Jen_8nt_0714	AGCCGAGG	BRE021.A0101
P7_Jen_8nt_0223	ATGCTTAG	P5_Jen_8nt_0707	ACCGCGTT	BRE022.A0101
P7_Jen_8nt_0654	GAGGACCT	P5_Jen_8nt_0746	CTGGACGA	BRE026.A0101
P7_Jen_8nt_0683	TCGAATAA	P5_Jen_8nt_0767	GGCAGTAT	BRE027.A0101
P7_Jen_8nt_0215	ACTTAACG	P5_Jen_8nt_0384	TCGCTTCC	BRE028.A0101
P7_Jen_8nt_0258	GCTACGTA	P5_Jen_8nt_0747	CTTAAGAA	BSB001.A0101
P7_Jen_8nt_0629	CATAACGT	P5_Jen_8nt_0353	GAGCAAGG	BSB002.A0101
P7_Jen_8nt_0627	CAGAATAT	P5_Jen_8nt_0375	GTTCGCAG	BSB003.A0101
P7_Jen_8nt_0235	CGGCATTC	P5_Jen_8nt_0725	CAGCTTGG	BSB004.A0101
P7_Jen_8nt_0639	CGTAGATC	P5_Jen_8nt_0315	AGTCAGTC	KBU001.A0101
P7_Jen_8nt_0678	TAGTAGAG	P5_Jen_8nt_0702	AAGGTTCA	KBU002.A0101
P7_Jen_8nt_0622	ATAGTCAA	P5_Jen_8nt_0709	ACTGCCTC	KBU003.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_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

Таблица Б.2 - 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	AGGTTCGAA	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	CCGTTCAT	LIB052.A0123
P7_Jen_8nt_0423	ATTATCGA	P5_Jen_8nt_0581	TCCGATGG	LIB052.A0124
P7_Jen_8nt_0482	TCGTTCGA	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	GTTAACTA	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	TCGTTCGA	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
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	CCGTTCAT	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 В

Тест на ингибирование ПЦР в реальном времени

Таблица В.1 - Результаты теста на ингибирования

№	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

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6
55	G7	BRO001.A01	04.04.2019 (3)	18,09	-2,2725
56	H7	BTK001.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

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6
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
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

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6
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

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6
177	A5	ALN001.A01	07.04.2019 (7)	19,43	-1,1875
178	B5	ALN002.A01	07.04.2019 (7)	19,46	-0,845
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

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6
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
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

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6
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

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6
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
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 Г

Библиотеки для секвенирования

Таблица Г.1 - Концентрации библиотек 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

Таблица Г.2 - Концентрации библиотек для пула 149 образцов

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

Продолжение таблицы Г.2

1	2	3	4	5	6
ZHR003	218	12,9	96,9	0,86	89,71
CLK002	212	19,9	158	0,53	94,88
NZR002	282	14,6	100	0,83	89,38
KEN001	288	13,8	90,4	0,92	84,26
BKB004	290	11	73	1,14	88,42
NUR005	317	13,8	86	0,97	85,72
CLK001	263	9,4	64,3	1,30	85,17
AIG001	235	5,63	39,8	2,09	84,25
AIG002	236	8,44	59,6	1,40	88,1
AIG003	235	8,52	60,7	1,37	88,74
AIG004	240	10,1	70,3	1,19	90,09
AIG005	238	13,2	92,8	0,90	90,9
AIG006	230	2,54	18,9	4,41	65,93
BRE016	232	12,3	89,3	0,93	89,93
BRE017	22	13,4	98,2	0,85	91,4
BRE018	22	8,91	65	1,28	85,44
BRE019	229	9,97	72,7	1,15	90,47
BRE021	228	10,1	73,5	1,13	91,06
BRE022	210	6,72	51,8	1,61	84,29
BRE027	210	8,79	68,1	1,22	88,11
BRE028	206	7,1	55,6	1,50	87,8
BRE020	213	7,33	55,9	1,49	88,82
BRE026	230	11,5	82,7	1,01	92,16
BSB001	230	11,5	82,2	1,01	88,53
BSB002	222	9,96	73,5	1,13	87,98
BSB003	234	11,6	81,6	1,02	90,84
BSB004	212	9,87	76,9	1,08	90,25
CSP001	227	8,88	63,9	1,30	86,58
CSP002	247	5,61	40,6	2,05	77,98
CSP003	242	11,5	79,7	1,05	88,94
CSP004	212	2,36	69,35	1,20	69,35
CSP005	234	8,47	60,8	1,37	60,85
KBU001	233	7,36	52	1,60	85,87
KBU002	217	3,35	25,4	3,28	75,62
KBU003	223	11	82,7	1,01	88,55
KLK001	212	8,58	66,7	1,25	86,96
KLK002	229	11,6	85,5	0,97	89,71
KUS002	204	4,55	36,1	2,31	82,8
KUS003	214	1,82	13,9	6,00	63,48
KUS004	236	1,41	10,4	8,01	63,17

Продолжение таблицы Г.2

1	2	3	4	5	6
KUS005	242	6,23	44	1,89	78,19
KUS006	209	10,3	81,9	1,02	90,22
KUS007	241	2,96	21,6	3,86	64,36
KUS008	246	12,4	86,2	0,97	92,1
KUS013	245	8,25	56,9	1,46	83,47
SRO001	248	10,5	71,8	1,16	90,44
WAR001	226	6,32	46,3	1,80	85,25

