

Raport științific privind rezultatele obținute în cadrul proiectului PCCA\_1153b (contract 229/2013)

**Evoluție Genetică: Dovezi noi în studiul unor structuri interconectate.**  
**O călătorie biomoleculară în jurul Carpaților din Antichitate până în Evul Mediu**  
în perioada ianuarie-decembrie 2013

### Rezumat

În perioada 1 ianuarie – 31 decembrie 2013, în cadrul proiectului au fost preluate spre analiză și demarate investigațiile de antropologie fizică și bioarheologie moleculară pentru mai mult de 600 de schelete și alte resturi biologice (animale, vegetale) din excavațiile arheologice prezentate în segmentul **Situri arheologice și necropole investigate**. Au fost definitivat protocoale unitare de analiză pentru echipele partenerilor 1 și 2, atât pentru echipele responsabile cu analizele antropologice clasice (Anexa 1), cât și cele responsabile de analizele moleculare (extracție ADN vechi, amplificare prin PCR a secvențelor țintă, purificare ampliconi și secvențializare), inclusiv protocolul de autentificare a secvențelor de ADN vechi obținute în cele două laboratoare responsabile pentru analiza acizilor nucleici (Anexa 2). Au fost obținute primele rezultate moleculare populaționale pentru populațiile medievale de secol X din Capidava, Constanța și Mireasa, Constanța. Au fost datate cu ajutorul analizelor <sup>13</sup>C trei probe recoltate de la trei indivizi: din Curtea de Argeș sec. XIV, Mireasa, Constanța (Epoca Bronzului) și Suplacu de Barcău (jud. Bihor) (Neolitic). Pentru aceste trei probe a fost analizată și fracționarea izotopilor stabili ai carbonului (C). Au fost obținute primele rezultate în studiile de documentare moleculară a unor presupuse patologii (diabet și tuberculoză) și a comunităților bacteriene asociate cu resturile umane arheologice și efectele pe care acestea le au asupra materialului osteologic, cu implicații în conservarea acestui material. Analizele complementare ca spectroscopia în infraroșu (FT-IR) și difracția de raze X (XRD) au adus primele rezultate privind efectul unor infecții cu *Micobacterium tuberculosis*, sau asociate unor afecțiuni metabolice (diabetul) asupra fracțiunii minerale a oaselor. Se testează utilitatea acestor metode în diagnosticul acestui tip de patologii. Aceleași metode au fost utilizate pentru determinarea condițiilor de incinerare pentru indivizi recuperați dintr-o excavație arheologică datată, pe baza inventarului, în Epoca Fierului (Hunedoara). Cantitatea și calitatea ADN vechi extras a fost corelată cu indici calculați pe baza analizelor FT-IR cu scopul de a estima utilitatea acesteia ca metodă de selecție a surselor de material genetic, funcție de gradul de conservare a fracțiunii organice din os. Microscopia electronică de baleiaj a fost utilizată pentru a caracteriza material vegetal (bârne de lemn) provenind dintr-o cameră mortuară acoperită de un tumul (Mireasa, Constanța, Epoca Bronzului) cu scopul de a estima gradul de conservare al acestuia și/sau identificarea speciei vegetale.

Rezultatele preliminare obținute au fost valorificate prin prezentări la conferințe științifice internaționale (6 prezentări orale în anul 2013 și 1 conferință invitată - *invited talk*, 6 prezentări orale și 4 postere acceptate la conferințe ce se vor desfășura în anul 2014).

Lista publicațiilor ce conțin rezultatele parțiale obținute în primele 15 luni ale proiectului se regăsește în Anexa 4.

### Obiective propuse

Conform actului adițional nr.2/2013 la Contractul de finanțare pentru execuție de proiecte de cercetare nr. 229/2013 (nr ieșire UEFISCDI PT83/19.04.2013) partenerii proiectului și-au asumat următoarele obiective pentru perioada 1 ianuarie – 31 decembrie 2013:

1. Documentare și schimburi științifice
2. Investigații paleo-osteologice
3. Recuperarea ADN vechi – testare și standardizare metodă
4. ADN vechi – secvențializare și genotipare
5. Analize izotopi stabili ai carbonului (C) și azotului (N), pentru caracterizarea dietei

6. Analize complementare (SEM, spectroscopie etc.)
7. Săpături arheologice și procesarea inventarului material
8. Studii de arhivă

Rezultatele așteptate convenite în cadrul cererii de finanțare depuse inițial, identice cu cele declarate la debutul finanțării anului în curs și specificate în actul adițional mai sus menționat sunt:

- Depunerea raportului anual
- Depunerea raportului științific
- Depunerea raportului financiar
- Participarea la conferințe științifice

În plus față de aceste rezultate programate, în cadrul proiectului a fost organizat workshop-ul “Interdisciplinaritatea în bioarheologie” în data de 29 noiembrie 2013, la sediul Centrului de Biologie Moleculară din cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio – Nano - Științe al Universității Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca. Deoarece unul din dezideratele acestui proiect, specificat în cererea de finanțare inițială, a fost formarea unei generații de arheologi capabili să înțeleagă și să utilizeze tehnici moderne, interdisciplinare de analiză a artefactelor arheologice și a materialului biologic rezultat din excavații, grupul țintă vizat de acest workshop a fost alcătuit din studenții, masteranzii și doctoranzii Facultății de Istorie și Filosofie din cadrul Universității Babeș-Bolyai. Workshop-ul a inclus prezentări teoretice și exerciții practice în domeniul Antropologiei fizice și Bioarheologiei moleculare.

Lista participanților la workshop și materialele oferite în mapa workshopului se regăsesc atașate acestui raport în Anexa 3.

Lista publicațiilor ce conțin rezultatele preliminare obținute în primele 15 luni ale proiectului se regăsește în Anexa 4.

#### Situri arheologice și necropole investigate:

În perioada ianuarie – decembrie 2013, în cadrul proiectului sunt investigate următoarele necropole:

#### Echipa P1 – Universitatea „Babeș-Bolyai” din Cluj-Napoca

Nr. Crt.	Sit arheologic	Nr. de indivizi (estimativ)	Perioada	Inventar osteologic animal	Ritual funerar	Observații
1	Suplacu de Barcău (jud. Bihor)	2	7000 BP	NU	Înhumare Incinerare	Presupus diabetic
2	Mireasa (jud. Constanța)	11	4500 BP	DA	Înhumare	
3	Cristian (jud. Sibiu)	5	Neolitic	?	?	Recepționați Octombrie 2013
4	Turdaș (jud. Hunedoara)	5	Neolitic	?	?	Recepționați Octombrie 2013
5	Fântânele (jud. Bistrița)	zeci	Sec. III BC	?	Incinerare	
6	Autostrada Arad-Tișoara	3	Sarmați?	NU	Înhumare	
7	Hunedoara (jud. Hunedoara)	50	Sec. IBC-IAD	DA	Înhumare Incinerare	
8	Miercurea Sibiului (jud. Sibiu)	13	Sec. IBC-IAD	?	?	Recepționați Octombrie 2013
9	Boldești Grădiștea (jud. Prahova)	20	Sec. IV-V AD	DA	Înhumare	- Presupus tuberculos
10	Mireasa (jud. Constanța)	150	Sec. al X-lea AD	DA	Înhumare	

11	Capidava (jud. Constanța)	10	Sec. al X-lea AD	DA	Înhumare	
12	Coconi (jud. Călărași)	12	Sec. XIII-XV AD	?	Înhumare	
13	Feleac (jud. Cluj)	60	Sec. XIII-XVII AD	NU	Înhumare	
14	Gheorgheni (jud. Harghita)	100	Sec. XVII-XIX AD	NU	Înhumare (osuar)	
15	Cripta Bisericii Franciscane (jud. Cluj)	? Min. 150	Sec. XVII-XIX AD	DA (resturi animale din epoca romană)	Înhumare (osuar)	
<b>TOTAL 2013</b>		Aprox. 600	7000 BC- sec. XIX AD			

**Echipe P2 – Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași**

Lotul investigat de echipa 2 este reprezentat de 8 schelete.

Nr. Crt.	Sit arheologic	Nr. de indivizi (estimativ)	Perioada	Inventar osteologic animal	Ritual funerar	Observații
1	Vorniceni – Pod Ibăneasa, jud. Botoșani	2	Sec. II-III AD Eneolitic	NU	Înhumare	
2	Isaiia, Balta Popii, com. Răducăneni, jud. Iași	4	Sec. I-II AD	NU	Înhumare	
3	Popeni Cherchez, com. Găgești, jud. Vaslui	1	2800-2005 BC	?	Înhumare	
4	Târnița	1	?	?	?	
<b>TOTAL 2013</b>		8	Eneolitic – sec. II-III AD			

**Investigațiile osteoarheologice** au implicat recoltarea sau preluarea probelor, înregistrarea lor în laborator, spălarea și efectuarea măsurătorilor și observațiilor care au condus la:

- identificarea gradului de reprezentare și conservare a scheletelor;
- atribuirea sexului;
- atribuirea vârstei la momentul decesului;
- identificarea și caracterizarea traumelor și patologiilor;

Exemple ale unor rapoarte predate responsabililor de săpătură se regăsesc în Anexa 5.

**Markerii moleculari investigați în cadrul acestui studiu sunt:**

**A. Regiunile hipervariabile I și II din regiunea de control a genomului mitocondrial**

Alegerea acestora se datorează:

1. Faptului că genomul mitocondrial este cantitativ mai bine reprezentat în probele vechi, șansa să se obțină rezultate reproductibile pentru toate loturile investigate fiind mult mai mare.
2. Studiile de genetica populațiilor umane vechi sunt dominate de publicații care vizează acești markeri moleculari.

