

Raport științific privind rezultatele obținute în cadrul proiectului PCCA_1153b (contract 229/2013)

**Evolutie Genetica: Dovezi noi în studiul unor structuri interconectate.
O calatorie biomoleculara în jurul Carpatilor din Antichitate pâna în Evul Mediu**

în perioada ianuarie-decembrie 2014

Cuprins:

1. Rezumat
2. Sinteza rezultatelor obținute în perioada ianuarie – decembrie 2014
3. Anexe I – Rezultatele principalelor direcții de cercetare în anul 2014
 - a. Studiul I
Utilitatea spectroscopiei FT-IR în determinarea randamentului extracției de ADN din oase arheologice
 - b. Studiul II
Diagnosticul molecular al tuberculozei la o populație gotică din Gherăseni, România
 - c. Studiul III
Diversitatea genetică reflectată de analiza regiunii de control mitocondriale la o populație de secol X din Capidava (Constanța, România)
 - d. Studiul IV
Optimizarea diagnosticului molecular al sexului la probe arheologice umane
 - e. Studiul V
Diagnosticul interdisciplinar al unui caz de diabet din perioada neolitică
 - f. Studiul VI
Mormântul 10 din Biserica Sf. Nicolae Domnesc de la Curtea de Argeș
 - g. Studiul VII
Copilul de la Mălăiești (MMPP)
4. Anexe II – Rapoarte de antropologie fizică pentru loturile procesate în anul 2014
 - Raport arheozoologic – Miercurea Sibiului 2014
 - Raport antropologic - Capidava 2014
 - Raport antropologic – Cristian 2014
 - Raport antropologic - Mălăiești 2014
 - Raport antropologic - Micești 2014
 - Raport antropologic - Toboliu 2014
 - Raport antropologic - Turdaș 2014
5. Lista publicațiilor și participărilor la conferințe științifice în anul 2014

REZUMAT

În etapa II a proiectului PCCA-1153b contract 229/2013 (perioada 1 ianuarie - 31 decembrie 2014) au continuat cercetările demarate în anul 2013.

Grupurile de antropologie fizică (P1 și P2) continuă analiza loturilor recepționate în anul 2013 și a celor recepționate în anul 2014. Analizele antropometrice constituie analize preliminare care evidențiază cazurile speciale ce vor primi prioritate în ceea ce privește analizele moleculare. În Anexele II ale acestui raport științific sunt date ca exemplu cele mai relevante necropole studiate din punct de vedere al antropologiei fizice în cadrul etapei II a proiectului și pentru care a fost redactat un raport pentru echipa de arheologi.

Cele mai relevante rezultate moleculare obținute în cadrul acestei etape au fost evidențiate în cadrul studiilor I-VII ce formează Anexa I. Dintre acestea, amintim: 1. optimizarea unei metode de atribuire mai sigură a vârstei la momentul decesului folosind tehnica FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), confirmarea prin analize genetice a unui diagnostic de tuberculoză (studiu pentru care la finalul etapei I nu existau decât rezultate preliminare), identificarea primelor haplogrupuri mitocondriale de Epoca Bronzului și medievale din diverse necropole de pe teritoriul României (Capidava, Mireasa - Constanța; M10 din Curtea de Argeș; copilul nou-născut din Mălăiești). Majoritatea haplogrupurilor mitocondriale caracterizate pentru populațiile istorice până în acest moment sunt forme genetice rare, sau relativ rare în populația modernă ceea ce ridică noi întrebări despre contribuția acestora la alcătuirea structurii genetice a populației moderne.

Tot în această etapă a continuat efortul de datare radiometrică și de analizare a izotopilor stabili de C și N, cu rezultate în curs de interpretare.

În cadrul proiectului, începând cu finalul acestei etape au fost demarate patru doctorate (3 biologie, 1 arheologie) cu subiecte din aria tematică vizată de proiect.