Таблица Г.3 - Концентрации библиотек для пула 183 образцов

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

Продолжение таблицы Г.3

1	2	3	4	5	6
SMY006	215	4,25	32,3	2,54	79,99
BGY001	210	5,93	46,3	1,77	86,39
SBT001	222	4,93	36,6	2,24	78,83
SMY007	246	14,3	98	0,84	90,13
KZB001	240	8,42	59,7	1,37	85,78
TND001	217	12	91,7	0,89	90,39
TGP001	228	9,64	70	1,17	90,64
KZK001	220	13,8	105	0,78	92,58
SMY001	245	14,5	99,7	0,82	93,03
SGZ001	227	12,1	89,3	0,92	90,54
KRM001	237	19,8	142	0,58	91,76
SMY002	231	21,6	158	0,52	91,66
KTS001	246	21,4	155	0,53	89,84
SMY003	217	10	74,8	1,10	89,51
AKE001	240	14,2	100	0,82	92,53
SMY004	242	18	126	0,65	90,31
SGZ002	230	11,7	85,3	0,96	89,28
KSH004	230	10,1	72,9	1,12	87,03
KNT005	251	13,3	90	0,91	92,13
KRY001	259	11,3	74,2	1,10	89,38
SRK001	217	6,99	52,1	1,57	86,57
KNL007	227	11,6	84,1	0,97	90,05
TAL003	228	8,9	63,8	1,28	89,47
KYZ002	256	14,1	93,1	0,88	92,91
KNL008.	244	15,8	111	0,74	88,14
TAL004	232	11,6	83,9	0,98	87,95
BDY001	220	4,85	36,6	2,24	78,74
KNL021	234	15,7	114	0,72	90,61
TAL005	229	11,5	84,9	0,97	81,35
NUR002	247	20,3	139	0,59	93,03
ESZ003	229	11,8	85,1	0,96	89,4
KKM001	236	8,68	63,4	1,29	83,98
KNT001	230	5,75	40,9	2,00	86,95
KSH002	231	15,2	111	0,74	92,42
KNT003	227	8,78	65,4	1,25	89,02
KSH003	241	16,1	111	0,74	89,85
KNT004	237	9,76	69,1	1,19	89,91
BRE014	244	11,4	77,6	1,06	88,1
BRE023	236	12,5	89,3	0,92	87,58
KUS010	236	12,1	86,1	0,95	89,94

Продолжение таблицы Г.3

1	2	3	4	5	6
BIS001	228	6,69	48,9	1,68	84,51
KYY002	241	16,3	114	0,72	89,63
KUS009	236	7,22	51,2	1,60	86,02
BIR008	207	7,28	58,3	1,41	89,36
KYY001	243	19,7	138	0,59	92,16
SMY010	249	11,2	76,5	1,07	89,56
BIR007	217	11,2	87,9	0,93	89,42
KUS016	237	10,6	75,5	1,09	88,71
SMY008	235	10	71,6	1,14	87,7
BIR006	212	4,7	36,1	2,27	82,31
KUS015	241	9,89	68,8	1,19	89,36
SMY009	254	11,1	75,3	1,09	88,65
BIR004	250	17,3	126	0,65	91,94
KUS014	230	6,43	46,9	1,75	85,59
BRE025	243	14,2	101	0,81	89,73
KUS012	257	9,33	257	0,32	88,23
BRE024	245	14,3	99,6	0,82	92,88
KUS011	236	10,1	72,3	1,13	89,78
AKS002	128	5,62	77,7	1,05	82,68
KSZ002	226	10,5	78,1	1,05	89,91
ADJ007	241	15,9	110	0,75	87,75
AKS001	251	19,6	141	0,58	89,84
KSZ001	229	14,7	109	0,75	90,17
ADJ006	204	7,14	57,2	1,43	89,52
AKC001	220	9,45	71,1	1,15	89,53
ADJ013	227	9,66	70,3	1,17	89,58
ADJ005	229	11,8	87,9	0,93	87,62
KSZ007	220	9,99	75,1	1,09	88,59
ADJ012	216	11,7	92,5	0,89	92,72
ADJ004	231	8	57	1,44	86,98
KSZ006	230	12,7	95,2	0,86	89,76
ADJ011	245	14,1	97	0,85	89,76
ADJ003	218	2,35	17,5	4,68	66,99
KSZ005	238	11,2	81,1	1,01	88,43
ADJ010	221	9,42	70,9	1,16	88,99
KSZ004	229	11,9	85,7	0,96	91,81
ADJ009	225	5,28	38,5	2,13	84,9
KSZ003	220	6,3	47,4	1,73	83,54
ADJ008	217	2,56	19,3	4,25	74,36
CTA001	241	17,6	122	0,67	92,02

Продолжение таблицы Г.3

1	2	3	4	5	6
CHB002	232	14,2	104	0,79	92,41
DYU001	239	9,76	68,1	1,20	86,7
UCH001	231	14,1	162	0,51	89,31
KRV001	232	26,5	195	0,42	89,39
ALH002	225	12,8	94,6	0,87	91,06
SHS003	214	10,3	78,5	1,04	91,86
BIS003	243	14,7	104	0,79	88,88
ALH001	229	13,5	101	0,81	89,22
SHS001	237	10,9	77,5	1,06	91,81
BIS002	237	11,5	81,4	1,01	85,99
ADJ002	230	18,3	132	0,62	92,82
SHS002	242	11,5	81,3	1,01	89,02
AGJ001	242	16,6	118	0,69	89,8
ADJ001	231	13,2	95,9	0,85	90,81
SHS004	228	14,7	111	0,74	90,04
UCH004	213	2,44	18,8	4,36	71,92
CHB003	245	14,2	97,1	0,84	90,04
UCH003	227	36,3	271	0,30	93,5
CHB001	232	15,2	110	0,75	90,67
AKC002	216	10,5	80,3	1,02	88,25
AML007	243	14,7	100	0,82	92,71
BTH004	244	28	202	0,41	88,24
AML014	228	16,5	122	0,67	89,83
AML006	240	16,6	116	0,71	91,06
BTH003	230	13,7	100	0,82	89,99
AML013	244	15	109	0,75	90,29
AML005	240	26,2	193	0,42	90,5
BTH002	223	9,93	73	1,12	89,64
AML012	223	5,39	39,2	2,09	86,56
AML004	220	2,85	21,3	3,85	70,82
BTH001	223	10,3	77,2	1,06	87,97
AML011	217	9,89	77,2	1,06	89,17
AML002	226	10,8	79,3	1,03	91,09
ISK001	222	11,3	81,9	1,00	87,95
AML010	229	16,2	118	0,69	90,2
AML003	232	7,89	56,4	1,45	87,32
AML009	231	18,4	133	0,62	92,3
AML001	231	12,2	88	0,93	86,85
AML008	240	15,8	113	0,73	92,39
BTH005	256	16,6	118	0,69	87,82

