

А.С. Колясникова✉, А.С. Колясникова, П.В. Чистяков

Институт археологии и этнографии СО РАН  
Новосибирск, Россия

E-mail: a.koliasnikova@alumni.nsu.ru

## Перспективы использования технологии ZooMS для идентификации пола бизонов по белкам эмали зубов

*В статье рассматривается применение метода Zooarchaeology by Mass Spectrometry analysis, или сокращенно ZooMS, для идентификации пола Bovidae по белкам эмали ископаемых зубов. В основе этого метода лежит анализ сохранившейся белковой составляющей костной ткани. Используя диморфный белок амелогенин, который находится в составе эмали зубов, можно определить пол животного. Данный метод позволяет провести анализ без нарушения целостности исследуемого материала. При помощи ZooMS анализа в современных исследованиях специалисты узнают преимущественно видовую принадлежность костей. Метод ZooMS уже был успешно применен для определения пола древних людей, но не применялся для животных. На некоторых археологических стоянках отмечается видовой отбор животных, проводившийся древними охотниками, например неандертальцами Чагырской пещеры, охотившимися преимущественно на бизонов. Определение не только вида, но и пола ископаемых бизонов с археологических стоянок представляет большой интерес, т.к. для первобытных охотников пол животного играл большую роль, ведь различия были как в размере и весе особи, а соответственно, и в уровне сложности охоты, так и во вкусе добываемого мяса. Выяснение полового состава животных на археологических памятниках необходимо для изучения охотничьих стратегий древнего человека. Использование ZooMS для определения пола ископаемых животных не имеет ограничений по хронологическим периодам за счет хорошей сохранности амелогенина в составе эмали зубов. Это позволит применить предлагаемый метод как к материалам памятников каменного века, так и к более поздним археологическим материалам.*

Ключевые слова: ZooMS, Bovidae, амелогенин, протеомный анализ, идентификация пола, зубная эмаль, охотничьи стратегии.

Anna S. Kolyasnikova✉, Anastasiia S. Koliasnikova, Pavel V. Chistiakov

Institute of Archaeology and Ethnography SB RAS,  
Novosibirsk, Russia

E-mail: a.koliasnikova@alumni.nsu.ru

## Perspectives of Using the ZooMS Technology for Sex Estimation of Bisons by Teeth Anamel Proteins

*This article proposes to apply the method of zooarchaeology by mass spectrometry analysis (ZooMS) for establishing the sex of the Bovidae using the peptides extracted from teeth enamel. This method is based on the analysis of the preserved protein component of bone tissue. Analyzing dimorphic protein amelogenin which is a part of tooth enamel makes it possible to reveal the sex of the animal without damaging material evidence under study. Currently, scholars predominantly use ZooMS analysis for identifying the species of bone remains. While ZooMS analysis has already been successfully applied for establishing the sex of human remains, it has not been used for that purpose in zooarchaeological studies. Deliberate selection of species by ancient hunters can be observed at some archaeological sites, as it is the case with the Neanderthals of Chagyrskaya cave who predominantly hunted bisons. Establishing not only the species, but also the sex of bisons whose remains have been found at archaeological sites is of great interest since the sex of the animal played an important role for ancient hunters, determining the differences in sizes and weights of individual animals as well as corresponding differences in hunting difficulty and flavor of meat. The sex of the animals is crucial for reconstructing the hunting strategies followed by ancient humans. ZooMS analysis is not limited by chronological periods due to good preservation of amelogenin in tooth enamel. It is possible to apply the method proposed both to the material evidence of the Paleolithic sites and to more recent archaeological materials.*

Keywords: ZooMS, Bovidae, amelogenin, proteomic analysis, sex identification, teeth enamel, hunting.

При изучении первобытных сообществ особое внимание уделяется характеру взаимоотношений человека и животных. Человек, будучи охотником, практически всю историю своего существования, зависел от животных, которые были для него главным пищевым, а также сырьевым ресурсами. Исследование различных аспектов охотничьего промысла древних людей необходимо для проведения историко-культурных реконструкций.