SINTEZA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN PERIOADA IANUARIE – DECEMBRIE 2014

Obiectivele etapei II sunt:

1. Documentare și schimburi științifice
(vezi lista de participări la conferințe și deplasările de documentare)
2. Investigații paleo-osteologice
(vezi Anexele II)
3. ADN vechi – secvențializare și genotipare
(vezi Studiile I-VII)
4. Analize izotopi stabili ai carbonului (C) și azotului (N), pentru caracterizarea dietei
(2014 - datări radiometrice și analiza izotopilor stabili de C și N în cadrul studiilor II, III, VII)
5. Analize complementare (SEM, spectroscopie etc.)
(vezi studiile I, II, V)
6. Săpături arheologice și procesarea inventarului material
(vezi deplasările pe șantier arheologic)
7. Studii de arhivă
(studiul VI)

Obligațiile asumate de partenerii proiectului prin semnarea Actului Adicional nr. 2 din 2014 pentru această etapă sunt:

1. Depunerea raportului anual aferent etapei II
2. Depunerea raportului științific aferent etapei II
3. Depunerea raportului financiar aferent etapei II
4. Participarea la conferințe științifice

√
√
√
28

În plus față de indicii asumați au fost publicate 8 articole în reviste indexate în baze de date internaționale, acceptat spre publicare 1 articol în reviste indexate în baze de date internaționale, publicat 1 articol în revistă în curs de indexare în bazele de date (primul număr în anul 2014) și publicat 1 articol (proceedings) în volumul unei conferințe internaționale (Arheovest, decembrie 2014, Timișoara).

A fost organizat, la Cluj-Napoca, în data de 7-8 noiembrie 2014, Workshopul „Abordarea bioculturală și științele biomedicale” care a oferit studenților arheologi și biologi oportunitatea de a observa procedurile practice aplicate în laboratoare de antropologie fizică și moleculară, de a demara un schimb de idei între oameni formați în discipline umaniste și reale și a identifica posibilități de colaborare.

Începând cu lunile octombrie 2014, respectiv noiembrie 2014 au demarat 4 doctorate (3 biologie, 1 arheologie) cu subiecte din aria acoperită de proiect.

Studiul I.

Utilitatea spectroscopiei FT-IR în determinarea randamentului extracției de ADN din oase arheologice

Populația analizată în acest studiu aparține unei necropole de lângă satul Mireasa din comuna Siliștea, județul Constanța și aparține Epocii Bronzului, defuncții fiind îngropate în poziție fetală (chircit), pe o parte (Figura 1). Pentru a afla vârsta exactă a acestora, unul dintre indivizi a fost testat prin radiometrie.

Datarea cu ^{14}C arată că proba testată aparține unui individ care a murit între anii 2580 și 2490 î.e.n., perioadă care coincide cu epoca timpurie a bronzului pe teritoriul României.



În acest studiu, notarea indivizilor este următoarea:

- | | |
|---------|-----------|
| M2 – A | M7 – G |
| M3 – B | M11a – H |
| M4 – C | M11b – J |
| M5a – D | M115A – K |
| M5b – E | M160 – L |
| M6 – F | |

Fig.1. Fotografiiile celor 11 morminte din necropola Mireasa care au fost atribuite Epocii Bronzului. Toate scheletele sunt aezate în pozi ie chircit .

Dup analiza markerilor de sex i vârst (creast nugal , proces mastoid, margine supraorbital , glabel , i eminena mental , precum i a markerilor de pe oasele coxale, dar i lungimea unor oase lungi) observabili la scheletele indivizilor necropolei Mireasa, Epoca Bronzului, a fost fcut o aproximare a vârstei acestora la momentul mor ii, precum i o atribuire cât mai exact a sexului (Tabel 1). Astfel, majoritatea r m i elor apar în unor b rba i, excep ie f când (M5a – D), de sex feminine. Indivizii studia i au vârste variate, de la nou-n scut, copii, tineri i adul i. În cazul M5b (E), unde e vorba de osemintele unui infans, nu au putut fi caracteriza i markerii aminti i mai sus din cauza slabei reprezent ri i conserv ri a oaselor (Tabel 1).

Tab.1. Valorile aproximative ale vârstei indivizilor din necropola Mireasa, *sexul* lor, valoarea medie a *st rii de reprezentare* (scorul 3 însemnând c peste 75% din os este disponibil, 2 – aproximativ 50%, 1 – sub 25% i scorul 0 – pentru oasele lips) i *procentul* de oase disponibile calculat pe baza *st rii de reprezentare*.