Продолжение таблицы Г.3

1	2	3	4	5	6
KNL004	227	6,54	47	1,74	86,57
SMV002	209	6,77	53,1	1,54	86,01
BRE013	276	14,9	92	0,89	92,45
ESZ001	232	6,88	48	1,71	86,44
BRE012	231	7,51	54,8	1,50	86,67
KNL037	224	13	96,1	0,85	91,92
BRE011	253	9,97	66,7	1,23	87,89
KNL036	220	6,09	45,6	1,80	85,6
BRE008	244	7,09	49	1,67	84,1
KNL030	211	5,43	42	1,95	83,63
BRE006	243	8,23	56,4	1,45	83,82
KNL029	234	11,5	81,5	1,01	89,21
BRE004	236	7,25	51,2	1,60	90,04
KNL028	235	12,5	88,3	0,93	87,42
BRE003	230	9,04	65,5	1,25	90,36
KNL027	234	11,4	82,5	0,99	87,16
BRE002	227	9,36	70,2	1,17	88,29
KNL026	220	10,6	78,9	1,04	87,77
KNL020	202	5,78	46,4	1,77	84,79
KNL003	226	10,7	78,8	1,04	89,69
SMV001	222	12,2	93,4	0,88	90,68
KNL019	213	6,63	51,1	1,60	87,65
KNL002	223	7,66	56,5	1,45	87,64
PRR004	236	10,5	72,2	1,14	88,71
KNL012	209	4,61	35,9	2,28	78,3
KNL001	224	9,83	72	1,14	89,08
PRR003	224	5,51	39,9	2,05	83,99
KNL011	224	5,48	40,1	2,04	82,14
KNL025	224	14,3	103	0,80	90,71
PRR002	218	5,72	42,8	1,92	85,15
KNL010	201	5,43	43,8	1,87	86,53
KNL024	235	9,94	70,6	1,16	85,34
PRR001	217	5,83	43,9	1,87	83,63
KNL009	216	7,26	55,9	1,47	88,65
KNL023	224	11,9	87,2	0,94	93,28
KNL006	225	5,87	42,8	1,92	86,96
KNL022	237	4,05	28,7	2,86	77,02

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Коллекция образцов РГП “Института генетики и физиологии” КН МОН РК

Таблица Г.3 - Общая информация по образцам

№	Археологическое название	Объекты	Захоронения	Образцы	Культура	Археологи / антропологи	Географическое расположение	Вид захоронения	Датировка С14// археологическая	Место сбора образца	Объем образца для палеодНК, 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.	Мугаль- жарский район, Актю- бинская 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	Кырыкба (КҮҮ)	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.	92.4
18		18	о- 1, з - 2								56.3
19		19	к - 10								грязный

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
20	Каспан 2 (CSP)	1	к - 3	зуб	Сакский период	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	53.2
21	Сарозек (SRO)	1	к - 41	зуб	Сакский период	Китов Е.	Кербулакский район, Алматинская область, Казахстан	Череп Эмиль Султана	700 -300 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	49.4
22	Каспан 6 (CSP)	1	к - 1	зуб	Сакский период	Бейсенов А., Джумабекова Г., Базарбаева Г. / Китов Е.	Кербулакский район, Алматинская область	М	2597±23	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	86,6
23		2	к - 4						2466±33		66.7
24		3	к - 1						VI-III до н.э.		35.2
25		4	к - 1, ч- #2								73.2
26	Святылище Айгырлы (AIG)	1	индивидуал 1	зуб	Сарматская культура	Онгар А./ Китов Е.	Мангышлак, Казахстан	М	VI-V до н.э. - II-IV век н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	72.5
27		2	индивидуал 2								102.3
28		3	индивидуал 6								112.5
29		4	индивидуал 4								102.6
30		5	индивидуал 5								1889±22 14С; 63-210
31		6	индивидуал 3						2236±24 14С; 384-207		68.8

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
32	Берел (BRE)	1	к - 2	зуб	Сакский период	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	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
45	Бисоба (BSB)	1	к - 3, з - 1	зуб	Сармат- ская культура	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	М	2493±24 14С; 771-540	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	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 (MER)	1	к - 1, з - 9	зуб	Ката- комбная	Китов Е.	Казталовский район, ЗКО, Казахстан	М	2200- 1900 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	98.9
50		2	к - 1, з - 10								67.0

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
51	Нурлы (NUL)	1	о - 6, к - 1	зуб	Сакский период	Китов Е.	Нурлы, Енбекшиказах -ский район, Алматинская область, Казахстан	М	700 -300 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	73.2
52		2	к - 8, о - 4	зуб				М			47.2
53	Кайн- булак II (KBU)	1	к - 4, з - 1	зуб	Сармат- ская культура	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	Майе- мер-II (MMR)	1	к - 1	зуб	Сармат- ская культура	Китов Е.	Катон- Карагайский район, ВКО, Казахстан	Е	700 -500 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	64.0
57	Тур- гень-2 (TRG)	1	к - 8	зуб		Китов Е.	Енбекшиказах -ский район, Алматинская область, Казахстан	М	Бронзов ый - 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	Кылы- шьяр (KLR)	1	к - 6	зуб	Канджу	Китов Е.	Ордабасински район, Туркестанская область, Казахстан	Е	200-400 н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	21.3

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
61	Илийский (ИЛ)	1	к - 1, з - 2	зуб		Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	93.2
62	Красносельский – I (KSK)	1	КП, Р-1, К-4, #31	зуб		Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	70.3
63	Акбулак (АКУ)	1	к – 29/1	зуб		Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	53.5
64		2	з - 1								49.2
65		3	к – 29/ 2								53.0
66	Борнео-Октябрьский (BRO)	1	памятни к-2	зуб	Канджу	Китов Е.	Жуальинский Жамбылская область	Е	200-400 н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	53.2
67	Бутақты-1 (BTK)	1	к - 1	зуб		Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е	Бронзовый - средние века	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	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.	62.4
69	Красносельский- I (KSK)	1	КП, Р-1, К-3, # 18	зуб	Сарматская культура	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	Е	V-III до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	111.7
70	NTK-2013 (NTK)	1	13-40- 39 – 20	зуб		Кнутов А.		Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	58.5