Костные остатки и зубы являются наиболее распространенным органическим материалом, который можно получить в результате археологических раскопок. Используя его, можно определить таксономический состав и половозрастное распределение фауны на исследуемой территории. На основании полученных данных можно судить об особенностях климата и охотничьих стратегиях древнего человека. Исследование фаунистического материала также играет ключевую роль для понимания функциональной специфики отдельных археологических стоянок и конкретных трудовых операций, которые на них совершались. На сегодняшний день разработаны и применены различные методики работы с палеозоологическим материалом с археологических памятников и даже изданы учебные пособия с подробным описанием таких методик (напр.: [Klein, Cruz-Urbe, 1984; Reitz, Wing, 2008]).

Важно отметить, что идентификация животных по костным материалам зачастую затруднительна ввиду высокой степени фрагментации костных остатков и отсутствия морфологических маркеров. В итоге огромная часть остеологического материала неопределима, а в исследования попадают лишь количественные данные. Кроме того, при использовании морфологического метода определения костей существует вероятность ошибки, которая приведет к неверным результатам и выводам. С целью исключения таких ошибок и погрешностей, современная наука стремится к максимальной объективизации методов. Наиболее очевидным представляется генетический метод, основанный на анализе древней ДНК [Waugh, 2007]. Однако этот метод является деструктивным, т.к. для получения генетического материала необходимо частичное разрушение костной ткани. Помимо этого, данный метод требует хорошей сохранности органической составляющей кости.

Одним из самых практичных и перспективных методов в настоящее время является Zooarchaeology by Mass Spectrometry analysis, или сокращенно ZooMS. В его основе лежит анализ сохранившейся белковой составляющей костной ткани. ZooMS обладает рядом преимуществ перед генетическим методом, а именно: 1) белковый спектр гораздо шире

[Tuross, 1994]; 2) белки в костной ткани сохраняются лучше, чем генетический материал [Rybczynski, Gosse, Harington, 2013]; 3) метод является недеструктивным; 4) стоимость ZooMS существенно ниже стоимости генетического анализа.

Наиболее распространенным белком в организме млекопитающих является коллаген. В костях преобладает коллаген первого типа (COL1), который представлен во внеклеточном матриксе и играет ключевую роль в минерализации кости [Shoulders, Raines, 2009]. Еще могут быть использованы белки неколлагенового ряда, например остеокальцин – белок, который высвобождается остеобластами в процессе остеосинтеза. Как и коллаген, остеокальцин сохраняется в археологическом материале и может быть использован при определении таксономической принадлежности костей.

Самым предпочтительным для анализа белком является коллаген. Всего известно 28 типов коллагена, отличающихся аминокислотной последовательностью и степенью модификации – интенсивностью гидроксирования и гликозилирования. Наиболее распространены в организме (ок. 90 %) COL1, COL2, COL3 и COL4. Коллаген имеет четыре порядка компактизации. Первый порядок представляет собой тропоколлаген – левозакрученную спираль, состоящую из трех  $\alpha$ -цепей. В каждой витке  $\alpha$ -цепи содержится по три аминокислоты: пролин (Pro), гидроксипролин (Hyp) и глицин (Gly). Далее нити тропоколлагена закручиваются в фибриллы, затем фибриллы образуют пучки, которые, переплетаясь, образуют коллагеновое волокно. Нити тропоколлагена могут быть образованы различными комбинациями  $\alpha$ -цепей. Это может быть гомотример (т.е. нить, состоящая из трех идентичных  $\alpha$ -цепей) или гетеротример (в частности COL1), который содержит две одинаковые и одну варибельную  $\alpha$ -цепь. Метод определения таксономической принадлежности основан на различиях варибельной части тропоколлагена [Buckley et al., 2009].

Метод ZooMS успешно используется в современных исследованиях для определения таксономического ранга животных. В 2015 г. в работе Ф. Велкера и его коллег было проанализировано 145 образцов костей со стоянки Ле Кот (Франция). Исследование подтвердило, что ZooMS является надежным методом идентификации животных с точностью до рода/семейства. Была также показана возможность определения таксона животного по переваренным костным остаткам, что позволяет исследовать активность хищников на данной территории [Welker et al., 2015]. В работе А. Десмонд и коллег с помощью ZooMS были исследованы костные орудия из пещеры Тафораль (Грот де

Пижон) в восточном Марокко. Полученные данные помогли ученым описать процесс изготовления костяных орудий, продемонстрировали прямую связь орудийной и охотничьей активностей, а также избирательность иберомавров в видах животных при выборе сырья для этих орудий [Desmond et al., 2018]. С использованием технологии ZooMS была идентифицирована кость из Денисовой пещеры, которая принадлежала девочке – гибриду денисовского человека и неандертальца. Таким образом, при помощи ZooMS удалось доказать возможность скрещивания между этими видами [Brown, Higham, Slon, 2016].