Num r mormânt	Cod individ	Sex	Vârst	Stare de reprezentare (medie)	Procentul de oase salvate din individ
M2	A	M	20-23 ani	1.296875	32%
M3	B	M	26-70 ani	0.65625	16%
M4	C	M	15-25 ani	2.265625	57%
M5a	D	F	11-15 ani	0.953125	24%
M5b	E	?	bebelu	?	?
M6	F	M	17-19 ani	0.28125	7%
M7	G	M	33-42 ani	1.15625	29%
M11A	H	M	21-53 ani	1.65625	41%
M11B	J	M	7-12 ani	0.546875	14%
M115A	K	M	20+ ani	1.328125	33%
M160	L	M	26-39 ani	2.4375	61%

Dup cum se observ din tabelul 1, valoarea medie a *st rii de reprezentare* a scheletelor este în mare parte sub 50%, ceea ce reduce mult acurate ea determin rii vârstei i sexului, multe dintre por iunile cu rol de marker de diagnostic lipsind. Pentru o confirmare absolut a sexului se pot face analize moleculare, îns vârsta mor ii este deocamdat o informa ie ce nu poate fi verificat i confirmat prin metode de biologie molecular . Analizele spectroscopice, îns , manifest un poten ial puternic în cre terea acurate iei determin rii vârstei.

Spectroscopia FTIR i rolul ei în analiza oaselor arheologice

Indicii FTIR folosi i pentru evaluarea diagenzei osoase IRSF

Istoric, primul indice FTIR folosit pentru evaluarea cristalinit ii hidroxiapatitei a fost ‘func ia de despicare’ (splitting function), un raport arie/arie caracteristic despicii degenerative a peak-ului de la 600 cm^{-1} propriu îndoirii antisimetrice a fosfatului odat cu sporirea ordinii atomilor (Termine i Posner, 1966). Uneori numit ‘index de cristalinitate’ – CI, alteori ‘factor de despicare în infraro u’ – IRSF (Infrared splitting factor), raportul dintre suma absorban elor valorilor celor dou peak-uri ale despicii i valoarea corespunz toare v ii dintre ele $(A_{595}+A_{605})/A_{588}$ codific informa ii referitoare la gradul de diagenz al unui os. Cu cât faza

organic a osului este degradat chimic sau microbiologic, re eua mineral din jurul ei sufer i ea disolu ii, mai ales ale cristalitelor mai mici i mai instabile din punct de vedere termodinamic, care se vor recrystaliza pe suprafata a cristalelor deja existente, mai mari i mai stabile, conform condi iilor fizico-chimice discutate mai sus. Nielsen-Marsh i Hedges (2000) afirmau c cele dou procese, disolu ia i recrystalizarea pot participa împreun la cre terea valorii IRSF. Astfel, cristalinitatea cre te, i chiar dac la nivel macroscopic nu se observ diferen e, reorganizarea microscopic poate fi urm rit cu ajutorul acestui parametru (Rogers i colab., 2010). O corelare direct între IRSF i m rimea medie a cristalitelor a fost ar tat de Truman i colab. (2004), împreun cu o modificare în forma cristalitelor odat cu maturarea, de la o form planar înspre una acicular : 163 x 28 x 5 nm (Berna i colab., 2004).

Mai multe colective au calculat IRSF pentru os modern în compara ie cu oasele arheologice pe care le studiau la acel moment, ar tând o cre tere clar a valorii indicelui odat cu degradarea osului: 2.7 – peste 3 (Müller i colab., 2011); sub 2.8 – între 2.7 i 3.4 (Trueman i colab., 2004); 3.4 – între 3.5 i 3.8 pentru un loc de înmormântare i între 3.1 i 4.6 pentru un altul (Lebon i colab., 2010); 2.6 – 3 (Nielsen-Marsh i Hedges, 2000) i Berna i colab., (2004) au eviden iat o gam i mai larg de valori: între 2.6 i 3 pentru oase *in vivo*, pân la 3.4 pentru oase pu in afectate la suprafata solului, pân la 4.1 pentru oase fosile i un IRSF de 7 a fost determinat pentru fosile puternic alterate (Figura 2). Pentru compara ie, IRSF pentru hidroxiapatita sintetic este 5.4. O explica ie pentru care cristalinitatea într-un os poate fi mai mare decât într-o hidroxiapatit standard va fi dat imediat.