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
71	Актогай (АКТ)	1	о- 4	зуб	Андрони- ческий период	Китов Е.	Алматинская область, Казахстан	Е	XIX-XV до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	95.3
72	Акадыр -2 (АКР)	1	к - 20, з - 3	зуб	Ямная	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан	Е	3200 - 2600 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	56.8
73	Мавзо- лей	1	индивид 1	зуб	Карлук- ская	Китов Е.	Саркандский район, Алматинская область, Казахстан	М	VIII-XI н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	51.2
74	Каялы к (KLK)	2	индивид 2								53.3 +33.7
75	Ак- Койгас- 5(АКО)	1	к - 5	зуб	Андрониче- ский период	Китов Е.	Павлодарская область, Казахстан	Е	XVIII- XV до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	55.3
76	Жирен копа	1	о- 1, з - 1	зуб	Сармат- ская	Китов Е.	Хобдинский район, Актюбинская область, Казахстан	М	600-300 до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	78.0
77	VI (ZHR)	2	о- 1, з - 3		Ямная						67.2
78		3	о- 2, з - 1								91.0
79	Сапibu -лак (SBL)	1	о- 7, з - 1	зуб	Сармат- ская	Китов Е.	Актюбинская область, Казахстан		VI-III до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	64.7
80	Нуркен II (NUR)	1	к - 2А	зуб	РЖВ Коргантас	Бейсенов А. // Китов Е.	Каркаралинск ий район, Казахстан	М	2504±27 14С; 768-747	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	101.4
81		2	к - 2В								140.8
82		3	к - 10		РЖВ						60.1

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
83	Назар (NZR)	1	к - 2	зуб	РЖВ, Тасмолинс кая	Бейсенов А.	Карагандин- ская область, Каркаралин- ский район, Казахстан	М	2545 ± 32	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	48.0
84		2	к - 1						2507 ± 30		55.4
85	Бирлик (BIR)	1	к - 1	зуб	РЖВ, Тасмолинск ая	Бейсенов А.	Павлодарская область, Баянаульский район, Бирлик, Казахстан	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	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								47.1
91		7	к - 12		54.0						
92		8	к - 15		115.6						
93		9	к - 19		46.4						
94		10	к - 21		58.0						
95		11	к - 23		112.4						
96		12	к - 25		67.2						
97		13	к - 29		101.4						

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
98	Бакы-булак (ВКВ)	1	к - 2	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Каркаралинский район, Казахстан	М	2432 ± 28 14С; 727-719	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	56.6
99		2	к - 14						2505 ± 34)		36.8
100		3	к - 15, верхнее з.						VIII-IV век до н.э.		93.8
101		4	к - 15, нижнее з.						2567 ± 30		78.6
102	Карашоқы (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.	69.2
103	Майкубель-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.	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.	

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
105	Кызыл-кой (KZK)	1	к - 8	зуб		Бейсенов А.	Карагандинская область, Шетский район, Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	45.0
106	Кызыл (KZL)	1	к - 3, левая	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Актогайский район, Шабанбайбы, Казахстан		VIII-IV века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	68.9
107		2	к - 3, правая								58.1
108		3	к - 4								47.2 +41.0
109		4	к - 5								55.8
110		5	Строе-ние 8								Культура Бегазы-Дандыбай
111	Кызыл-Субар (KZB)	1	к - 2	зуб		Бейсенов А.	Карагандинская область, Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	66.2
112	Карамо-ла (KRM)	1	к - 6	зуб	РЖВ, Тасмолинская	Бейсенов А.	Карагандинская область, Темиршин, Казахстан	М	2291 ± 30 14С; 405-354	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	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.	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.	50.3
116		3	к - 3						одинаковые образцы		2137±27

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
117	Караоба Корган- тас (КВО)	1	к - 16	зуб	РЖВ Коргантас	Самашев З. // Китов Е.	Карагандин- ская область, Каркаралин- ский район, Мадийский	М	IV-II до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	55.7					
118	Кайрак- тас (KTS)	1	к - 4	зуб	РЖВ, Тасмолинск ая	Бейсенов А.	ВКО, Аягозовский район, Емелтау, Казахстан	М	VIII-IV векдо н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	55.8					
119	Копа (CPA)	1	к - 3	зуб	РЖВ, Тас- молинская	Бейсенов А.	Карагандин- ская область, Каркаралин- ский район, Нуркен, Казахстан	М	VIII-IV век до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	49.3					
120		2	к - 4								57.0					
121	Актерек (АКЕ)	1	KSU11	зуб	Усуньское время	Бейсенов А.	Карагандинская област	Е	III в. до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	46.5					
122	Серек- ты I (SRK)	1	к - 11	зуб	РЖВ Коргантас	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинска я область, Каркаралинск ий район, Нуркен, Казахстан	М	IV-II до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	53.9					
123		2	к - 15								32.9					
124		Серект ы II (SRK)	1						раскоп ки # 2, к - 4		РЖВ, Тас- молинская	Бейсенов А., Ломан В.	Карагандин- ская область	М	VIII-IV векдо н.э.	55.7
125			2						к - 5							45.0
126	Аксу- Аюлы IV (ASU)	1	к - 3	зуб	РЖВ, Тас- молинская	Бейсенов А., Ломан В.	Карагандин- ская область	М	РЖВ, Тасмоли нская	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	32.2					

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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.	58.8
128	Тандай -лы 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.	53.9
129		2	к - 4								62.0
130	Самсы-2018 (SMY)	1	пакет 1	зуб	Новые образцы раннего средневековья	Китов Е.	Алматинская область, Джамбульский район, Самсинский п., Казахстан	М		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	79.0
131		2	пакет 2								69.0
132		3	пакет 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								
140	Таргап (TGP)	1	к - 1	зуб				Е		Институт археологии им. Маргулана А.Х.	54.1

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
141	Бирск-2 (BIS)	1	з - 694	зуб	Бахму- тинская 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 (УСН)	1	#568	зуб - ПВ	-	Кибиров А., Миклашевская Н., 1952 / Бужилова А. Березина Н.	Калинина (с 1993 года Жайылский район), Кыргызстан	М	IV век	НИИ 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							112.3
148	Чегирт- не- Арык (СТА)	1	#581*	зуб - ПВ	-	Кибиров А., Миклашевская Н., 1952, / Бужилова А. Березина Н.	Акталинский район, Кыргызстан	Е	IV век	НИИ 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	Бронзо- вый век	НИИ 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/К 18	зуб - ПН М3	-	Кибиров А., Миклашевская Н./Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	86.2