Возможности протеомного анализа не ограничиваются определением таксономического ранга животных. Особый интерес представляет идентификация пола ископаемых останков животных, что необходимо при изучении охотничьих стратегий древних людей. Используя диморфный белок амелогенин, который сохраняется в эмали зубов, можно определить пол животного. Гены, с которых экспрессируется амелогенин, располагаются в половых хромосомах X(AMELX) и Y(AMELY). Причем белки, считываемые с этих генов, различаются аминокислотной последовательностью, что дает возможность их идентификации. В работе Дж. Паркер авторы описали метод определения пола с использованием масс-спектрометрического анализа диморфного белка амелогенина, полученного из эмали зубов. В дальнейшем метод модифицировался и успешно применялся в ряде исследований для определения пола человека [Зиганшин и др., 2020].

У представителей семейства *Bovidae*, как и у человека, гены AMELX и AMELY располагаются на половых хромосомах и аминокислотная последовательность амелогенинов так же различается в зависимости от пола [NCBI]. В данном исследовании представлена методика определения пола бизонов по амелогенинам, выделенным из эмали ископаемых зубов, с использованием технологии ZooMS.

Важнейшим преимуществом ZooMS является неdestructивность метода. Зачастую ископаемые зубы бизонов обладают плохой сохранностью. Поскольку белки AMELX и AMELY возможно выделить из эмали зуба, нарушения его целостности не требуется. Однако следует отметить, что ввиду плохой сохранности зуб иногда может разрушиться в процессе работы с ним. Поэтому, чтобы избежать потери информации о морфометрических характеристиках зубов бизонов, рекомендуется провести 3D-сканирование ценного материала перед использованием метода.

Согласно результатам многолетних исследований Чагырской пещеры значимую часть палеозоологического материала составляют остатки бизонов (*Bison priscus*), что говорит об охотничьей специализации древних обитателей данной стоянки. Неандертальцы, некогда жившие в Чагырской пещере, охотились и на лошадей Оводова (*Equus (Sussemionus) ovodovi*), северного оленя (*Rangifer tarandus*), архаров (*Ovis ammon*) и горных козлов (*Capra sibirica*). Однако абсолютное предпочтение они отдавали охоте на бизонов (*B. priscus*) [Междисциплинарные исследования..., 2018]. Эта информация была получена в результате видового определения костей со стоянки. Повышенный научный интерес составляет точное половое определение особей, на которых охотились неандертальцы. У бизонов половой диморфизм проявляется в виде отличий размеров и пропорций черепа, а также в строении посткраниального скелета [Решетов, 1974]. Для первобытных охотников пол животного играл большую роль, ведь различия были как в размере и весе особи, а соответственно, и в уровне сложности охоты, так и во вкусе добываемого мяса.

Определить пол бизонов с данной стоянки по морфометрическим характеристикам их костных остатков можно только в случаях идеальной сохранности костей для взятия основных промеров, что невозможно ввиду высокого уровня фрагментации



3D-модели зубов бизонов из Чагырской пещеры, отобранных для определения пола при помощи ZooMS анализа.

материала. Помимо человека на накопление костных остатков в отложениях Чагырской пещеры оказали влияние и хищники, такие как волки и пещерные гиены, о чем свидетельствует большое количество костей и зубов со следами кислотной коррозии в слоях 5 и 6а [Междисциплинарные исследования..., 2018; Деревянко и др., 2015; Колобова и др., 2016]. Применение метода ZooMS для исследования зубов бизонов из Чагырской пещеры позволит с высокой точностью даже в условиях фрагментации и/или деформации от кислотной коррозии узнать пол особей, являвшихся предметом охоты неандертальцев. Эти данные помогут подробнее изучить особенности охотничьего промысла и пищевых предпочтений неандертальцев из Чагырской пещеры.