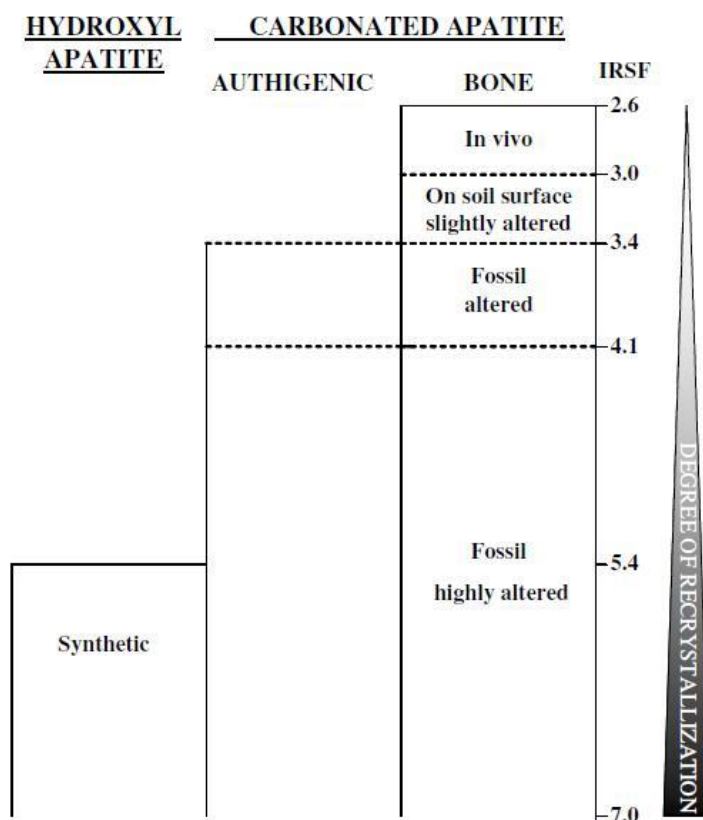


Fig.2. Valori ale IRSF i gradul de recrystalizare pentru diferite tipuri de apatite. Apatita carbonatata exogen este mineralul ce se formeaz cel mai des prin reac ia între fosfatul eliberat din degradarea materiei organice i carbonatul de calciu prezent în sedimente. (din Berna i colab., 2004)

Când structura chimic original a apatitei geologice este alterat , întregul complex va fi mai destins (mai lax), mai solubil i deci mai pu in cristalin, asemenea alter ri se întâmpl când CO₃ înlocuie te par ial PO₄ sau OH, sau când Ca este substituit de al i atomi, ca Na sau Mg.

Figura 3 arat spectre ale unor tipuri distincte de diagenez , graficul negru corespunzând unui os depozitat în mediu carbonatat (vezi peak-ul masiv al carbonatului, de la 1415 cm^{-1}): se observă slaba despicare a peak-ului la $595 - 605\text{ cm}^{-1}$, sus înând explica ia de mai sus. Situa ia opus pentru hidroxiapatit este atunci când OH este înlocuit de un atom de fluor. Floroapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2]$ este chiar mai strâns împachetat f r gruparea hidroxil, conferind mineralului insolubilitate i rezisten la pH mic, cu un IRSF de pân la 7. În os, hidroxiapatita carbonatat leag fluorul, devenind francolit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4\text{CO}_3)_6(\text{F})_2]$, un mineral cu un peak specific de absorbie în infraro u, la 1096 cm^{-1} , u or de recunoscut pe spectru prin ‘um rul de francolit ’ de lâng peak-ul principal al fosfatului. Graficul ro u din Figura 3 este un exemplu de spectru al unui os care a absorbit fluor, având distinctivul um r de francolit i un IRSF mai mare, dup cum despicarea de la 600 cm^{-1} sugereaz .