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
153	Алыш (ALH)	1	#596/К 2	зуб - ПВ М2	Кенколь- ское время	Кибиров А., Миклашевск ая Н. / Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	I н.э.	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	67.8
154		2	#625*/ К54	зуб - ПН							68.2
155	Дюр- бель- жин (DYU)	1	#576*/ К1	зуб - ЛВ М2	-	Кибиров А., Микла- шевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Акталинский район, Кыргызстан	Е	I н.э.	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	51.0
156	Курти- кова щель (KRV)	2	#578*/ К2	зуб - ЛН	-	Кибиров А., Микла- шевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Покровский район, Кыргызстан	М	I н.э.	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	54.3
157	Шамси (SHS)	1	#557*/ К17	зуб- ПВ	Усуньское время	Кибиров А., Микла- шевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Чолпонский район, Кыргызстан	М	I.н.э.	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	68.4
158		2	#599*	зуб- ЛН							Усунь- ское
159		3	#617	зуб ЛВ					91.0		
160		4	#620*	зуб- ЛВ					70.5		
161	Шад- ринск (SHD)	1	#25/1	зуб- ПН		Акимова М. / Бужилова А. Березина Н.	Шадринский район, Россия	М	V-III века до н.э.	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	65.9
162		2	#25/2	зуб- ПН							57.5
163	Боро- вое (BRV)	1	#240/# 15/	зуб ЛН PM2	-	Генинг В., Урал С.	Акмолинская область	Е	II века до н.э.- I.н.э.		53.3

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
164	Адж (ADJ)	2	#559	зуб ПН	-	Кибиров А., Миклашевск ая Н. / Бужилова А. Березина Н.	Адж, Кыргызстан	М	Первая полови- на тысячи- летия	НИИ Институт 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	Чиль- пек (СНК)	1	#8186	зуб -ЛВ	-	Воеводский М. / Бужилова А. Березина Н.	рядом с Караколь, Кыргызстан	М	2361±22	НИИ Институт 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.	рядом с г. Уральск, западный Казахстан	М	VI-IV века до н.э.	НИИ Институт 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/К 1	зуб- ПВ	-	Кибиров А., Миклашевск ая Н. / Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	М.В.Ломоносова	57.1
185			#545/К 5	зуб- ЛВ							86.2

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
186	Иссык-Куль (ISK)	3	#4197	зуб - ПВ	-	Поярков Ф. / Бужилова А. Березина Н.	Семиреченская область, Кыргызстан	М	II-V века, уйсуньская культура	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	60.1
187	Алай/ Нура I, II, Туяк II (ALN)	1	#360/1	зуб- ПН	Сакская	Экспедиция Киргизской ССР / Бужилова А. Березина Н.	Алай/Нура/ Туяк, Кыргызстан	М	1736±21	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	94.0
188		2	#360/3	зуб- ПВ					1822±2; 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					2332±22		66.5
194		8	#360/7	Молочный зуб - ПН М					V-I до		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	НИИ Институт 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

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
204	Курай-лы (KRY)	1		зуб		Бисенбаев А. // Китов Е.	Актюбинская область, Мартокский район	Е	1666±13; 344-413	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	62.3
205	Ак-Чий (AKC)	1	#544	зуб -ЛВ	-	Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	53.5
206		2	#650*	зуб -ЛН	-						58.3
207	Байтал -чи (BTH)	1	#580	зуб- ПВ	-	Бужилова А. Березина Н.	Нарынский район, Кыргызстан	М	IV век	НИИ Институт 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 (KEN)	1	#551	зуб -ПВ	-	Кибиров А., Миклашевская Н. / Бужилова А. Березина Н.	Чолпонский район, Кыргызстан	М	2170±23		63.8
213		2	#651*	зуб -ЛН	-				2386±24		71.6
214	Кен-Су 2	1	#556	зуб -ПН					IV век		45.8
215	Шмаково (SMV)	1	#26/1	зуб-ПН		Генинг В., Хохлова С. / Бужилова А. Березина Н.	Белозерский район, Россия	М	2288±2; 401-236	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	80.9
216		1	#26/2	зуб- ПВ					IV-III века до н.э.		60.1

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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.	НИИ Институт 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
221	Алма- Луу (AML)	1	#360/19	зуб- ПН	-	Экспедиция Киргизской ССР / Бужилова А. Березина Н.	Тянь-Шань, Кыргызстан	М	I-IV века	НИИ Институт 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	Коко- новка (КОК)	1	# 225/2	Молоч- ный зуб - ПН		Могильников В. / Бужилова А. Березина Н.	Коконовка, Омский район, Омская область, Россия	М	IV-III века до н.э.	НИИ Институт 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	Воро- биево (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.		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

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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.	НИИ Институт 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
247	Бишкекские несторрианские 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 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 (SGZ)	1	к - 2. з - 4.	зуб	Саврмо - 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		2	к - 1. з - 2.								Восточный скелет

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
256	Горная Бития (ВІУ)	1	#228/12	зубы		Могильников В./ Бужилова А. Березина Н.	Омский район, Омская область, Россия	М	2295±22	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	62.8
257		3	#228/15						2227±2; 396-213		53.4
258		12	#228/31								86.1
259		2	#228/14						III-II века до н.э.		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							
268	Талды II (TAL)	1	к - 4.	зуб	Царский курган, тасмолин- ская культура	Бисенбаев А. // Китов Е.	Карагандинска я область, Каркаралинск ий район	М	VIII-IV века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	52.8
269		2	к - 5						2540±40; 800		56.5
270		3	к - 8						2529±23		62.9
271	Кара- кемер (ККМ)	1	к - 3	зуб	Тасмолинск ая культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Абайский район, ВКО, Казахстан	Е	VII-VII века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	154,7
272	Кара- шоки (KSH)	1	к - 8	зуб	Царский к. Тасмолин- ская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралински й район	М	2649±31	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	50.2
273		2	к - 6						VII-VI века до н.э.		48.3
274		3	к - 1						2515±27; 791-542		67.8