Informațiile privind acești markeri moleculari ne permit să caracterizăm structura genetică a populațiilor studiate, să reconstituim ereditatea lor pe linie maternă, să deducem tipare de migrație și schimburi intrapopulaționale, să deducem preferințe privind tiparele reproductive etc., în loturile studiate.

Faptul că este folosit în cadrul acestui proiect pentru a analiza și loturi reprezentative pentru populația modernă ne permite să stabilim conexiuni între populațiile vechi și cele moderne, să

identificăm factorii principali care au contribuit semnificativ la modelarea structurii genetice a populațiilor în timp (bariere geografice, factori sociali – etnia, religia etc.) și să identificăm contribuția populațiilor vechi la alcătuirea populației moderne.

#### Investigații moleculare (aspecte metodologice):

**A.a. Lotul modern** cuprinde în acest moment mai mult de 200 de persoane și va fi extins până la finalul anului 2014.

1. Recoltarea probelor la lotul modern. Recoltarea s-a făcut prin raclaj al mucoasei bucale, cu ajutorul unor tampoane special create în acest scop (*Isohelix DNA Buccal Swabs*, Cell Projects Ltd., UK) (Figura 1), după ce participanții la studiu au semnat consimțământul informat și au completat un chestionar privind ereditatea pe linie maternă (Anexa 6).

2. Extracția ADN genomic și amplificarea regiunilor HVRI și HVRII pentru un lot modern, reprezentativ pentru structura genetică a populației contemporane de pe teritoriul României. Acest lot, împreună cu secvențele disponibile în bazele de date (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vor constitui etalonul cu care vor fi comparate secvențele omoloage pentru populațiile vechi investigate. Compararea dintre lotul modern și loturile vechi vor permite urmărirea evoluției structurii genetice a populațiilor în timp și spațiu, precum și identificarea factorilor ce au influențat în mod concret această evoluție.



Figura 1. Tampoane pentru raclajul mucoasei bucale (*Isohelix DNA Buccal Swabs*)

Extracția ADN-ului genomic pentru lotul modern a fost făcută cu ajutorul kit-ului *Animal and Fungi DNA Preparation Kit*, PP-208L (Jena Bioscience, Germania), respectând instrucțiunile producătorilor.

Secvențele obținute până în prezent pentru regiunile hipervariabile I și II, amplificate utilizând amorsele MPS1A F15989 și MPS4B R377 (Gabriel et al, 2001) au o lungime de aproximativ 1100 pb și permit încadrarea indivizilor pentru care s-a realizat analiza în haplogrupuri mitocondriale distincte. În lotul experimental modern supus analizei domină macrohaplogrupurile H și JT, urmate de o prezență redusă a haplogrupurilor U4, U5, HV, K, I, X2 și N1a. Frecvența acestor variante în populația analizată în cadrul acestui studiu se încadrează în intervalele semnalate în literatură pentru populația europeană.

**A.b. Extracția ADN vechi** s-a efectuat după un protocol optimizat care are la bază izolarea ADN vechi prin tehnica fenol și cloroform, fiind singurul protocol folosit de către ambele echipe P1 și P2 care au drept activitate extracția de ADN vechi din oase umane și animale (Figura 2). Acesta este descris în Anexa 2.

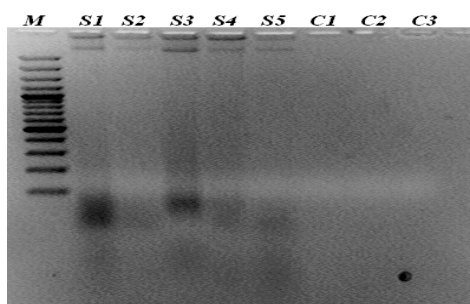


Figura 2. Verificarea cantității și calității ADN-ului vechi extras pe gel de agaroză.

În următoarea etapă a proiectului va fi verificat gradul de certitudine pentru analizele ADN prin rularea probelor în laboratorul partener (P1, respectiv P2).

**B. Alți markeri moleculari folosiți în cazuri speciale, alte direcții de cercetare:**

**B.a. Identificarea și caracterizarea infecției cu *Micobacterium tuberculosis***

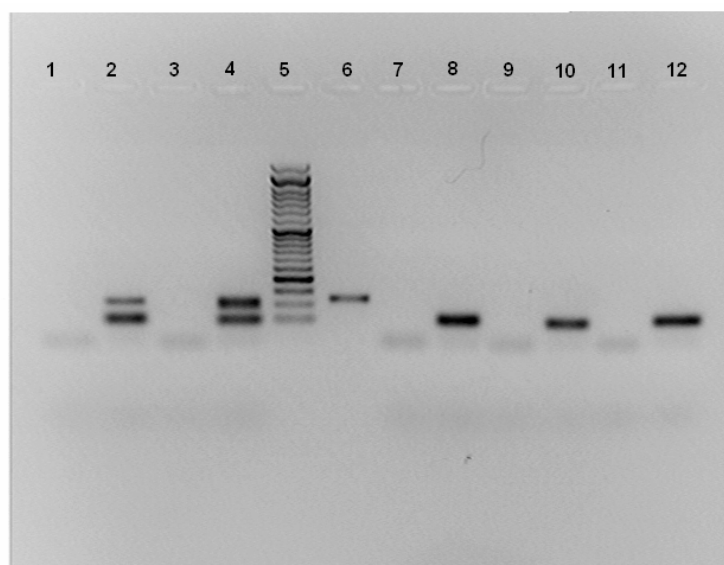


Figura 3. Amplificare pncA la individul M3 Gherăseni (presupusă infecție cu *Micobacterium tuberculosis*)

Individul testat: Gherăseni M3.

ADN a fost amplificat prin tehnica PCR folosind amorsele pncA F2 și pncA R2 (gena pentru pirazinamidaza / nicotinamidaza). Am folosit 3μl ADN genomic. S-au realizat 2 reacții succesive. În primul amestec de reacție s-a adăugat 1mg/ml BSA. În a doua reacție s-a adăugat 1μl din produsul primei reacții. S-a folosit polimeraza MangoTaq (Bioline) 1unitate/reacție și MgCl<sub>2</sub> 2mM. Fragmentul amplificat are 117 pb.

Program PCR:

95°C - 5 min	} 30X
95°C - 30 sec	
60°C - 30 sec	
72°C - 15 sec	

72°C - 10 min

4°C - ∞

Electroforeza în gel de agaroză 2%, 85V, 1 oră.

Ordinea probelor în gel ( I - produs al primei reacții, II - produs al celei de-a doua reacții):

1. (I) ADN genomic extras din coastă
2. (II) ADN genomic extras din coastă
3. (I) ADN genomic extras din apofize spinoase sudate aparținând unor vertebre cervicale
4. (II) ADN genomic extras din apofize spinoase sudate aparținând unor vertebre cervicale
5. Marker 50 pb
6. Control pozitiv
7. (I) ADN genomic extras din radius (diafiză)
8. (II) ADN genomic extras din radius (diafiză)
9. (I) Control negativ de extracție
10. (II) Control negativ de extracție
11. (I) Control negativ de PCR
12. (II) Control negativ de PCR

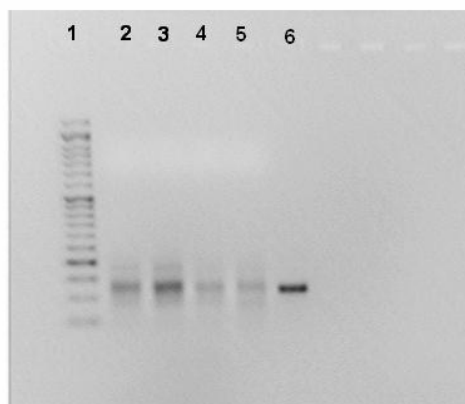


Figura 4. Amplificare pncA la individul M4 Gherăseni (presupusă infecție cu *Micobacterium tuberculosis*) – optimizarea metodei

Individul testat: Gherăseni M4 (optimizare metodă)

PCR folosind amorsele pncA F2 - pncA R2. Am încercat 2 amestecuri cu MgCl<sub>2</sub> de 1mM și 1,5mM. Am folosit ADN extras dintr-o coastă ce prezenta leziuni tipice tuberculozei. S-au folosit 1μl respectiv 1μl diluat de 10X de ADN genomic (s-a realizat anterior un alt PCR cu aceleași amorse, iar banda corespunzătoare controlului pozitiv a fost purificată din gelul de agaroză). S-a folosit polimeraza MangoTaq (Bioline) 1unitate/reacție. Fragmentul amplificat are 117 pb.

Program PCR:

95°C - 5 min  
95°C - 30 sec  
62°C - 30 sec  
72°C - 15 sec  
72°C - 10 min  
4°C - ∞

} 30X

Electroforeza în gel de agaroză 2%, 75V, 1 oră. Ordinea probelor în gel:

1. Marker 50 pb
2. MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl diluat de 10X
3. MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl nediluat
4. MgCl<sub>2</sub> 1mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl diluat de 10X
5. MgCl<sub>2</sub> 1mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl nediluat
6. Control negativ de PCR

În figura 5 este prezentat un spectru FT-IR pentru o probă osoasă extrasă dintr-o vertebră lombară cu corpul vertebral colapsat. Se pot observa vîrfurile date de grupările metil, metilen și de "long chain deformation". Cumulat, acestea indică prezența unor acizi grași cu catenă foarte lungă, posibil acizi micolici.