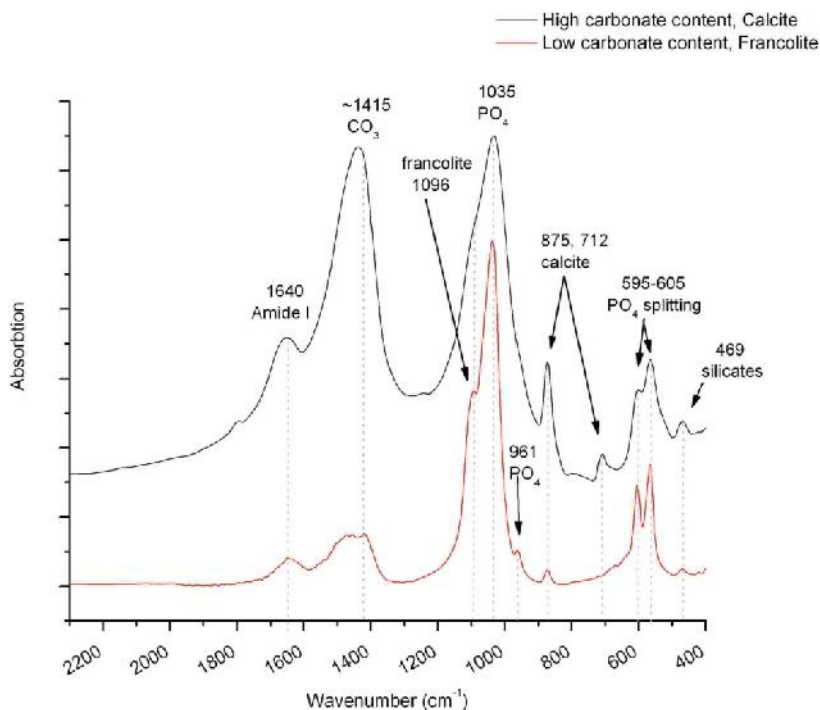


Fig.3. Exemple de spectre de absorbie FTIR ale unor oase cu tipuri de diagenez diferite (discu ie în text) (imagine proprie)

Într-un sit arheologic s-a observat c oasele indivizilor înmormânta i în zona cu sol mai umed a sitului prezentau semne de francolit (King *i colab.*, 2011), ceea ce se explic prin afinitatea mare a fluorului pentru ap (Greenwood i Earnshaw, 1998). Fosilele foarte vechi, ca cele de dinozauri, au IRSF de aproape 7 i un con inut crescut de fluor, altfel nu ar fi putut supravie ui în timp (Berna *i colab.*, 2004).

Totu i, nici un IRSF mic i nici un timp de depozitie scurt nu se pot corela cu o conservare bun a organicului, c ci to i ceilal i factori descri i mai sus dep esc contribu ia vârstei cronologice (Weiner i Bar-Yosef, 1990). Hagelberg *i colab.* (1991) ofer un exemplu în acest sens: o groap comun din perioada R zboiului Civil nu a avut randament la ob inerea de ADN pentru analize genetice, îns un cimitir saxon mai vechi decât precedentul a dus la rezultate ADN interpretabile. Nici Salamon *i colab.* (2005) nu au reu it s g seasc o corelare între randamentul amplificarii ADN i vârsta probei, îns Allentoft *i colab.* (2012) subliniaz c dac toate celelalte variabile ar fi constante, conservarea ar fi o func ie de timp, a a cum ne a tept m, conform datelor de chimie fizic pur .

C/P

‘Coninutul de carbonat’, msoar raportul absorbiei peak-urilor CO_3/PO_4 de la 1415 i 1035 cm^{-1} respectiv. Wright i Schwartz (1996) au stabilit o bun corelare între raportul C/P i procentul de mas (wt%) al CO_3^{2-} m surat prin eliminarea de CO_2 la disolu ie acid .

C/P este un parametru disputat, mai ales în domeniul etichet rii izotopice, orice carbonat exogen din esutul osos examinat ducând la rezultate gre ite legate de vârsta geologic , migra ii, diet , clim (King i colab., 2011).