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
275	Кен- коль- ские захоро- нения (KNL)	1	679/К9	зуб- ПВ	-	Кожемяков П., Кожамберди ев И., Миклашевск ая Н., 1956, 1957, Киргизская экспедиция / Бужилова А. Березина Н.	Таласская долина, Кыргызстан	М	I-II века, VII-VIII века	НИИ Институт и музей антропологии МГУ им. М.В.Ломоносова	67.9
276		2	681/К12	зуб- ПВ							51.5
277		3	682/К1	зуб- ЛВ							68.6
278		4	683/К14	зуб- ПН							64.3
279		5	684/К14	зуб- ЛВ							61.9
280		7	686/К11	зуб- ЛВ							58.1
281		8	687/К15	зуб- ПН							95.6
282		9	688/К4	зуб- ПН							59.7
283		10	689/К5	зуб- ПН							90.1
284		11	690/К3	зуб- ЛН							46.9
285		12	691/К16	зуб- ПВ							67.7
286		13	692/К4	зуб- ПН							64.0
287		14	693/К13	зуб- ПВ							61.8
288		15	694/К2	зуб- ПН							101.2
289		16	695/К10	зуб- ПН							82.2
290		17	696/К4	зуб- ЛВ							97.8
291		19	697/К7	зуб- ПН							85.5
292		20	699/К33	зуб- ПВ							105.8
293		21	700/К34	зуб- ПН							52.5
294		22	701	зуб- ПВ							74.4
295		23	702	зуб- ПН							50.6
296		24	703/К32	зуб- ЛН							69.7
297		25	704/К32	зуб- ЛВ							64.7
298		26	705/К32	зуб- ПВ							79.5
299		28	706/К28	зуб- ЛВ							111.0
300		30	709/К19	зуб- ЛВ							51.6
301		31	710/К36	зуб- ПВ							57.7
302		32	711/К24	зуб- ПН							121.2
303		33	712	зуб- ПВ							61.6
304		34	713/К31	зуб- ЛН							45.6
305		35	714/К33	зуб- ПВ							56.7
306	36	715/К19	зуб- ПВ	70.0							
307	37	716/К29	зуб- ПН	55.4							
308	38	717/К27	зуб- ЛН	63.2							
309	39	718/К20	зуб- ЛВ	58.0							
310	40	719/К20	зуб- ПН	68.9							
311	42	721/К27	зуб- ЛН	51.4							

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
312	37 воинов (WAR)	1		зуб	Тасмолин- ская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Актогайский район, 54 км к юго-востоку от села Кызылтау	Е	2451±32 14С; 755-411	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	52.4
313	Серек- ты II (SRK)	1	к - 6	зуб	Царский к. Тасмолин- ская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандин- ская область, Каркаралин- ский район	М	VIII-VI века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	62.2
314	Кызыл- шилик (KYZ)	1	к - 8	зуб	Тасмолин- ская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Павлодарская область, Баянаульский район	Е	2530±29 14С; 796-545	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	55.5
315	Бидаик (BDY)	1	к - 5	зуб	Тасмолин- ская культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Карагандинская область, Каркаралин- ский район	М	2208±19 14С; 359-204	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	55.4
316	Нуркен II/2 (NUR)	1	к - 1	зуб	Тасмолинск ая культура	Бейсенов А. // Китов Е.	Каркаралин- ский район	М	2504±27 14С; 785-540	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	50.6
317	Елеке- Сазы (ESZ)	1	к - 3	зуб	Сакская	Самашев З. // Китов Е.	Тарбагатай- ский район, плато Елеке- Сазы	М	2479±25 14С	Областной историко- краеведческий музей, ВКО,	57.2
318		2	к - 4						2525±25		
319	Акжай- лау (AKZ)	1	к - №4	зуб и в. кость	РЖВ	Тулэбаев А., Жуматаев Р.	с. Акжайлау, ВКО	М	IX—VII века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	166.6

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
320	Кара- коба (ККВ)	1	к - 9.	зуб	Скифский период	Самашев З. // Китов Е.	ВКО, Катон- Карагайский район	М	1185±18 14С; 775- 887	Областной историко- краеведческий музей, ВКО	52.1
321		2	к - 11.						Пазы- рыкская культура		VIII-VI до н.э.
322	Кокто- бек II / (КОТ)	1	к - №4	зуб и в. кость	РЖВ	Тулєбаев А., Жуматаев Р.	Расположен в 3 км восточнее села Кокжира Тарбагатайско- го района ВКО	М	IX—VII века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	55.3
323		2	к - №1	кость							62.0
324		3	к - №3	2 зуба							57.3
325		4	к - №5								101.1
326	Коньр- тобе (КНТ)	1	к -1, з- 16 женщина	зуб		Байбосынов К. Китов Е.	Карагандин- ский регион, 6 км к западу от зимовочного района Коньртобе	М	1741±1; 245-343	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	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 / (АИН)	1	к - 6	2 мол-х зуба и кости	Андроновск ая культура	Тулєбаев А., Жуматаев Р.	Расположен в 7-8 км к юго- востоку от г. Зайсан, Зайсанский район, ВКО,	М	XVII— IX века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	108.5
331		2	к - 7	зуб и кости	Афанасьев- ская культура				III—II тысячи- летия до н. э.		100.6
332		3	к - 9	в. кость, 2 зуба					153.2		
333		4	к -21	фраг- мент кости					50.0		

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
334	Сабындыколь / (SAK)	1	з - №2	зуб и в. кость	Афанасьевская культура	Тулєбаев 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.	109,6
335		2	з - №6	в. кость и 2 зуба							107.1
336	Рахат (RAA)	1	к - №3	зуб и в. кость	Сакская	Бексеитов Г.	Рядом с. Рахат, Енбекши-казахский район, Алматинская область	Е	V – II века до н.э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х., Алматы	63.0
337	Берель (BRE)	1	к - 44.	зуб	Царская долина	Самашев З. // Китов Е.	ВКО, Катон-Карагайский район Примерно 154 км восточнее с. Улкен Нарын.	М	2179±1; 354-182	Коллекция профессора Самашева З.С., Государственный историко-культурный музей-заповедник «Берел», Областной историко-краеведческий музей, Усть-Каменогорск, ВКО	59.1
338		2	к - 80А /80Е						II-IV н.э.		55.0
339		3	к - 69						1728±1; 254-380		49.8
340		4	к -13						V-II 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