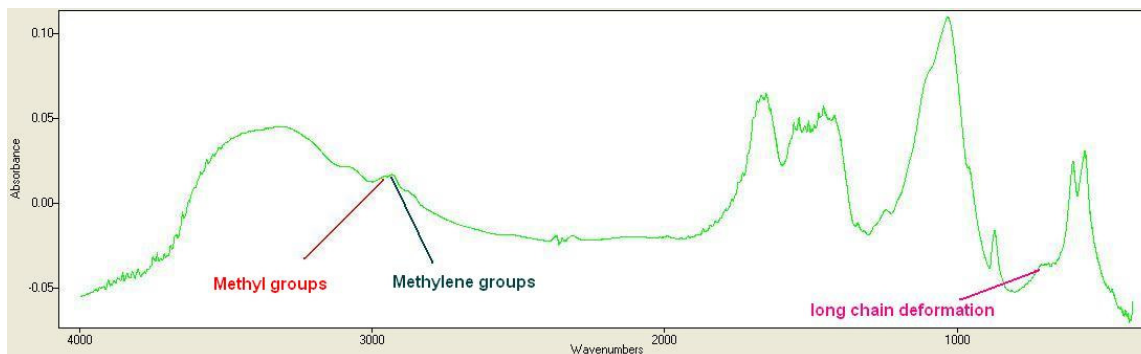


Figura 5. Utilizarea spectroscopiei IR (FTIR) pentru identificarea probelor cu anumite patologii – în acest caz tuberculoza) – se observă semnalul pentru grupările metil și metilen, absente în probele fără patologii.

### B.b. Diagnosticarea moleculară a unui presupus caz de diabet

Au fost proiectate și testate pe ADN modern amorse specifice unor loci asociați în literatura de specialitate cu patologii asociate diabetului de tip 2.

GCK (Glucokinaza) → MODY 2

Forward: CACATCCTAGCCTGCTTCCC  
 Reverse: TGGTCACCATGACAACCACA  
 Product length: 132



Figura 6. Teste amorse GCK (Glucokinaza) – probe moderne

HNF1A (hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A) → MODY3

Forward CCCTGTGGCAGCCGAG  
 Reverse TTCTCCAGCCAGGAGGTAGG  
 Product length 141

HNF4A →MODY1

**Forward** CCGTGGGGAACAAGGATGTAA  
**Reverse** TAGAGTCAGGAGATCAGGCC  
**Product length** 131

CAPN10 (Calpain 10) →Insulin resistance

**Forward** ACACCGGATGCCAGAGAGTT  
**Reverse** CATCCTACCAAGTCAAGGCT  
**Product length** 111

MTTL1 mitochondrially encoded tRNA leucine 1) → Maternally Inherited Diabetes and Deafness

**Forward** TTATACCCACACCCACCCAAG  
**Reverse** GGTACAATGAGGAGTAGGAGGT  
**Product length** 143

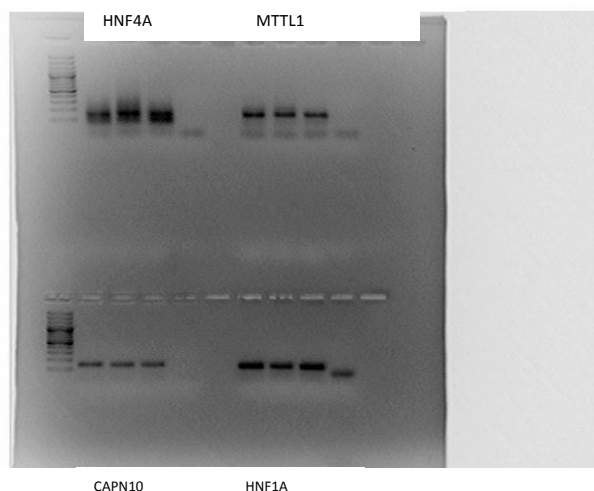


Figura 7. Teste amorse loci HNF4A, MTTL1, CAPN10, HNF1A – probe moderne

**C. Investigarea diversității comunităților bacteriene din resturi umane arheologice în vederea caracterizării atacului microbial și rolului său în degradarea oaselor**

**Obiective:**

1. Determinarea structurii comunităților de bacterii din sol și oase;
2. Caracterizarea diversității comunităților bacteriene și stabilirea rolului unor bacterii în degradarea osului.

**Plan de lucru:**

1. Colectarea probelor de os (doar oase intacte al căror interior nu a avut contact cu solul) și de sol care a avut contact cu osul analizat.
2. Extracția ADN genomic din probele colectate cu ajutorul unui kit specific de extracție și purificarea de ADN genomic (ADNg) din probele de sol.



3. Determinarea concentrației și purității ADN<sub>g</sub> purificat: spectrofotometric, cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză.
4. Amplificarea unui fragment țintă din gena pentru ARN ribosomal (ARN<sub>r</sub>) 16S prin tehnica PCR cu ajutorul unor amorse (oligonucleotide) specifice.
5. Purificarea produșilor PCR și determinarea secvențelor prin tehnica de pirosecvențializare.
6. Analiza datelor brute de pirosecvențializare și identificarea taxonilor.

#### Stadiu actual al studiului:

1. Au fost recoltate mai multe probe de sol și os din care a fost extras ADN<sub>g</sub>.
2. A fost determinată spectrofotometric concentrația ADN<sub>g</sub> purificat, concentrațiile au avut valori cuprinse între 10 și 20 ng/μl.
3. S-au proiectat și comandat amorsele fuzionate ce vor fi utilizate la PCR și apoi pentru pirosecvențializare.

#### D. Datarea probelor cu radiocarbon

În vederea publicării datelor au fost trimise spre analiză și sunt în curs de investigare trei probe: Vlaicu (Curtea de Argeș - datarea 2), Suplacu de Barcău (presupus diabetic) și Mireasa (lotul Epoca Bronzului).

#### E. Analize de izotopi stabili C și N

În vederea publicării datelor a fost stabilit un contact cu laboratorul de analize izotopice al Universității Tuebingen, Germania. Loturile Mireasa (Epoca Bronzului), reprezentate atât de lotul resturilor umane, cât și animale fiind în curs de analiză.

#### Participări conferințe:

- 2013
  - Third Arheoinvest Congress, Iunie 2013, Iași, RO
    - Prezentare orală (Claudia Radu)
  - Sesiunea internațională a Muzeului de Istorie Națională și Arheologie Constanța – Pontica – Octombrie 2013, Constanța, RO
    - Prezentare orală (Beatrice Kelemen – coautor)
  - Interethnic Relationships in Transylvania. Militaria Mediaevalia in Central and South East Europe, Octombrie 2013, Sibiu, RO
    - Prezentare orală (Claudia Radu, Beatrice Kelemen)
  - Neoliticul Transilvaniei. "Lumea Nouă – Lumea Zau", Noiembrie 2013, Zalău, RO
    - Prezentare orală (Ioana Mihalache, Claudia Radu, Beatrice Kelemen)
  - Conferința Internațională a Departamentului de Tracologie (Institutul de Arheologie și Muzeu al Academiei Bulgare), 21-24 Sofia, Bulgaria
    - Prezentări orale (Radu Băjenaru și Vlad Zirra)
    -

#### Alte conferințe la care participarea a fost acceptată

- 
- 2014
  - WiBioSe, Februarie 2014, Serbia
    - Beatrice Kelemen – conferință invitată - *invited speaker*
    - Cecilia Chiriac, Cristina Mircea, Ioana Mihalache, Ioana Rusu (masterande) – prezentări orale (cu Beatrice Kelemen – coordonator – ultim autor - pentru fiecare prezentare orală)
    - Andra Tătar (masterandă) – poster (cu Beatrice Kelemen – coordonator – ultim autor)
  - International Medieval Congress, Iulie 2014, Leeds, UK
    - Prezentare orală (Claudia Radu, Beatrice Kelemen)

- European Archaeological Association Symposium, Septembrie 2014, Istanbul, TR
  - Prezentare orală (Claudia Radu, Beatrice Kelemen – abstract acceptat)
- 1<sup>st</sup> Young Natural History scientists' Meeting, 12-14 Februarie 2014, Paris, FR
  - 3 postere - Ioana Mihalache, Cristina Mircea, Ioana Rusu – masterande (cu Beatrice Kelemen – coordonator – ultim autor)

**Organizare workshop:**

29 Noiembrie 2013 – Interdisciplinaritatea în Bioarheologie – Cluj-Napoca la Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe, Centrul de Biologie Moleculară.

A fost organizat un workshop interdisciplinar, practic, adresat studenților la Arheologie (Universitatea "Babeș-Bolyai" din Cluj-Napoca) pentru a le prezenta tehnicile moleculare ce pot fi folosite pentru caracterizarea inventarului osteoarheologic (vezi Anexa 3).

Deplasările membrilor echipei proiectului în țară și străinătate au vizat documentarea în instituții cu activitate recunoscută în domeniul de activitate al proiectului, stabilirea de contacte internaționale, identificarea unor potențiale loturi populaționale cu conexiuni cu populațiile aflate deja în studiu.

Sumar al obiectivelor și activităților partenerilor în etapa a II-a a proiectului.

1. Optimizarea protocolului de extracție ADN vechi din os și dinte.
2. Identificarea punctelor în care are loc contaminarea și eliminarea ei.
3. Identificarea calității materialului extras.
4. Histomorfometrie în vederea restrângerii intervalului de vârstă în momentul decesului.
5. Caracterizarea proceselor care contribuie la degradarea osului în sol și în spațiul de depozitare.
6. Caracterizarea regiunilor hipervariabile I și II din regiunea de control a genomului mitocondrial la probele moderne și vechi.
7. Identificarea și caracterizarea moleculară a infecției cu *Micobacterium tuberculosis* la schelete cu patologii atribuite tuberculozei osoase.
8. Metode moleculare de diagnosticare a diabetului (teste – schelet neolitic – Suplacu de Barcău).
9. Spectrometrie IR (FTIR) pentru caracterizarea fracțiunilor minerale și organice în probe de os normal și patologic în vederea identificării unor semnături tipice pentru anumite patologii (diabet, tuberculoză).
10. Spectrometrie IR (FTIR), difracție de raze X (XRD) pentru identificarea temperaturilor de ardere în cazul oaselor incinerate.

