ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS

Հատոր Том Volume 121 2021 № 1

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՀՆԷԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

УДК 577.29:562/569

Մ. Ա. Անտոնոսյան[1,2], Դ. Ստենտոն[3], Ն. Ամանո[2], Լ. Մ. Եպիսկոպոսյան[1]

Քարին Տակ քարանձավի ոսկրանյութում մոլեկուլային պահպանվածության գնահատում

(Ներկայացված է ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ Ռ. Մ. Հարությունյանի կողմից 11/I 2021)

Բանալի բառեր. *վերին պլեյստոցեն, հնագույն ԴՆԹ, հնագույն սպիտակուցներ, մաս-սպեկտրոմետրիա:*

Տեղակայված լինելով Աֆրիկայի և Եվրասիայի խաչմերուկում՝ Հարավային Կովկասը հանդիսացել է կարևոր միգրացիոն ուղի՝ Անդրկովկասյան միջանցք, որը հնարավորություն է տվել հոմինինների սփռումը Լևանտից դեպի Եվրասիայի մնացած տարածքներ պլեյստոցենի ընթացքում [1, 2]: Աշխարհագրական դիրքով պայմանավորված կլիմայական նպաստավոր գործոնները (մի կողմից՝ Կովկասյան լեռների պաշտպանական ազդեցությունը հյուսիսային սառը օդային զանգվածների ներթափանցումից, մյուս կողմից՝ Սև և Կասպից ծովերի մեղմող ներգործությունը) թույլ են տվել տարածաշրջանը դիտարկել որպես կենսաաշխարհագրական ապաստան (ռեֆուգիալ գոտի) պլեյստոցենի ամբողջ ժամանակաշրջանում [2 – 4]:

Վերջին տասնամյակում կենսամոլեկուլային տեխնոլոգիաների զարգացման արդյունքում մշակվել են նոր մեթոդներ՝ բրածո ոսկորներում պահպանված կենսաբանական ցուցանիշների առավել ճշգրիտ նույնականացման և վերլուծության համար: Տեխնոլոգիական առաջընթացը հանգեցրել է էական վերափոխումների հնագիտության ոլորտում՝ սկիզբ դնելով մոլեկուլային հնագիտության նոր ճյուղի ձևա-

վորմանը: Այսօր այն խոր պատկերացում է տալիս այնպիսի հարցերի մասին, ինչպիսիք են մարդու ծագումը և նախապատմական գաղթերը [5], հարմարվողականության ձևերը [6], կենսապահովման առանձնահատկությունները [7] և կլիմայական փոփոխությունները, որոնք ազդել են կենսաբազմազանության վրա [8], ինչպես նաև բազմաթիվ այլ գործոններ, որոնց ուսումնասիրությունն անհնար կլիներ միայն ավանդական մոտեցումներով:

Մինչև վերջերս Հարավային Կովկասի տարածքում հնագույն մոլեկուլներ պահպանող նախապատմական հնավայրեր հայտնի չէին: Արցախի Քարին Տակ քարանձավի հայտնաբերումն աննախադեպ հնարավորություն ընձեռեց լրացնելու այդ բացը հնավայրում կենսամոլեկուլների բարձր պահպանվածության շնորհիվ [9, 10]:

Սույն աշխատանքի նպատակն է գնահատել Քարին Տակի տարբեր շերտերում կենսամոլեկուլների պահպանվածության աստիճանը և բրածո հավաքածուի պոտենցիալը հետագա գենետիկական և սպիտակուցաբանական հետազոտության համար:

Նյութեր և մեթոդներ: *Ուսումնասիրման կայք*: Քարին Տակ քարանձավը Փոքր Կովկասի լեռնաշղթայի հարավարևելյան ծայրամասում տեղակայված անխաթար հնագիտական հուշարձան է: Հնավայրում լայնածավալ պեղումները մեկնարկել են համապատասխան մասնագետներով համալրված միջազգային արշավախմբի կողմից 2016 թվականին և շարունակվել 2017-2020 թվականների դաշտային շրջանների ընթացքում: Կայքը պարունակում է միջին քարից մինչև պղնձի դարաշրջաններով թվագրվող մշակութային շերտերի շարունակական հաջորդականություն, հարուստ է մարդկային և կենդանական ծագման բազմաթիվ ոսկորներով, սերմերով, քարե գործիքներով և խեցեղենով:

Բրածո ոսկորներ: Քարանձավում իրականացված դաշտային աշխատանքների ընթացքում հայտնաբերվել է ավելի քան 20000 բրածո ոսկրանյութ: Առկա հավաքածուի միջինից վերին քարեդարյան ժամանակաշրջանով թվագրված ոսկրային զանգվածից առանձնացվել է մոտ 300 մանր բեկոր՝ հետագա մոլեկուլային հետազոտության համար:

Հնակենդանաբանությունը մաս-սպեկտրոմետրիայի (ZooMS) միջոցով: ZooMS-ը նորագույն մեթոդ է, որը թույլ է տալիս նույնականացնել չափազանց մանր և մորֆոլոգիապես անորոշելի ոսկորների բեկորները տեսակային սպեցիֆիկ սպիտակուցների մաս-սպեկտրոմետրային հայտնաբերման միջոցով: Մեթոդը հիմնված է էվոլյուցիայի ընթացքում կոլագեն սպիտակուցի կայունության հատկության վրա, ինչը հնարավորություն է տալիս այն օգտագործելու որպես մոլեկուլային ցուցանիշ ոսկորների տաքսոնոմիական նույնականացման համար [11]: Գերմանիայի Մաքս Պլանկի Մարդու պատմության ինստիտու-

տում իրականացվել է Քարին Տակի տարբեր շերտերից մոտ երկու հարյուր ոսկորից կոլագեն սպիտակուցի անջատում AmBic մեթոդով: Սպիտակուցի անջատմանը հետևել է պեպտիդների գնահատում Bruker Autoflex Speed LRF MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) մաս-սպեկտրոմետրով:

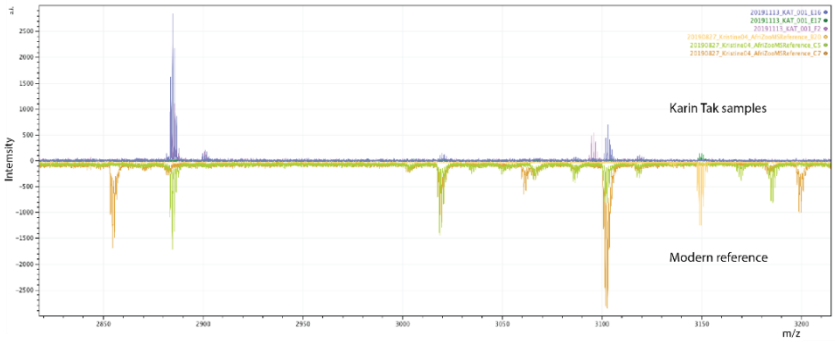
Հնագույն միտոքոնդրիումային ԴՆԹ-ի (մտԴՆԹ) հետազոտություն: Այս մոտեցումը հնարավորություն է տալիս մտԴՆԹ-ի ցուցիչների միջոցով վերականգնելու նախապատմական ժամանակներում պոպուլյացիաների տեղաշարժերը և փոխհարաբերությունները: Շվեդիայի Բնական պատմության թանգարանում իրականացվել է Քարին Տակի 25 նմուշից հնագույն մտԴՆԹ-ի անջատում և համապատասխան գենետիկական գրադարանների կառուցում: ԴՆԹ-ի անջատումն իրականացվել է համաձայն ընդունված պրոտոկոլների [12, 13], այնուհետև կառուցվել են Single indexblunt-end Illumina գրադարաններ [14]: Ամպլիֆիկացված նուկլեոտիդների պարունակությունը ստուգվել է ագարոզային գել էլեկտրաֆորեզի միջոցով, որից հետո իրականացվել է գրադարանում ԴՆԹ-ի որակի գնահատում Agilent 2100 կենսավերլուծիչի (bioanalyzer) հիման վրա:

Արդյունքներ և քննարկում: Օրգանիզմի մահվան պահից տեղի են ունենում կենսամոլեկուլների կտրուկ քայքայում և քիմիական կառուցվածքի փոփոխություն: Մասնավորապես օրգանիզմում էնդոգեն նուկլեազների և էկզոգեն գործոնների (օքսիդացում, հիդրոլիզ, ճառագայթում) ազդեցությամբ խախտվում է ԴՆԹ-ի շաքարաֆոսֆատային կմախքը, և փոփոխվում են ազոտային հիմքերը: Նմանապես խախտվում են սպիտակուցների պեպտիդային կապերը՝ հանգեցնելով դեամինացման [15]:

Այդ պատճառով պեղված հնէաբանական նյութի զգալի մասը չի պարունակում էնդոգեն պոլիմերներ: Մինչդեռ կայուն միկրոկլիմայի պայմաններում (ջերմաստիճանի աննշան տատանումներ, ցածր խոնավություն, կատարյալ մթություն) կենսամոլեկուլները կարող են պահպանվել հազարամյակներ շարունակ: Ահա այդպիսի միջավայրով է բնութագրվում Քարին Տակ քարանձավը, ինչն ապահովում է այնտեղ մակրոմոլեկուլների գերազանց պահպանվածությունը:

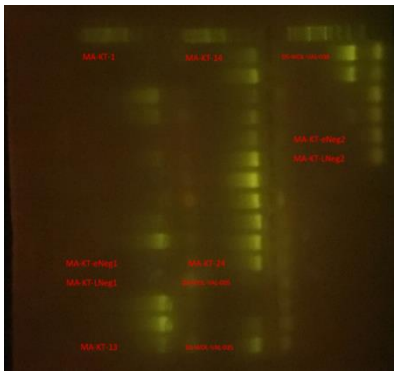
Աշխատանքում իրականացվել է Քարին Տակի քարեդարյան շերտերից պեղված ոսկրանյութի կոլագեն սպիտակուցի և մտԴՆԹ-ի պահպանվածության աստիճանի գնահատում, որը հիմք կծառայի նմուշների հետագա համապարփակ մոլեկուլագենետիկական ուսումնասիրության համար՝ տարածաշրջանի կենսաբազմազանությունը և ֆաունայի կառուցվածքային տատանումները վերականգնելու նպատակով:

Մորֆոլոգիական հատկանիշներով անորոշելի երկու հարյուր հիսուն նմուշ զննվել է ZooMS մեթոդով: Մասնավորապես իրականացվել է ոսկորներից կոլագենի անջատում, որին հաջորդել է պեպտիդների զանգվածի և քանակի գնահատում: Մաս-սպեկտրոմետրային հետազոտությունը ցույց է տվել գտածոների մեծ մասում պեպտիդների բարձր պարունակություն (նկար 1)՝ թույլ տալով նմուշների հետագա տաքսոնոմիական նույնականացումը:



Նկ. 1. Քարին Տակի նմուշներից անջատված կոլագենի մաս-սպեկտրեր: Ուղղահայաց առանցք՝ իոնների ազդակի ինտենսիվություն, հորիզոնական առանցք՝ զանգվածի և լիցքի հարաբերություն (m/z):

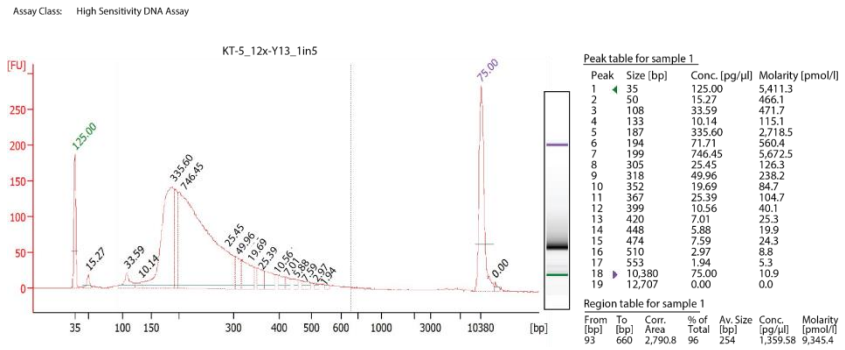
Այսպիսով, Քարին Տակի ոսկրանյութը, որն ունի մոտ 20-40 հազար տարվա վաղեմություն, բնութագրվում է կոլագենի պահպանման բարձր մակարդակով և որոշ դեպքերում համեմատելի է ժամանակակից նմուշների հետ: Նման պատկեր ստացվել է ուսումնասիրված ոսկրանյութի ավելի քան 85 տոկոսի դեպքում: Սպիտակուցի պահպանվածության բարձր աստիճանը, որը բավարար է մինչև ցեղի մակարդակ տաքսոնոմիական նույնականացման համար, հազվադեպ է հանդիպում քարեդարյան հուշարձաններում:



Նկ. 2. Քարին Տակի նմուշների մտԴՆԹ գրադարանների գել էլեկտրաֆորեզի պատկեր:

Դրա հետ մեկտեղ իրականացվել են Քարին Տակի 25 ոսկրային նմուշից մտԴՆԹ-ի անջատում, ամպլիֆիկացիա պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի միջոցով (ՊՇՌ) և գրադարանների կառուցում: Գրադարաններում հնագույն մտԴՆԹ-ի պարունակության գնահատումը ցույց է տվել ԴՆԹ-ի բարձր կոնցենտրացիա հետազոտված նմուշների 80 տոկոսի դեպքում (նկար 2):