Перед применением ZooMS анализа все зубы бизонов, отобранные из среднепалеолитических комплексов Чагырской пещеры, будут отсканированы на сканере Solutionix D700 с разрешением  $0,029 \pm 0,010$  мм [Чистяков и др., 2019]. Такое разрешение позволит максимально точно захватить и сохранить все мелкие детали на сканируемом объекте и отобразить в трехмерной модели (см. рисунок).

Подводя итог, стоит отметить, что применение метода ZooMS для определения пола ископаемых животных не имеет ограничений по хронологическим периодам за счет хорошей сохранности амелогенина в составе эмали зубов. Это позволяет применять предлагаемый метод как к материалам памятников каменного века, так и к более поздним археологическим материалам.

### Благодарности

Работа выполнена по проекту НИР № 0329-2019-0009 «Цифровые технологии в реконструкции стратегий жизнеобеспечения древнего населения Евразии».

### Список литературы

Деревянко А.П., Маркин С.В., Кулик Н.А., Колобова К.А. Эксплуатация каменного сырья представителями сибирячихинского варианта среднего палеолита Алтая // Археология, этнография и антропология Евразии. – 2015. – Т. 43, № 3. – С. 3–16.

Зиганшин Р.Х., Березина Н.Я., Александров П.Л., Рябинин В.В., Бужилова А.П. Оптимизация метода идентификации пола человека пептидомным анализом эмали зубов различной биологической генерации, археологического возраста и тафономической сохранности // Биохимия. – 2020. – № 5. – С. 718–728.

Колобова К.А., Маркин С.В., Чабай В.П. Костяные ретушеры в среднепалеолитических комплексах Чагырской пещеры // Теория и практика археологических исследований. – 2016. – № 4 (16). – С. 35–39.

Междисциплинарные исследования Чагырской пещеры – стоянки среднего палеолита Алтая / А.П. Деревянко, С.В. Маркин, К.А. Колобова, В.П. Чабай, Н.А. Рудая, Б. Виола, А.П. Бужилова, М.Б. Медникова, С.К. Васильев, В.С. Зыкин, В.С. Зыкина, В.С. Зажигин, А.О. Вольвах, Р.Г. Робертс, З. Якобс, Бо Ли. – Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 2018. – 468 с.

Решетов В.Ю. Сравнительно-osteологический анализ посткраниального скелета бизонов в связи с историей рода *Bison* // Териология. – 1974. – Т. 2. – С. 57–64.

Чистяков П.В., Ковалев В.С., Колобова К.А., Шалагина А.В., Кривошапкин А.И. 3D-моделирование археологических артефактов при помощи сканеров структурированного подсвета // Теория и практика археологических исследований. – 2019. – № 27 (3). – С. 102–112.

Brown S., Higham Th., Slon V. Identification of a new hominin bone from Denisova Cave, Siberia using collagen fingerprinting and mitochondrial DNA analysis // Sci. Reports. – 2016. – P. 23559.

Buckley M., Collins M., Thomas-Oates J., Julie C. Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry // Rapid Communication Mass Spectrometry. – 2009. – P. 3843–3854.

Desmond A., Bartona N., Bouzouggarb A., Douka K. ZooMS identification of bone tools from the North African Later Stone Age // J. of Archaeol. Sci. – 2018. – P. 149–157.

Klein R.G., Cruz-Uribe K. The analysis of Animal Bones from Archaeological Sites. Chicago; L.: Univ. of Chicago Press, 1984. – 266 p.

NSBI data base. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения: 19.09.2020).

Reitz E.J., Wing E.S. Zooarchaeology. – Cambridge Univ. Press, 2008. – 533 p.

Rybczynski N., Gosse J.C., Harington R.C. Mid-Pliocene warm-period deposits in the High Arctic yield insight into camel evolution // Nature Communications. – 2013. – P. 1–9.

Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen structure and stability // Annual Review of Biochemistry. – 2009. – P. 11–23.

Tuross N. The biochemistry of ancient DNA in bone // CMLS. – 1994. – P. 530–535.

Waugh J. DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls // BioEssays. – 2007. – P. 188–197.