Anexa 1 Analize de Antropologie Fizică

a) Fișa de preluare a scheletului uman (model)

Fișa nr.:	Denumire sit:		Cod sit (CIMEC):	
4	Isaia-Balta Popii, com. Răducăneni, jud. Iași M8/2003		98710.01	
Context funerar	Groapă		Umplutură	Amenajare funerară
	Formă	Adâncime		
Necropolă de inhumație	Oval-alungită (1.80mx0.80m)	Conturul gropii 1.10 m Partea inferioară 1.10 m	nu	nu
			Orientare	
			NNV Privirea spre est	
			Desen	Fotografie
Descrierea scheletului:				
1. Cap	Craniul deformat datorat practicii bandajării aplicată la vârsta copilăriei			
2. Corp				
3. Brațul drept	Situat pe lângă corp			
4. Brațul stâng	Îndoit din cot și cu palma pe abdomen			
5. Piciorul drept	Întins pe spate			
6. Piciorul stâng	Întins pe spate			
Starea de conservare	Relative bună			
Stratigrafie	M8 a fost găsit în caseta E, la marginea sud-vestică a locuinței precucuteniene nr. 8			
Încadrare cronologică	A doua jumătate a sec. I – sec. II d.Hr			
Atribuire culturală	Perioada sarmatică (roxolani)			
Alte comentarii	Sex feminin; adult; aproximativ 30 de ani; tipul nordoid în amestec cu trăsături protoeuropoide; înălțime de 1.57m. Inventar funerar: a. cel puțin 12 mărgelă din sticlă și pasta de sticlă în zona picioarelor (glezna dreaptă-culoare gălbui-aurii; glezna stângă-culoare albăstruie) Nicolae Ursulescu, Raluca Kogălniceanu, <i>Necropola sarmatică de la Isaia (c. Răducăneni, j. Iași). Date preliminare</i> , in <i>Cercetări Istorice XXI-XXIII, 2002-2004</i> (2007), p. 27-58, Complexul Muzeal Național „Moldova”, Iași Georgeta Miu. Studiul antropologic al scheletelor din necropola sarmatică de la Isaia, in <i>Cercetări Istorice XXI-XXIII, 2002-2004</i> (2007), 59-71. Proba pentru analiza ADN a fost recoltată din zona humerusului.			

**b) Protocol investigații antropologie fizică (Laborator UBB și platforma Arheoinvest) - cuprins**

PROTOCOLUL DE LUCRU AL LABORATORULUI DE ANTROPOLOGIE FIZICĂ

CENTRUL DE BIOLOGIE MOLECULARĂ  
INSTITUTUL DE CERCETĂRI INTERDISCIPLINARE ÎN BIO-NANO ȘTIINȚE  
UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI

Claudia Radu  
realizat cu sprijinul  
Dr. Andrei Soficaru  
Dr. Beatrice Kelemen

Acest document este pentru uz intern în cadrul Centrului de Biologie Moleculară al Universității Babeș-Bolyai.

CLUJ-NAPOCA  
2013

CUPRINS

1. Starea de reprezentare.....	4
2. Starea de conservare.....	5
3. Determinarea sexului	
3.1. Determinarea sexului pe craniu.....	6
3.2. Determinarea sexului pe coxal.....	7
4. Determinarea vârstei la deces	
4.1. Morfologia capetelor sternale.....	11
4.2. Morfologia simfizei pubiene.....	12
4.3. Morfologia suprafeței auriculare.....	14
4.4. Sinostoza suturilor craniene.....	15
4.5. Uzura dentară.....	17
4.6. Erupția dentară.....	17
4.7. Lungimea oaselor.....	18
4.8. Sinostoza epifizelor.....	33
5. Analiza dentiției	
5.1. Inventarul dinților și a aspectelor patologice.....	39
5.2. Uzura molarilor.....	40
5.3. Localizarea și morfologia aspectelor patologice.....	41
6. Patologie	
6.1. Artroza articulațiilor.....	41
6.2. Leziuni periostitice.....	43
6.3. Patologii metabolice	
6.3.1. <i>Cribra orbitalia</i> și Hiperostoza porotică.....	44
6.3.2. Scorbut.....	44
6.3.3. Rahitism.....	45
6.4. Patologia vertebrelor.....	45
6.5. Entesopatii.....	45
6.6. Patologie VI.....	64
7. Trăsături non-metrice.....	64

8. Traume și fracturi	
8.1. Fracturi.....	67
8.2. Traume.....	68
8.3. Activități medicale.....	68
9. Bibliografie.....	69

## Anexa 2 – Protocol optimizat de extracție ADN vechi

### Extracția aDNA din oase umane și animale

#### 1. PROTOCOL PCI

##### 1. Tampon pentru decalcifiere și digestie:

Conține: *TrisHCl* 50mM (pH=8), *SDS* 10%, *EDTA* 0,5mM.

5% *TrisHCl* (stoc 1M); 40% *SDS* (stoc 50%); 0,1% *EDTA* (stoc 0,5M); 74,9%  $H_2O$

##### 2. Soluții stoc:

**1. Soluție *Tris-HCl* 1M (pH=8):** - cantitățile sunt calculate pentru un volum de 100ml;

- se dizolvă 12,11g *Tris* în 80ml  $H_2O$  miliQ;

- se corectează pH-ul la 8 cu *HCl*;

- se autoclavează.

**3. Soluție *NaOH* 10N (100ml):**

- se cântăresc 40g *NaOH*

- se adaugă 70ml  $H_2O$ -miliQ autoclavată și se agită până la dizolvare;

- se aduce volumul la 100ml;

- nu se autoclavează.

**4. Soluție *SDS* 25% (dodecil sulfat de sodiu):**

- se introduc 50g *SDS* în 50ml  $H_2O$ -miliQ autoclavată și se încălzește soluția la 80°C pentru dizolvare;

**5. Soluție *EDTA* 0,5M (etilendiaminotetraacetat-sare disodică) :**

- se cântăresc 18,61g *EDTA*, peste care se adaugă 80ml  $H_2O$ -miliQ;

- se agită puternic și se adaugă 1ml soluție *NaOH* 10N;

- se adaugă *NaOH* până când soluția devine alcalină (pH=8,0), iar *EDTA* este dizolvat complet.

- se aduce volumul la 100ml cu  $H_2O$ -miliQ și se autoclavează;

1 ml tampon pentru Decalcifiere și digestie + 50 ul *Proteinază K* 20mg/ml (C finală 1mg/ml)

##### **Soluție Acetat de Na 3M (pH 5.2) – 50ml**

- se cântăresc 20,4g Acetat de Na, peste care se adaugă 40ml  $H_2O$ -miliQ

- se adaugă Acid Acetic până când soluția devine acidă (pH=5,2).

- se aduce volumul la 50ml cu  $H_2O$ -miliQ și se autoclavează;

##### **Material:**

S-au utilizat 200mg pudră de os compact + 1ml tampon pentru decalcifiere și digestie + 50ul *Proteinază K* 20mg/ml (C finală 1mg/ml)

##### **Protocol:**

##### **Incubare la 56°C peste noapte**

Centrifugare 6000xg – 5 min (transfer supernatant)

Supernatant + 1 volum PCI (vortex)

Centrifugare 6000xg – 15 min (transfer faza superioară)

Faza superioară + 1 volum PCI (vortex)

Centrifugare 6000xg – 15 min (transfer faza superioară)

Faza superioară + 1 volum C (vortex)

Centrifugare 6000xg – 15 min (transfer faza superioară)

Faza superioară + 2,5 volume Etanol Absolut + 1/10 volume Acetat de Na 3M pH 5.2

##### **Incubare 3°C 30 min**

Centrifugare 12000xg – 15 min

Pelet + 1 ml Etanol 80% (se amestecă ușor)

Centrifugare 12000xg – 15 min

Pelet + 1 ml Etanol 80% (se amestecă ușor)

Centrifugare 12000xg – 15 min

Uscare pelet la temperatura camerei 37°C 12 min

Eluție ADN 100ul  $H_2O$  (incubare peste noapte 3°C)

**Anexa 3 – Detalii Workshop – Interdisciplinaritatea în Bioarheologie, 29 noiembrie 2013, Cluj**

Listă participanți

<b>Nr. crt.</b>	<b>Prenume Nume</b>	<b>Facultate</b>
1	Horațiu Cociș	Arheologie, licență II
2	Dragoș Mitrofan	Arheologie, licență II
3	Paul Vădineanu	Arheologie, licență II
4	Ion Petruș	Arheologie, licență II
5	Xenia Pop	Zooarheologie, masterat
6	Vicențiu Pușcașu	Istoria artei, licență II
7	Lucian Muntean	Arheologie și studii clasice I
8	Dan Morariu	Arheologie și studii clasice I
9	Alexandru Buda	Politehnica, Materiale
10	Mihai Băraian	Politehnică, Tehnologii în sudură
11	Xenia Păușan	
12	Raul Cioban	Fizică, licență III