În ceea ce prive te diagenaza, raportul C/P arat doar raportul cantitativ între anioni. El poate cre te în timp, dac concentra ia carbonatului în mediu este mare, astfel înclinând balan a echilibrului termodinamic împotriva tendin ei naturale a hidroxiapatitei de a elimina carbonatul. Asemenea cazuri vor prezenta pe spectru un peak specific calcitului la 712 cm^{-1} (Figura 5), dac calcitul reprezint minim 3% din mineralul osului (3% fiind limita de detec ie) (Nielsen-Marsh i Hedges, 2000; Müller i colab., 2011). O valoare C/P mic indic pierderea CO_3 prin disolu ie i/sau absorbiea de PO_4 în structura cristalin ; deci o valoare medie, de os modern, a indicelui C/P într-un os antic indic înspre ambele procese: (a) o depunere de calcit (CaCO_3) în i pe os i adsorb ie pe suprafa a cristalelor de apatit , i (b) o cre tere local a perfec iunii cristalitelor prin fixarea PO_4 (Nielsen-Marsh i Hedges, 2000).

Lebon i colab. (2010) au argumentat problema valorii fluctuante a raportului C/P pentru probe arheologice prin existen a mai multor procese ce contribuie la valoarea lui final , indicele variind între 0.15 i 0.35, pe când probele moderne au o devia ie standard mult mai mic , cu o valoare medie a C/P de 0.28.

Indicele C/P ridic ni te probleme din cauza vibra iilor organice C-H c rora li se suprapune frecven a de absorbie cu cea a grup rii CO_3 , ducând la o supraestimare a carbonatului odat cu coninutul de matrice organic (Truman i colab., 2004). În Figura 5, spectrul probei carbonatate are i un peak înalt la Amida I (Amida I este leg tura $\text{C}=\text{O}$ din lan ul polipeptidic), sprijinind aceast observa ie.

CC

‘Coninutul de colagen’ – CC este indicele ce msoar conservarea proteic a matricei osoase, calculat ca raportul valorilor de absorbie ale amidei I i fosfatului (A_{1640}/A_{1035}). Valori de 0.2 corespund la 15 wt% material organic în os, i un CC de 0.8 – la 30 wt% (Truman i colab., 2004). Cu cât semn tura proteic este mai puternic , cu atât frac iunea organic a supravie uit mai bine trecerii timpului într-un anumit os.

Nielsen-Marsh i Hedges (2000) au ar tat o corelare între CC i IRSF explicat prin strânsa leg tur dintre matricea mineral i cea organic , pierderea materialului organic ducând la disolu ia mineralului, corelare neobinut i de Lebon i colab. (2010), probabil din cauz c lotul investigat de ace tia avea i al i factori care au influen at valorile indicilor, ca prezen a florului.

Deplasarea peak-ului PO_4

Un alt indice, propus de Lebon i colab. (2010), este deplasarea unei benzi de absorbie a fosfatului de la 960 cm^{-1} înspre 963 cm^{-1} , deplasare corelat liniar cu pierderea carbonatului i cre terea perfec iunii re elei cristaline, odat cu excluderea ionilor str ini. Acest indice pare s fie mai sensibil la pierderea carbonatului i modific ri ale tensiunii în re eaua mineral decât IRSF, care se refer mai ales la m rimea cristalelor. Unele probe au avut acest peak deplasat i peste 963 cm^{-1} , dar numai acompaniat de un coninut crescut de flor, care confer floroapatitei mai mult ordine atomic decât are hidroxiapatita.

Apatitele dopate cu ioni ca Ba^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} au acest peak deplasat sub 960 cm^{-1} , ar tând c acest indice ar putea fi folosit pentru detectarea substituiilor ionice în re eaua mineral de-a lungul diagenzei (Thomas i colab., 2007).

Concluzii

Procesul de diagenez afectează ambele componente ale esutului osos, fracțiunea mineral trecând prin dizoluție și recristalizări succesive, în timp ce partea organică suferă degradare chimică și digestie microbiană. Procesele de diagenez ale celor două componente osoase sunt interdependente, ele “protejându-se” una pe cealaltă.

ADN nu poate fi observat *a priori* în oasele antice, deci estimarea lui se face pe baza altor componente, mai accesibile (mineral și proteic).