Welker F., Soressi M., Rendu W., Hublin J., Collins M. Using ZooMS to identify fragmentary bone from the Late Middle/Early Upper Palaeolithic sequence of Les Cottés, France // J. of Archaeol. Sci. – 2015. – P. 279–286.

### References

Brown S., Higham Th., Slon V. Identification of a new hominin bone from Denisova Cave, Siberia using collagen

fingerprinting and mitochondrial DNA analysis. *Sci. Reports*, 2016, No. 23559.

**Buckley M., Collins M., Thomas-Oates J., Julie C.** Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. In *Rapid Communication Mass Spectrometry*, 2009, pp. 3843–3854.

**Chistyakov P.V., Kovalev V.S., Kolobova K.A., Shalagina A.V., Krivoshepin A.I.** 3D-modeling of archaeological artifacts by structured light scanner. In *Theory and practice of archaeological research*, 2019, No. 3 (27), pp. 102–112. (In Russ.).

**Derevianko A.P., Markin S.V., Kolobova K.A., Chabai V.P., Rudaya N.A., Viola B., Buzhilova A.P., Mednikova M.B., Vasiliev S.K., Zykin V.S., Zykina V.S., Zazhigin V.S., Volvakh A.O., Roberts R.G., Jacobs Z., Bo Li.** Multidisciplinary Studies of Chagyrskaya Cave – A Middle Paleolithic Site in Altai. Novosibirsk: IAET SB RAS Publ., 2018, 468 p.

**Derevianko A.P., Markin S.V., Kulik N.A., Kolobova K.A.** Lithic Raw Material Exploitation in the Sibiryachikha Facies, the Middle Paleolithic of Altai. *Archaeology, Ethnology and Anthropology of Eurasia*, 2015, vol. 43, pp. 3–16.

**Desmond A., Bartona N., Bouzouggarb A., Douka K.** ZooMS identification of bone tools from the North African Later Stone Age. *J. of Archaeol. Sci.*, 2018, pp. 149–157.

**Klein R.G., Cruz-Uribe K.** The Analysis of Animal Bones from Archaeological Sites. Chicago; London: Univ. of Chicago Press, 1984, 266 p.

**Kolobova K.A., Markin S.V., Chabai V.P.** Bone retouchers in the Middle Paleolithic complexes of Chagyrskaya

cave. *Theory and Practice of Archaeological Research*, 2016, No. 4 (16), pp. 37–42. (In Russ.).

**NSBI data** base. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Accessed: 19.09.2020).

**Reitz E.J., Wing E.S.** Zooarchaeology. Cambridge Univ. Press, 2008, 533 p.

**Reshetov V.Yu.** Sravnitel'no-osteologicheskii analiz postkranial'nogo skeleta bizonov v svyazi s istoriei roda *Bison*. In *Teriologiya*, 1974, vol. 2, pp. 57–64.

**Rybczynski N., Gosse J.C., Harington R.C.** Mid-Pliocene warm-period deposits in the High Arctic yield insight into camel evolution. In *Nature Communications*, 2013, pp. 1–9.

**Shoulders M.D., Raines R.T.** Collagen structure and stability. In *Annual Review of Biochemistry*, 2009, pp. 11–23.

**Tuross N.** The biochemistry of ancient DNA in bone. In *CMLS*, 1994, pp. 530–535.

**Waugh J.** DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls. In *BioEssays*, 2007, pp. 188–197.

**Welker F., Soressi M., Rendu W., Hublin J., Collins M.** Using ZooMS to identify fragmentary bone from the Late Middle/Early Upper Palaeolithic sequence of Les Cottés, France. *J. of Archaeol. Sci.*, 2015, pp. 279–286.

**Ziganshin R.H., Berezina N.Ya., Alexandrov P.L., Ryabinin V.V., Buzhilova A.P.** Optimization of the method of human sex identification by peptidomic analysis of teeth enamel of different biological generation, archaeological age and taphonomic preservation of teeth. In *Biochemistry*, 2020, pp. 718–728. (In Russ.).

Колясникова А.С. <https://orcid.org/0000-0003-2278-5948>

Колясникова А.С. <https://orcid.org/0000-0002-6356-3738>

Чистяков П.В. <https://orcid.org/0000-0001-7036-7092>