Materiale de prezentare oferite participanților



<p><b>Coordonator</b>  <b>Institutul de Biologie București – Academia Română</b>                  Acad. Octavian Popescu – director de proiect</p> <p>Splaiul Independenței 296, București 060031, OP-CP 56-53, ROMANIA                  Telefon: +4 0212219202, Fax: +4 0212219071                  Email: biologie@ibiol.ro</p>		<p>Proiect PCCA Tip I                  Program: PARTENERIATE ÎN DOMENII PRIORITYARE                  PN-IE-PT-PCCA-2011-3 1-1153                  Nr. Contract: 229/2013</p>
<p><b>Partener 1</b>  <b>Universitatea "Babeș-Bolyai" – Cluj-Napoca</b>  <b>Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio.&amp;Nano-Stilute</b>                  Centrul de Biologie Moleculară</p> <p>Șef de lucrări dr. Beatrice Simona Kelemen                  Responsabil proiect – partener 1</p> <p>Treboniu Laurian 42, Cluj-Napoca 400271,                  Telefon: +4 0264454554,                  Email: bca.kelemen@gmail.com</p>		
<p><b>Partener 2</b>  <b>Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" – Iași</b>  <b>Departamentul de Istorie Antică și Arheologie</b></p> <p>Șef de lucrări dr. Neculai Bolohan                  Responsabil proiect – partener 2</p> <p>Carol I, 11, Iași 700506, Romania                  Email: neculaibolohan@yahoo.com</p>	<p><b>contact</b></p>	

Odată cu apariția tehnicilor moleculare, nicio disciplină biologică nu a putut rămâne neschimbată. Astăzi, teoriile clasice sunt verificate cu ajutorul unor analize moleculare. Adesea, rezultatele tehnicilor moleculare pun sub semnul întrebării ipotezele anterioare. Arheologia și istoria, două discipline ce par a fi sortite unei forme pure, clasice, tind acum spre interdisciplinaritate. Fiind discipline ce istorice și reconstruiesc vieti trecute, ele implică și studiul resturilor vegetale, animale și umane, fiind de asemenea influențate de revoluția moleculară ce afectează și alte domenii biologice.

Echipa extinsă a acestui proiect reunește istorici, arheologi, biologi, medici și fizicieni ce vor aborda într-un mod interdisciplinar studiul populațiilor umane vechi ce au ocupat, în diverse perioade și regiuni din jurul Carpaților, teritoriul României de azi. Obiectivul proiectului nostru este acela de a alcătui o echipă interdisciplinară tânără care să funcționeze dincolo de limitele proiectului în domeniul bioarheologiei, cu responsabilități științifice (cercetare academică), comercială (evaluarea și analizarea unor probe pentru terți) și formative (transmiterea informației către următoarea generație de bioarheologi, prin cursuri, workshop-uri etc.).

Nume	Prenume	Pozitia
Popescu	Octavian	director proiect
Ghețea	Ligia	consultant
		consultant, cetățean străin
Netea	Mihai	
Pop	Ioan Aurel	consultant
Băjenaru	Radu	cerc. postdoctorand
Ionijă	Adrian	cerc. postdoctorand
Marcu Istrate	Daniela	cerc. postdoctorand
Motoc	Rozalia	cerc. postdoctorand
Sălăgean	Tudor	cerc. postdoctorand
Simon	Alexandru	cerc. postdoctorand
Zirra	Vlad	cerc. postdoctorand
Constantin	Marian	doctorand
Morănescu	Florică	tehnician
Părvu	Cornel	tehnician
Știrbu	Cristian	cercetător
Kelemen	Beatrice	responsabil echipă P1
Barbu-Tudoran	Lucian	cerc. postdoctorand
Dumert	Annette	cerc. postdoctorand
Gruian	Cristina	cerc. postdoctorand
Lazăr	Adriana	cerc. postdoctorand
Lupan	Iulia	cerc. postdoctorand
Ponta	Oana	cerc. postdoctorand
Radu	Teodora	cerc. postdoctorand
Tămașan	Monica	cerc. postdoctorand
Turcu	Flaviu	cerc. postdoctorand
Vasilescu	Mihai	cerc. postdoctorand
Radu	Claudia	masterand
Bolohan	Neculai	responsabil echipă P2
Gorgan	Lucian	cerc. postdoctorand
Mătau	Florică	cerc. postdoctorand

sporirea și standardizarea prelevării și analizei de aDNA printr-o abordare interdisciplinară (biologie moleculară și fizică)

stabilirea relațiilor genealogice în necropole/cimitirele relevante

ilustrarea structurii genetice ale populațiilor în momente diferite ale istoriei într-un spațiu geografic cu o demografie dinamică

caracterizarea populațiilor-țintă prin obiceiuri cotidiene, printr-o abordare metodologică modernă: dietă (analiza izotopilor stabili de C și N), rituri funerare (stabilirea temperaturii de incinerare prin metode spectroscopice), patologii non-traumatice relevante (incidența anomaliilor genetice)

urmărirea coevoluziei om-animal prin prisma geneticii (ex. amprenta genetică a animalelor domestice sacrificate, a celor oferite ca ofrandă sau a celor găsite în populație migrante identificate)

<b>descriere</b>	<b>echipa</b>	<b>obiective</b>
------------------	---------------	------------------



**Anexa 4 – Publicații în anul 2013**

1. Bioarchaeological analysis of human remains from the necropolis of Gherăseni. Preliminary results and discussions.

autori: **Claudia Radu**, Szeredai Norbert, Vlad-Andrei Lăzărescu, Bogdan Ciupercă, **Beatrice Kelemen**  
în *Ephemeris Napocensis* XXIV - 2014.

2. Bioarchaeological study of a skeleton belonging to the Suplacu Group, dated in the Middle Neolithic period.

autori: **Claudia Radu**, Ioana Mihalache, Gruia Fazecaș, Florin Gogâltan, **Beatrice Kelemen**  
în *Acta Musei Porolissensis* XXXV - 2013.

## Anexa 5 – Rapoarte analiză antropologie fizică predate responsabililor de excavație (exemple)

### 1. Raport: antropologie fizică

Campania: **Capidava 2013**

În campania 2013, din excavația de la Capidava au fost colectate pentru analiză antropologică patru schelete umane cu context arheologic clar și două seturi de resturi umane subadulte fără context arheologic (umplutură). În plus, apar resturi umane disparate, din umplutură, care neavând context, nu sunt cuprinse în cadrul acestei analize.

Scheletele au fost numerotate M6, M8, M9, M10, respectiv U1 și U2.

Pentru fiecare schelet au fost analizați următorii parametri:

- Inventarul osos: 68 variabile, scor 0-3 (0=absență os; 1=representare sub 50% a osului; 2=representare între 50-75% a osului; 3=representare peste 75% a osului). Variabilele reprezintă fie un os, fie un segment de os.
- Gradul de conservare a scheletului (tafonomia): 68 variabile, scor 0-3 (0=lipsa osului; 1=conservare slabă-75% din suprafața osului este erodată/alterată sub acțiunea solului; 2=conservare moderată-50% din suprafața osului este erodată/alterată sub acțiunea solului; 3=conservare bună-25% sau mai puțin din suprafața osului este erodată/alterată sub acțiunea solului). Variabilele reprezintă fie un os, fie un segment de os.
- Descrierea dentiției: prezențe, absențe antemortem/postmortem; tartru – scor 0-3 (0= fără tartru; 1=depunere slabă de tartru; 2= depunere moderată de tartru; 3=depunere considerabilă de tartru), periodontită, hipoplazie.
- Vârsta:
  - subadultți
- erupția dinților, lungimea oaselor lungi, gradul de sutură al epifizelor oaselor lungi adulți
- erupția dinților, uzura dinților permanenți, lungimea oaselor lungi, gradul de sutură al epifizelor oaselor lungi, analiza capetelor sternale ale coastelor, aspectul simfizei pubiene, aspectul suprafeței auriculare, sinostoza suturilor craniene.
- Artroza articulațiilor
- Leziuni periostitice
- Patologii
- Traume: fracturi, lovituri

**M6 – subadult, sex nedeterminat, 38-40 săptămâni prenatal, fără traume, fără patologii.**

**Inventar osos:** scor pentru 68 variabile 0,91 (pierderea a mai mult de 50% din schelet). Reprezentare slabă.

**Conservare:** scor pentru 68 de variabile 0,79 (75% din suprafața oaselor analizate este erodată/alterată sub acțiunea solului) – conservare slabă.

**Inventar dentiție:** există dinți deciduali neerupți (pentru radiologie).

**Sex:** indeterminabil prin metode de antropologie fizică.

**Vârsta:** dinți deciduali neerupți (40 săptămâni prenatal), măsurători osteologice (38 săptămâni prenatal).

**Artroza articulațiilor:** nu e cazul.

**Leziuni periostitice:** pe diafiza oaselor lungi (inclusiv coaste și claviculă) apar la suprafața osului modificări cu aspect periostitic, dar cel mai probabil, nu au cauze patologice, ci se datorează procesului de creștere/dezvoltare, având în vedere că individul este subadult (38-40 săptămâni prenatal).

**Patologii:** nu există.

**Traume:** nu există.

**M8 – adult, femeie, 20-24 ani, traume: lovitură slabă cu obiect contondent, antemortem parietal stâng; fractură oblică coastă (stângă), vindecată, fără urme de infecție.**

**Inventar osos:** scor pentru 68 variabile 2,85 (este prezent mai mult de 75% din schelet). Reprezentare foarte bună.

**Conservare:** scor pentru 68 de variabile 2,91 (sub 25% din suprafața oaselor analizate este erodată/alterată sub acțiunea solului) – conservare foarte bună.

**Inventar dentiție:** prezenți 31 (nu a erupt M3 maxilar stâng – pentru radiologie). 3 carii. Tartru mandibular slab, absent maxilar. Periodontită maxilară slabă, absentă mandibular. Nu prezintă linii hipoplazice.