Էլեկտրաֆորեզի վիզուալ արդյունքի ճշգրտման և ԴՆԹ-ի հատվածների կոնցենտրացիայի որոշման նպատակով իրականացվել է մեկ նմուշի որակի գնահատում կենսավերլուծիչի միջոցով: Ստացված էլեկտրաֆերոգրամը հաստատել է էնդոգեն ԴՆԹ-ի պահպանվածության բարձր մակարդակը (նկար 3):



Նկ. 3. Քարին Տակի նմուշի մտԴՆԹ գրադարանի էլեկտրաֆերոգրամ: Ողղահայաց առանցք՝ կամայական ֆլուորեսցենցիայի միավորներ (FU), հորիզոնական առանցք՝ ԴՆԹ-ի հատվածների երկարությունը, կորի վրա թվերը՝ ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիա:

Էլեկտրաֆերոգրամի վրա ակնհայտ երևում է, որ ՊՇՌ արդյունքում ամենաբարձր կոնցենտրացիան ունեն 187 bp երկարությամբ ԴՆԹ-ի հատվածները: Հատկանշական է, որ լավ պահպանվել են նաև ավելի խոշոր մոլեկուլները՝ ընդհուպ մինչև 10380 bp: Այդաստիճան պահպանվածությունը բավարար է սեքվենավորում իրականացնելու և ստացված հաջորդականությունները լիարժեք վերլուծելու համար:

Անջատված կենսամոլեկուլների հետագա ավելի խոր հետազոտությունը հիմք է ծառայում՝ 20-40 հազար տարի առաջ տարածաշրջանի ֆաունայի բազմազանությունը և կլիմայական տատանումների ազդեցությամբ վերջինիս փոփոխման օրինաչափությունները վերականգնելու համար: Բացի այդ, ստացված արդյունքները թույլ են տալիս համապարփակ մեկնաբանել և ստուգել վերջին սառցապատման ժամանակ Արցախը որպես ռեֆուգիալ գոտի ծառայելու վարկածը:

Հատկանշական է, որ Քարին Տակից հայտնաբերված հնէաբանական նյութի գենետիկական հետազոտության արդյունքները վկայում

են Հայկական լեռնաշխարհում մոտ ութ հազար տարի հարատևող մայրագծային գենետիկական շարունակականության մասին [15]: Բացի այդ, հնավայրի բրածոների ԴՆԹ-ի գերազանց պահպանվածությունը թույլ է տվել հաջողությամբ նույնականացնել 29 տաքսոն (որոնք ներկայացնում են կաթնասունների 11 և թռչունների 3 ընտանիք), որոնք բնակեցրել են տարածաշրջանը 24-42 հազար տարի առաջ [10]:

Ակնհայտ է, որ Քարին Տակ քարանձավը գիտական մեծ նշանակություն ունեցող հնավայր է, որը կարևոր տեղեկություններ է պահպանում քարեդարյան ժամանակաշրջանից ի վեր տարածքի հնագույն կենսամիջավայրի, մարդու վաղ բնակեցման և էկոլոգիական հարմարվողականության մասին: Մինչդեռ արդի մոլեկուլային գործիքները հնարավորություն են ընձեռում վերծանելու այդ տեղեկությունները և ստանալու սպառիչ եզրակացություններ հեռավոր անցյալի մասին:

[1]ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ
[2]Մաքս Պլանկի Մարդու պատմության ինստիտուտ, Յենա, Գերմանիա
[3]Շվեդիայի բնական պատմության թանգարան, Ստոկհոլմ, Շվեդիա
e-mail: mantonosyan@gmail.com