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
346	Шиликты (SHI)	1	з - 2, к-4, фрагменты скелет 1	РЖВ	Тулехаев 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							54.2	
348		3	з -3, к -2							56.7	
349		4	з - 3, к-5							57.7	
350		5	к -7b, череп 1							56.4	
351		6	к - 7b, череп 2							50.8	
352		7	4, к - 7b							в. кость и 2 зуба	53.6 -55.5
353		8	к - 16							кости	53.2
354		9	к -3							2 зуба	61.5
355	Орикты (ORI)	1	могила №1	зуб и в. кость	РЖВ	Бексеитов Г.	с. Орикты, Енбекши - казахский район, Алматинская область	М	IX—VII века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	54.5 ; 52.7
356		2	могила №2	фр.кост и							51.8 ;
357		3	могила №3	зуб и в. кость							50.0 ; 50.5
358		4	могила 4	кости							54.0
359	Аян (NOI)	1	к - 2	в. кость	РЖВ	Омаров Г.	рядом с. Калгуты, ВКО	Е	IV -II века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	52.5
360	Бесоба (BEO)	1	к - №16	зуб и в. кость	РЖВ	Омаров Г.	Рядом с. Акбулак, ВКО	Е	VII -VI века до н. э.	Институт археологии им. Маргулана А.Х.	57.1 ; 51.1

Примечания: к - курган, з –захоронение, фр –фрагмент, в – височная, с - село; Е – единичные; М – множественные

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Акты 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 «Казakhского 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.Муралиной 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. Gnechi-Ruscione, G.A., Khussainova, E., Kahbatkyzy, N., Musralina, L., Spyrrou, 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., Birö, A.Z., Èvinger, S., Bissenbaev, 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 Koehler, 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, Maîté Rivollat, Marieke S. Van de Loosdrecht, Kerttu Majander, Rezeda I.Tukhatova, 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.

Рисунок Е.1 - Акт внедрения результатов в учебный процесс КазНУ имени Аль-Фараби

«Утверждаю»
Генеральный директор
РГП «Институт генетики и
физиологии» КН МОН РК

П.К. Жунусов

2022 г.

«Утверждаю»
Генеральный директор
РГП на ПХВ «Институт археологии
им. А.Х. Маргулана» КН МОН РК

Акан Онгар

2022 г.

АКТ внедрения

Методики сбора древнего костного материала
для палеогенетического анализа

Настоящим Актом подтверждается, что методика сбора древнего костного материала для палеогенетического анализа была внедрена и применялась на базе Целевой научно-исследовательской лаборатории палеоантропологического исследования Казахстана в РГКП «Институт археологии им. А.Х. Маргулана» КН МОН РК.

Исследование древней ДНК включает инвазивные и разрушительные процедуры отбора образцов, которые часто несовместимы с антропологическими, анатомическими и биоархеологическими анализами, требующими неповрежденных скелетных останков. Поэтому очень важно, при отборе костных фрагментов для палеогенетического анализа стараться нанести, как можно меньше повреждений костным останкам, но, в то же время, отобрать достаточный для анализа ДНК материал, избегая излишней контаминации современными ДНК.

Сущность внедрения методики заключается в применении правил обращения с костными останками при отборе костного материала (зубы, фрагменты костной ткани) для палеогенетического анализа. Отбор проб проводился в лабораторном помещении, в выделенном месте, предварительно обработанном ультрафиолетом в течение не менее 1 часа. Рабочие поверхности покрывались листом кальки или фольги. Для анализа патогенов использовали зубы (молляры), не имеющие следов повреждений или кариеса. Зубы упаковывали в стерильные пакеты или пробирки, подписывая название некрополя, номер кургана или раскопа. Сбор костных фрагментов проводили после осмотра черепа или длинных костей, отбирая места, где костная ткань не подверглась большой деградации. Фактически - более светлые участки кости представляют более сохранные остеоциты. Предпочтительно осматривали доступность спила с губчатой ткани (Glenoid Fossa) с височной кости (Cochlea) с внутренней стороны черепа. На длинных костях выбирали более светлые, твердые участки. Кости перед распилом подвергали кратковременной (в течение 20 минут) обработке ультрафиолетом.

При распиливании костных тканей использовали дрель (Dremel 4000). Выпиливание тканей (не менее 1 кв. см) осуществляли, избегая чрезмерного перегрева, чтобы предотвратить дополнительную денатурацию и деградацию ДНК остеоцитов. Насадки меняли на стерильные для каждого нового образца. При выпиливании старались нанести минимальные повреждения внешнего облика черепа и костей. Было показано, что костный лабиринт внутри лепестковой кости дает большее количество эндогенной ДНК, чем любой другой элемент скелета; однако доступ к этому лабиринту в случае полного или реконструированного черепа предполагает нанесение серьезных структурных повреждений своду или основанию черепа. Здесь мы применяли метод сверления основания черепа для доступа к костному лабиринту из основания черепа, который предотвращает повреждение окружающих черепных элементов, что делает его весьма комплементарным к морфологическому анализу.

Спили упаковывали в вакуумные пакеты или пробирки, подписывая нестираемым маркером соответствующим образом. Возможно также сопровождение на бумажном носителе. По окончании сбора биоматериалов для палеогенетического исследования, подписывали акт изъятия костных фрагментов для палеогенетического анализа. Таким образом, в период с 2018 г. по 2020 г. были собраны костные образцы для палеогенетического анализа от 181 древнего индивида.

Представитель/представители организации исполнителя научно-исследовательских работ:

Научный сотрудник Лаборатории
популяционной генетики РГП «Институт
физиологии и генетики» КН МОН РК,
PhD-студент

Мусралина Л.З.

Руководитель Центра палеогенетики и
этногенетики, профессор

Джансугурова Л.В.