**Sex:** femeie (CRANIU: creastă nucală – NA, proces mastoid – 4, margine supraorbitală 3, glabella – NA, Menton 4; PELVIS: concavitatea subpubiană – 5, unghi subpubian – 6, ram ischiopubian – 8, arc ventral – 6, arc compozit – 8, incizura sciatică – 4, sulcus preauricular – 2).

**Vârsta:** Sudarea epifizelor oaselor lungi – 16-24 ani, aspectul capetelor sternale ale coastelor – 16-19 ani, aspectul simfizei pubiene – 25 ani, suprafața auriculară – 20-24 ani, sinostoza suturilor craniene – extern – 34,7 ani (puțin informativ) .

**Artrorza articulațiilor:** osteofite mai mici de 3mm pe: humerus distal stâng, radius distal stâng, oasele mâinii stânga și dreapta, femur proximal stâng, tibie proximal stânga și dreapta, tibie distal stânga. Markerii de activitate, posibilă predominantă stânga.

**Leziuni periostitice:** striatii longitudinale accentuate pe femur stâng, restul oaselor prezente fără modificări.

**Patologii:** nu există.

**Traume:** Lovitură slabă cu obiect contondent, antemortem, vindecată, parietal stâng, fără infecție. Diametrul traumei 10,78mm. Fractură oblică, vindecată, fără infecție, treime sternală coastă stânga. Dimensiunea calusului 14,43mm.

**Observații:** pată circulară roșiatică pe craniu în zona medială a suturii lambdoide cu diametrul de 56,49mm (probabil impresia lăsată de material metalic sau textil); inel roșiatic extern concentric cu pata descrisă mai sus cu diametrul de 88,53mm (probabil impresia lăsată de material metalic sau textil).

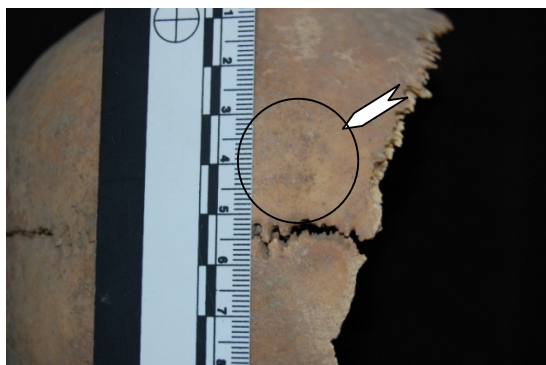


Fig. 1 – traumă craniană, parietal stâng

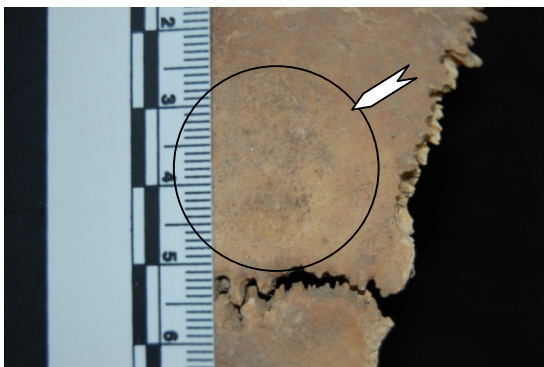


Fig. 2 – traumă craniană, parietal stâng - detaliu

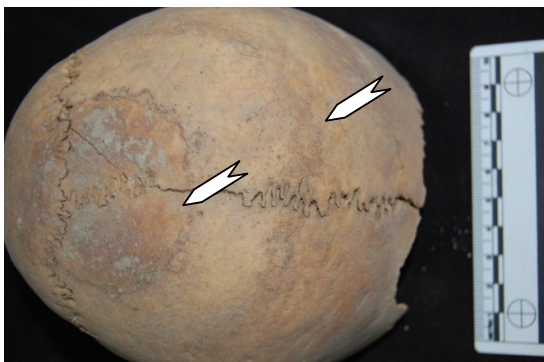


Fig. 3 – urmele colorate, concentrice din apropierea suturii lambdaoide



Fig. 4 – fractură oblică vindecată antemortem treime sternală a unei coaste stângi

**M9 - subadult, sex nedeterminat, 2,6-4 ani, fără traume, fără patologii.**

**Inventar osos:** scor pentru 68 variabile 1,01 (pierderea a mai mult de 50% din schelet). Reprezentare slabă.

**Conservare:** scor pentru 68 de variabile 01,06 (75% din suprafața oaselor analizate este erodată/alterată sub acțiunea solului) – conservare slabă.

**Inventar dentiție:** 16 dinți deciduali erupți; există dinți deciduali neerupți (pentru radiologie).

**Sex:** indeterminabil prin metode de antropologie fizică.

**Vârsta:** erupție dentară (3-4 ani), măsurători osteologice (2,6-3 ani).

**Artoza articulațiilor:** nu e cazul.

**Leziuni periostitice:** pe oasele prezente nu există.

**Patologii:** nu există.

**Traume:** nu există.

**M10 - subadult, sex nedeterminat, 0-2 luni postnatal, fără traume, fără patologii.**

**Inventar osos:** scor pentru 68 variabile 1,88 (între 50 - 75% din schelet). Reprezentare moderată.

**Conservare:** scor pentru 68 de variabile 2,04 (între 50-75% din suprafața oaselor analizate este erodată/alterată sub acțiunea solului) – conservare moderată.

**Inventar dentiție:** există dinți deciduali neerupți (pentru radiologie).

**Sex:** indeterminabil prin metode de antropologie fizică.

**Vârsta:** erupție dentară (0-2 luni), măsurători osteologice (0-2 luni).

**Artroza articulațiilor:** nu e cazul.

**Leziuni periostitice:** pe oasele prezente nu există.

**Patologii:** nu există.

**Traume:** nu există.

**U1**

Oasele lungi nu prezintă epifize. Oasele inventariate: 8 coaste, 5 arcuri vertebrale nesudate, 1 corp vertebral, 6 falange, humerus D incomplet distal, femur S,D, tibie S,D, fibulă S,D. Pe baza măsurătorilor efectuate pe oasele lungi atribuim vârsta de 1,5 luni postnatal, fără posibilitatea de determinare a sexului prin metode de antropologie fizică.

**U2**

Reprezentare foarte slabă, conservare foarte slabă, pe baza erupției dentare și lungimii oaselor lungi se atribuie vârsta de 0-6 luni postnatal. Nu prezintă artroza articulațiilor, leziuni periostitice, patologii sau traume.

Reprezentarea grupului pe clase de vârstă:

CAPIDAVA 2010, 2013										
Numar de invidizi pe grupe de varsta										
GRUPE DE VARSTA	DJD	CRIBRA	PERIOSTITA	CARII	ABCESE	TARTRU	PERIODONTITA	HIPOPLAZIE	TRAUME	PAT. SPECIALA
6-10								1		
11-15					1	1		1		
21-25	1		1	1		1	1		1	
36-40	1	1	1	1		1	1	1		
41-45	1				1	1			1	
46-50	1	1	1	1	1	1	1	1		
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

GRUPE DE VARSTA/SEX	Sub 0	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60	60+	TOTAL
MASCULIN									1						1
FEMININ						1				1	1				3
SUBADULT	1	2	1	1											5
INDETERMINAT															0
TOTAL	1	2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	9

Observator 1: Claudia Radu \_\_\_\_\_

Observator 2: Ioana Rusu \_\_\_\_\_

Observator 3: Cristina Mircea \_\_\_\_\_

Responsabil proiect PCCA\_1153/2011/P1-UBB

Dr. Beatrice Kelemen

## 2. Raport antropologic pentru materialul osteologic de la Gheorgheni- Biserica Romano-Catolică

Radu Claudia\*, Szeredai Norbert\*, Király Lajos\*, Beatrice Kelemen\*

\*Centrul de Biologie Moleculară, Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano Științe, Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca

Materialul osteologic a fost sortat în funcție de tipul de os, de parte (stânga, dreapta) sau porțiune (distală, medială, proximală) și de element de diagnostic (ex. procesul mastoid). Ținându-se cont de această împărțire, oasele au fost numărate pentru a se stabili numărul minim de indivizi (MNI). S-au folosit următoarele elemente osteologice:

Element osteologic	MNI
Frontal	9 (12)*
Occipital	6 (9)*
Proces mastoid dreapta	8 (11)*
Proces mastoid stânga	13 (16)*
<b>Mandibulă</b>	<b>58</b>
Claviculă dreapta	36
Claviculă stânga	23
Cavitatea glenoidă dreapta	19
Cavitatea glenoidă stânga	24
<b>Humerus distal dreapta</b>	<b>43</b>
Humerus distal stânga	30
Sacrum	20
<b>Femur dreapta</b>	<b>42</b>
Femur stânga	32
Patella dreapta	20
Patella stânga	14
Tibie dreapta	28
Tibie stânga	23
Talus dreapta	32

Talus stânga	33
Calcaneu dreapta	24
Calcaneu stânga	30
Ilium dreapta	21
Ilium stânga	22

Tab. 1.

\* pe lângă aceste elemente, mai există trei cranii relativ întregi, astfel că pentru stabilirea MNI pentru fiecare element cranian în afară de mandibulă, trebuie să se adauge 3 (ex. pentru frontal MNI=9+3=12)

Așa cum reiese din Tab. 1., cel mai ridicat număr minim de indivizi s-a obținut din numărarea mandibulelor (N=58). Humerusul drept distal și femurul drept au oferit de asemenea valori înalte (N=43, respectiv N=42), dar totuși semnificativ reduse față de mandibulă. Diferențele dintre rezultatele obținute pentru toate elementele analizate pot reflecta modul în care aceste oase au fost prelevate în vechime pentru a fi mutate.