Մ. Ա. Անտոնոսյան, Դ. Ստենստոն, Ն. Ամանո,
Լ. Մ. Եպիսկոպոսյան

Քարին Տակ քարանձավի ոսկրանյութում մոլեկուլային պահպանվածության գնահատում

Տեղակայված լինելով Աֆրիկայի, Եվրոպայի և Ասիայի միջև աշխարհագրական միջանցքում՝ Հարավային Կովկասը ծառայել է որպես բնական անցուղի, որով, սկսած ստորին պալեոլիթից (հին քարի դար), Աֆրիկայից Եվրասիա են գաղթել հնագույն մարդիկ և կենդանիներ: Արդյո՞ք տարածաշրջանը վերջին սառցապատման ժամանակ ծառայել է որպես բնական ապաստարան (ռեֆուգիալ գոտի) ջերմասեր տեսակների համար: Թերևս այս հարցն առ այսօր մնում է վիճահարույց: Արցախի Քարին Տակ քարանձավի հետազոտական աշխատանքն ուղղված է վերականգնելու այդ տարածաշրջանում հնագույն մարդու կենսամիջավայրը և դրա հիման վրա ստուգելու վերջին սառցապատման ժամանակ տարածքը որպես ռեֆուգիալ գոտի ծառայելու վարկածը: Այդ նպատակով իրականացվել է քարանձավում պեղված բրածո նյութի մոլեկուլային հետազոտություն՝ ոսկրանյութում միտոքոնդրիումային ԴՆԹ-ի և կոլագենի պահպանվածության աստիճանի գնահատման համար:

M. A. Antonosyan, D. Stanton, N. Amano, L. M. Yepiskoposyan

Assessing Molecular Preservation in Fossil Bone Assemblage of Karin Tak Cave

Located in the crossroad between Africa, Europe, and Asia, the South Caucasus region served as a natural passage through which early hominins and fauna have followed during their migration from Africa to Eurasia since Palaeolithic. Additionally, it remains debated whether the region acted as a refugial zone for thermophile biota during the Last Glaciation. The exploration of Karin Tak cave aims to reconstruct early human dwelling environment and test the refugium hypothesis for the Artsakh region during the Last Glaciation. We have performed molecular analyses of fossil bones recovered from Karin Tak in order to assess the rate of preservation of mitochondrial DNA and collagen.

М. А. Антоносян, Д. Стентон, Н. Амано, Л. М. Епископосян

Оценка сохранности древних молекул в костном материале из пещеры Карин Так

Территория Южного Кавказа, находясь на перекрестке между Африкой, Европой и Азией, служила географическим коридором, по которому начиная с раннего палеолита древние гоминиды и представители фауны мигрировали из Африки в Евразию. В то же время до сих пор остается спорным вопрос о том, являлся ли данный регион рефугиальной зоной для термофильной биоты в эпоху последнего оледенения. Исследование пещеры Карин Так направлено на реконструкцию среды обитания древнего человека и на дальнейшее тестирование рефугиальной гипотезы в отношении Арцахского региона в течение последнего оледенения. С этой целью был проведен молекулярный анализ раскопанного материала для оценки степени сохранности митохондриальной ДНК и коллагена.

Գրականություն

1. *Bar-Yosef O., Belfer-Cohen A., Adler D. S.* – Anthropologie. 2006. V. 44(1). P. 49-60.
2. *Fernández-Jalvo Y., King T., Yepiskoposyan L. et al.* Azokh Cave and the Transcaucasian Corridor. 2016. Springer, Cham. P. 1-26.
3. *Gabunia L., Vekua A., Lordkipanidze D.* – J. Hum. Evol. 2000. V. 38(6). P. 785-802.
4. *Orth A., Auffray J. C., Bonhomme F.* – Heredity. 2002. V. 89(5). P. 353-357.
5. *Skourtanioti E., Erdal Y. S., Frangipane M., Restelli F. B. et al.* – Cell. 2020. V. 181(5). P. 1158-1175.
6. *Rivollat M., Jeong C., Schiffels S. et al.* – Sci. Adv. 2020. V. 6(22). eaaz5344.
7. *van de Loosdrecht M. S., Mannino M. A., Talamo S. et al.* – bioRxiv. 2020.
8. *Seersholm F. V., Werndly D. J., Grealy A. et al.* – Nat. Commun. 2020. V. 11(1). P. 1-10.
9. *Margaryan A., Derenko M., Hovhannisyan H. et al.* – Cur. Biol. 2017. V. 27(13). P. 2023-2028.

10. *Antonosyan M., Seersholm F. V., Grealy A. C. et al*. – Quat. Sci. Rev. 2019. 219. P. 102-111.
11. *Buckley M., Collins M., Thomas-Oates J. et al*. – RCM. 2009. V. 23(23). P. 3843-3854.
12. *Dabney J., Knapp M., Glocke I. et al*. – Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013. 110(39). P. 15758-15763.
13. *Damgaard P. B., Margaryan A., Schroeder H. et al.* – Sci. Rep. 2015. 5. P. 11184.
14. *Meyer M., Kircher M*. – Cold Spring Harb. Protoc. 2010. prot5448.
15. *Cappellini E., Prohaska A., Racimo F. et al*. – Annual review of biochemistry. 2018. V. 87. P. 1029-1060.