Согласовано:

Представитель/представители стороны организации, в которую была
внедрена методика сбора древнего костного материала для
палеогенетического анализа:

Руководитель Лаборатории
Археологических технологий
Института археологии им.
А.Х. Маргулана, PhD

Акымбек Е.

Рисунок Е2 - Акт внедрения в Центр археологических исследований Торайгыров Университета г. Павлодар

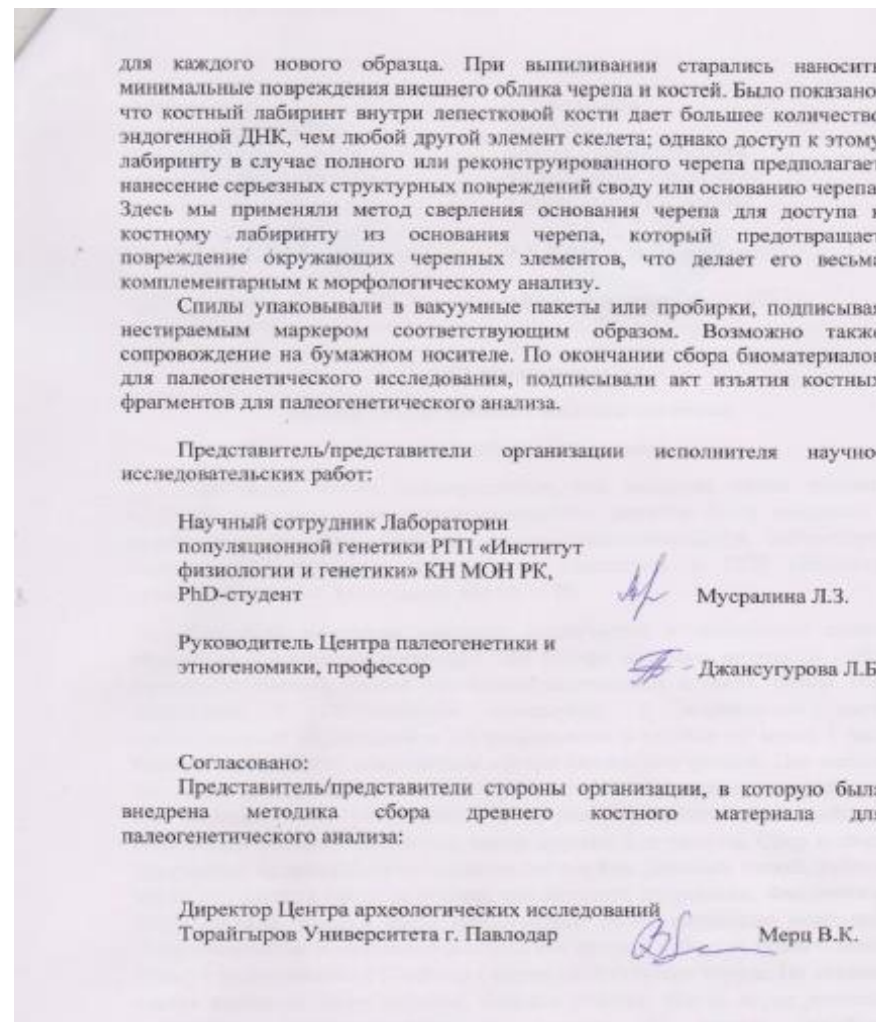
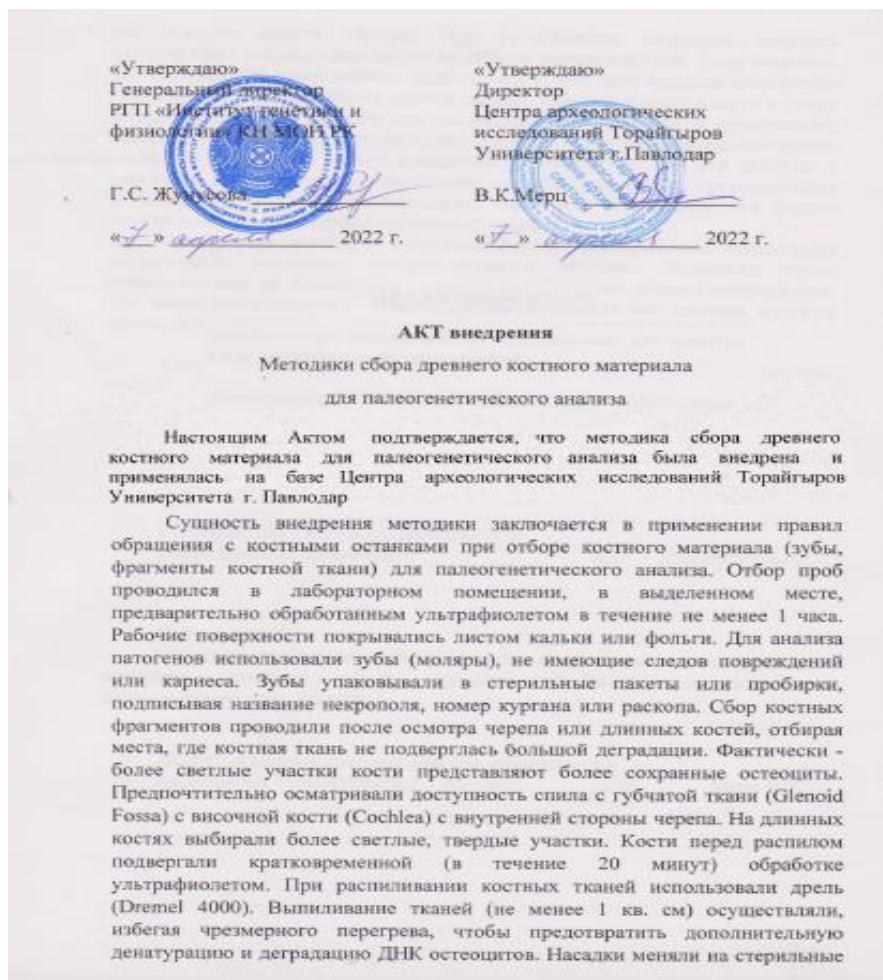


Рисунок Е3 - Акт внедрения методики сборов в РГП на ПХВ «Института археологии имени А.Х.Маргулана» г. Алматы