Dintre elementele osteologice prezente, s-a insistat pe analiza iliumului și a mandibulelor. De asemenea, s-au analizat în detaliu cele trei cranii păstrate relativ întregi.

Fragmentele de ilium au fost cercetate în vederea stabilirii sexului prin observarea mării incizuri sciatic. Astfel, s-au obținut următoarele date:

Ilium							
Dreapta				Stânga			
Masculin	Feminin	Indeterminat	Subadult	Masculin	Feminin	Indeterminat	Subadult
0	5	2	14	4	2	0	16
<b>Total</b>			<b>21</b>	<b>Total</b>			<b>22</b>

Tab. 2. Distribuția populației în funcție de sex, determinat pe baza observării morfologiei ilium-ului.

Dat fiind că numărul total de indivizi obținut prin numărarea ilium-ului reprezintă aproximativ doar o treime din numărul de indivizi oferit de numărarea mandibulelor, s-a insistat pe studiul acestora din urmă.

Sex/Vârstă	Subadulți (N=39)			Adulți (N=22)				Adult	Total
	0-5 ani	6-10 ani	11-16 ani	17-25 ani	25-35 ani	35-45 ani	45+		
Masculin	-	-	-	2	3	-	-	3	<b>8</b>
Feminin	-	-	-	-	2	1	2	3	<b>8</b>
Adult indeterminat	-	-	-	-	-	-	-	6	<b>6</b>
Subadult	21	16	2	-	-	-	-	-	<b>39</b>
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>12</b>	<b>61</b>

Tab. 3. Distribuția pe grupe de vârstă și pe sex (informații obținute din observarea mandibulelor)

Mandibula oferă posibilitatea stabilirii sexului și vârstei prin analiza eminenței mentale, respectiv a uzurii dentare. Pentru determinarea sexului s-au folosit protocoalele descrise în *Standards* (Buikstra, Ubelaker 1994) și *Data Collection Codebook* (Steckel et al. 2006). Pentru stabilirea vârstei s-a folosit schema lui Brothwell pentru uzura dentară (White et al. 2012). Din păcate, sexul stabilit doar prin observarea eminenței mentale, în lipsa altor elemente de diagnostic, are o marjă de eroare ridicată, rezultatul fiind limitat.

Mandibula, de asemenea, permite observarea dentiției inferioare. S-au analizat următoarele patologii:

- dinți pierduți antemortem;
- carii dentare;
- abcese;
- tartru;
- periodontită;
- hipoplazia lineară a enamelului dentar.

Distribuția acestora în funcție de sex și pe grupe de vârstă arată astfel:

VÂRSTĂ	SEX	DPPAM*	DC*	ABCESE	TARTRU	PERIO*	HLE*
0-5 ani	M*	-	-	-	-	-	-
	F*	-	-	-	-	-	-
	IND*	-	-	-	-	-	-
	SUB*	-	-	-	-	-	-
6-10 ani	M	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-
	IND	-	-	-	-	-	-
	SUB	-	3	-	-	-	-
11-16 ani	M	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-
	IND	-	-	-	-	-	-
	SUB	-	-	-	-	-	-
17-25 ani	M	-	1	-	1	-	-
	F	-	-	-	-	-	-
	IND	-	-	-	-	-	-
	SUB	-	-	-	-	-	-
25-35 ani	M	-	1	-	2	-	1
	F	1	1	1	1	1	-
	IND	-	-	-	-	-	-
	SUB	-	-	-	-	-	-
35-45 ani	M	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-
	IND	-	-	-	-	-	-
	SUB	-	-	-	-	-	-
45 +	M	-	-	-	-	-	-
	F	1	1	1	1	1	-
	IND	-	-	-	-	-	-
	SUB	-	-	-	-	-	-
Adult*	M	2	1	1	-	1	-
	F	3	-	3	1	-	-
	IND	5	-	2	-	-	-
	SUB	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>		<b>12</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>1</b>

Tab.4. Distribuția patologiilor dentare pe grupe de vârstă. În tabel e trecut numărul de indivizi, nu numărul de leziuni.



\*DPPAM- dinți permanenți pierduți antemortem.

\*DC- dinți cariati.

\*PERIO- periodontită.

\*HLE- hipoplazia lineară a enamelului.

\*M=masculin; F=feminin; IND=adult, sex indeterminat; SUB=subadult (<17 ani).

\*ADULT- indivizi a căror vârstă nu a putut fi determinată cu exactitate, dar pe baza trăsăturilor generale s-a putut stabili că sunt adulți.

		DPPAM	DC	ABCESE	TARTRU	PERIO	HLE	TRAUME	C.O/H.P.
ADULT	M	2	3	1	3	1	1	0	0
	F	5	2	5	3	2	0	2	3
	IND	5	0	2	0	0	0	1	0
Subadult		0	3	0	0	0	0	2	0
Total		12	8	8	6	3	1	5	3

Tab. 5. Distribuția patologiilor în funcție de sex și vârstă (fără grupe de vârstă).

\*C.O./H.P. - *cribra orbitalia*/hiperostoza porotică

În cadrul ansamblului de oase amestecate au fost identificate trei cranii relativ întregi. Pentru acestea s-a realizat stabilirea sexului, determinarea vârstei, analiza dentiției și identificarea patologiilor și traumelor posibil prezente. Din păcate, în nici unul din cele trei cazuri nu s-a păstrat mandibula. Pentru determinarea sexului s-au observat creasta (linia) nucală, procesul mastoid, marginea supraorbitală, glabella și eminența mentală, iar stabilirea vârstei s-a făcut pe baza sinostozei suturilor craniene. Pentru determinarea ambelor atribute biologice s-au utilizat sistemele de observare din *Standards* (Buikstra, Ubelaker 1994) și *Data Collection Codebook* (Steckel et al. 2006).

Astfel, Craniul nr. 1 prezintă o stare de conservare și reprezentare bună (peste 75%) (Fig. 2.). Sexul a fost determinat ca posibil feminin iar vârsta este cuprinsă între 34,7 și 45,5 ani. Maxilarul a mai păstrat doar 8 dinți, dintre care unul prezintă o carie dentară ocluzală și un abces. Pe suprafața calotei craniene se observă leziuni specifice hiperostozei porotice.

Craniul nr. 2 aparține unei femei cu o vârstă cuprinsă între 30 și 40 de ani. Dintre cei 6 dinți păstrați pe maxilar, nici unul nu prezintă patologii. Pe suprafața palatului orbital sunt prezente leziuni indicatoare pentru *cribra orbitalia* iar pe suprafața calotei craniene există leziuni specifice hiperostozei porotice. Pe frontal a fost identificată o traumă, realizată cu un obiect cu vârf rotund, cu o dimensiune de 14,49mm în diametru (Fig. 1.). Leziunea e poziționată pe mijlocul suprafeței anterioare a frontalului (pe frunte), pe sutura metopică, care la acest individ este extinsă până la sutura coronară și nu este închisă. Dat fiind faptul că nu există urme de vindecare, trauma a fost cel mai probabil realizată *perimortem*.

Craniul nr. 3 aparține unei femei cu o vârstă cuprinsă între 39,4 și 51,9 ani. Pe locul de articulare a mandibulei cu temporalul (articulația temporo-mandibulară) se observă artroză puternică, bilateral (Fig. 10). Ca și în cazul celorlalte două cranii, există leziuni hiperostozeice pe calota craniană. Acest individ prezintă o serie de traume. Prima, identificată pe parietalul stâng în zona suturii sagitale, măsoară 16,79mm. Forma sa circulară sugerează că a fost realizată cu un obiect contondent, cu vârf rotund. Calusul format pe marginile loviturii indică faptul că la momentul morții aceasta era deja vindecată, prin urmare a fost realizată antemortem. A doua lovitură este o fractură cu înfundare (*depressed fracture*), poziționată pe frontal, deasupra glabellei și măsoară 10,92mm în diametru (Fig. 4). Lovitura a fost realizată cu un obiect contondent, cu vârf rotund; compactul (osul cortical) de pe suprafața exocraniană a fost înfundat spre interior, fără a se rupe. Marginile leziunii prezintă

urme slabe de vindecare; de asemenea, în jurul loviturii se observă activitate vasculară, asociată cu procesul de vindecare. Prin urmare, momentul realizării loviturii poate fi plasat cu puțin timp înaintea morții. Traumele 3, 4 și 5 se observă pe frontal, medial, lângă sutura coronară și măsoară fiecare în jurul a 30mm (Fig. 5). Toate trei au fost realizate cu un obiect tăios. Nici una nu prezintă urme de vindecare, prin urmare foarte probabil au fost suferite *perimortem*.

În continuare, pe două mandibule și un frontal au fost de asemenea identificate traume.

Mandibula nr. 2 aparține unui individ adult târziu, al cărui sex nu a putut fi identificat (Fig. 6). Vârsta sa înaintată poate fi dedusă din pierderea completă a dentiției și închiderea spațiilor alveolare. În dreapta mentonului se poate observa o fractură prin înfundare (*depressed fracture*), cu un diametru de 12,76mm, realizată cu un obiect cu vârf rotund. Nu se observă activitate de vindecare, prin urmare trauma a fost probabil suferită *perimortem*.

Mandibula nr. 46 aparține unui subadult cu vârsta de 6 ani (Fig. 7). O traumă a fost identificată în dreapta mentonului; aceasta măsoară 14,75mm în lungime și a fost realizată cu un obiect tăios. Nu există urme de vindecare, ceea ce plasează realizarea ei în jurul momentului morții (*perimortem*).

Pe un frontal de subadult s-a identificat un fragment de material anorganic (fier, piatră, ??) prins încă în os, provocând o fractură prin înfundare (*depressed fracture*) (Fig. 11). Endocranium se poate observa perforarea osului și așchiera lui. Nu există urme de vindecare, prin urmare trauma a fost suferită *perimortem*.

Materialul osteologic prezintă dovezi pentru existența stresului nutrițional și ocupațional în rândul grupului populațional studiat. Prezența artrozei severe pe corpurile vertebrale (Fig. 9) indică un stres ocupațional, cauzat de activitățile realizate de indivizi. *Cribra orbitalia*, hiperostoza porotică și hipoplazia lineară a enamelului dentar sunt patologii provocate de deficiențe nutritive suferite în timpul creșterii și dezvoltării. Prin urmare, sunt indici pentru tipul de alimentație oferit copiilor. *Cribra orbitalia* și hiperostoza porotică (Fig. 3 și Fig. 11) sunt răspunsuri osoase pentru anemia megaloblastică, cauzată de lipsa vitaminei B12. Hipoplazia lineară a enamelului dentar (Fig. 8) este reprezentată de leziuni pe suprafața smalțului dentar; fiecare leziune este cauzată de o perioadă de stres nutritiv puternic.

În ceea ce privește traumele, acestea au fost identificate doar pe subadultii și indivizii adulți de sex feminin. Poziționarea traumelor, pe craniu, poate sugera violență interpersonală, de tipul violenței domestice.

Toate aceste date trebuie corelate cu analiza celorlalte schelete din ansamblul osteologic de la Gheorgheni-Biserica Romano-Catolică. O interpretare populațională poate oferi concluzii cu privire la stilul de viață dus de indivizii ce compun acest grup populațional.

IMAGINI



Fig. 1. Craniul nr. 2 (săgeata indică trauma).



Fig. 2. Craniul nr. 1.



Fig. 3. Hiperostoza porotică.



Fig. 4. Craniul nr. 3 (vedere anterior laterală).



Fig. 5. Craniul nr. 3. Detaliu traume *perimortem*.



Fig. 6. Mandibula nr. 2.

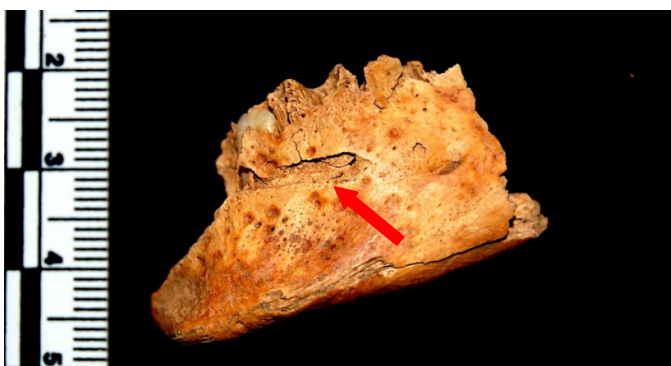


Fig. 7. Mandibula nr. 46.



Fig. 8. Detaliu. Hipoplazia lineară a enamelului dentar.



Fig. 9. Osteofite pe o vertebră toracică.



Fig. 10. Craniul. nr. 3. Artroza articulației temporo-mandibulare.

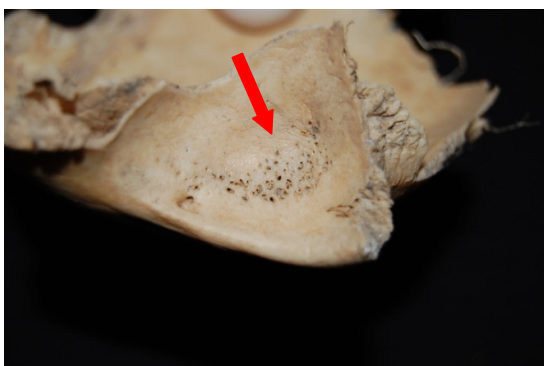


Fig. 11. *Cribră orbitalia*.



Fig. 12. Fragment anorganic pe frontalul unui subadult (vedere exocraniană).

Anexa 6 - Extras Chestionar ereditate maternă – aplicat lotului modern

Ereditate mitocondrială - 2013 - Chestionar																																																	
<b>Date personale</b> COD _____ Nume _____ Nume înainte de căsătorie _____ Prenume _____ Data nașterii (zz luna yyyy)* _____ Locul nașterii (localitate, județ, țară)* _____ Localitatea de domiciliu (localitate, județ, țară)* _____ Naționalitate* _____ Etnie (ex. român, german/sas, german/schwab etc.)* _____ Religie* _____ Sex* <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M Copii (număr) ♂ _____ ♀ _____																																																	
<b>Date de contact</b> e-mail _____ (e-mail, telefon) telefon _____																																																	
<b>Consimțământ informat</b> Probele (swaburi bucale) donate vor fi supuse extracției de ADN genomic. Acesta va fi folosit pentru amplificarea regiunilor HVRI și HVRII din regiunea mitocondrială de control. Analiza secvențelor rezultate va conduce la predicția haplogrupului mitocondrial din care faceți parte și va fi comunicat prin metoda de contact preferată. Datele obținute vor fi utilizate în cadrul unui studiu de screening a distribuției haplogrupurilor mitocondriale în România, studiu în care vi se asigură anonimatul. Probele de ADN genomic vor fi distruse după publicarea rezultatelor în articolele științifice vizate și nu va fi folosit pentru alte experimente/studii.																																																	
<b>Afecțiuni (acolo unde sunt cunoscute)</b> <table border="1"> <tr> <td>Pierderea acuității auditive</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>vârsta debut</td> <td>manifestare</td> </tr> <tr> <td>Pierderea acuității vizuale</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>vârsta debut</td> <td>manifestare</td> </tr> <tr> <td>Atrofia optică Leber</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>vârsta debut</td> <td>manifestare</td> </tr> <tr> <td>Diabet</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>vârsta debut</td> <td>tipul</td> </tr> <tr> <td>Boli cardiovasculare</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>vârsta debut</td> <td>tipul</td> </tr> <tr> <td>Afecțiuni degenerative</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>vârsta debut</td> <td>boala</td> </tr> <tr> <td>Afecțiuni oncologice</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>cancer</td> <td>alte/observații</td> </tr> <tr> <td>Afecțiuni psihiatrice</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>tipul</td> <td>alte/observații</td> </tr> <tr> <td>Colesterol mărit</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>cauze</td> <td>manifestare</td> </tr> <tr> <td>Obezitate</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>cauze</td> <td>manifestare</td> </tr> <tr> <td>Altele</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Osteoporoză</td> <td>detalii</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Intoleranță la exercițiu</td> <td>detalii</td> </tr> </table>		Pierderea acuității auditive	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	manifestare	Pierderea acuității vizuale	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	manifestare	Atrofia optică Leber	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	manifestare	Diabet	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	tipul	Boli cardiovasculare	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	tipul	Afecțiuni degenerative	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	boala	Afecțiuni oncologice	<input type="checkbox"/>	cancer	alte/observații	Afecțiuni psihiatrice	<input type="checkbox"/>	tipul	alte/observații	Colesterol mărit	<input type="checkbox"/>	cauze	manifestare	Obezitate	<input type="checkbox"/>	cauze	manifestare	Altele	<input type="checkbox"/>	Osteoporoză	detalii		<input type="checkbox"/>	Intoleranță la exercițiu	detalii
Pierderea acuității auditive	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	manifestare																																														
Pierderea acuității vizuale	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	manifestare																																														
Atrofia optică Leber	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	manifestare																																														
Diabet	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	tipul																																														
Boli cardiovasculare	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	tipul																																														
Afecțiuni degenerative	<input type="checkbox"/>	vârsta debut	boala																																														
Afecțiuni oncologice	<input type="checkbox"/>	cancer	alte/observații																																														
Afecțiuni psihiatrice	<input type="checkbox"/>	tipul	alte/observații																																														
Colesterol mărit	<input type="checkbox"/>	cauze	manifestare																																														
Obezitate	<input type="checkbox"/>	cauze	manifestare																																														
Altele	<input type="checkbox"/>	Osteoporoză	detalii																																														
	<input type="checkbox"/>	Intoleranță la exercițiu	detalii																																														
<b>Mama</b> Nume _____ Nume înainte de căsătorie _____ Prenume _____ Data nașterii (zz luna yyyy) _____ Locul nașterii (localitate, județ, țară) _____ Data decesului (zz luna yyyy)(unde este cazul) _____ Locul decesului (localitate, județ, țară)(unde este cazul) _____ Cauza decesului (unde este cazul) _____ Naționalitate _____ Etnie (ex. român, german/sas, german/schwab etc.) _____ Religie _____ Copii (număr) ♂ _____ ♀ _____																																																	
<b>Bunica maternă (mama mamei)</b> Nume _____ Nume înainte de căsătorie _____ Prenume _____ Data nașterii (zz luna yyyy) _____ Locul nașterii (localitate, județ, țară) _____ Data decesului (zz luna yyyy)(unde este cazul) _____ Locul decesului (localitate, județ, țară)(unde este cazul) _____ Cauza decesului (unde este cazul) _____ Naționalitate _____																																																	
<b>Afecțiuni</b> Dacă persoana a manifestat afecțiuni din tabelul de mai sus, vă rugăm enumerați-le și oferiți detaliile accesibile																																																	
<b>Afecțiuni</b> Dacă persoana a manifestat afecțiuni din tabelul de mai sus, vă rugăm enumerați-le și oferiți detaliile accesibile																																																	