Din spectrele FTIR se pot obține date privind mărimea cristalitelor din os [(565+605)/588], raportul carbonat/fosfat (1415/1035), conținutul de collagen (1640/1035), dar și alte informații, ca prezența fluorapatitei sau a calcitului.

Prin interpretarea informațiilor oferite de spectroscopia FTIR privind diferite oase, molecularistul poate alege osul cel mai potrivit pentru a extrage ADN și a avea un randament cât mai bun în procesele ulterioare (PCR, Q-PCR, secvențiere).

Corelarea indicilor FTIR cu concentrația de ADN extras

Pentru fiecare probă de extracție de ADN din fiecare individ au fost calculați indicii IRSF, C/P, CC. Datele indică o corelare clară între valoarea concentrației de ADN extras (citit prin spectrometrie UV) și cei 3 indici. Raportul C/P și conținutul de collagen CC sunt direct proporționale cu cantitatea de ADN extras, iar indicele IRSF este în relație inversă (Figura 4.F – individul M6-F). Corelarea nu este la fel de evidentă la toți indivizii, dar proporționalitatea inversă a IRSF rămâne valabilă în mai multe cazuri (Figura 4.B – individul M3-B). De precizat este faptul că gradul de corelare între date se menține doar când se analizează câte un individ pe rând, astfel că la combinarea datelor între indivizii B și F graficul nu mai are aceeași simetrie (Figura 5). IRSF își menține invers proporționalitatea față de C/P și CC, însă relația acestora cu concentrația de ADN extras din probe nu se potrivește la compararea inter-individuală, fapt ce se explică prin condițiile diferite în care au fost depozitate oasele. Chiar dacă toți indivizii studiați aici provin din aceeași necropolă și condițiile climatice de-a lungul secolelor au fost aceleași pentru toate scheletele, este posibil ca proprietățile solului și hidrologia locală să fie diferite chiar și la distanțe de câțiva metri.

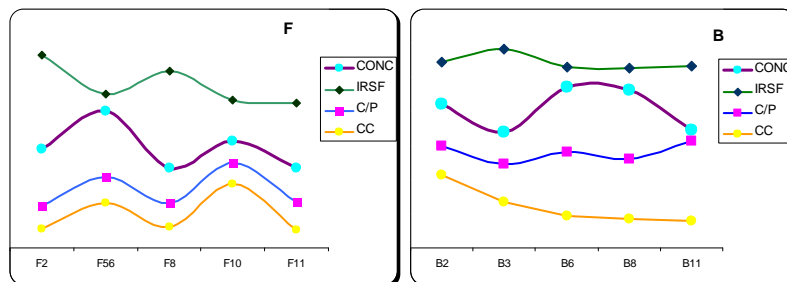


Fig.4. Corelarea direct proporțională a indicilor C/P și CC și invers proporțională a IRSF cu concentrația de ADN extras. F = individul M6, B = individul M3. Pe axa absciselor sunt probe din oase diferite. Indicii nu sunt reprezentați în valori absolute.

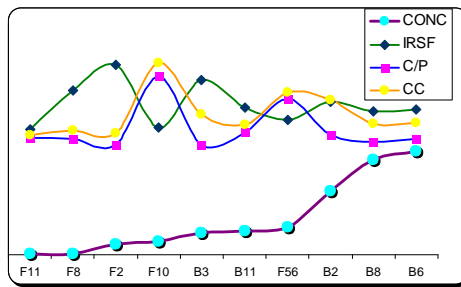


Fig.5. Corelarea indicilor cu concentra ia de ADN dispune atunci când se compar indivizi diferi i. Indicii FTIR i i p streaz rela ia de simetrie, dar valorile concentra iei de ADN nu coincid cu modelul individual. F = individul M6, B = individul M3. Pe axa absciselor sunt probe din oase diferite. Indicii nu sunt reprezenta i în valori absolute.

Corelarea indicilor FTIR cu vârsta

Metoda pantei graficului CC-ADN

Ipoieza de la care s-a pornit în studiul de fa este c supravie uirea ADN în oase este propor ional cu cea a colagenului. Deci indicele CC ar trebui s fie decisiv în luarea deciziei de a aprofunda studiul unui anumit os prin extrac ia de ADN. Figura 6 aduce împreun toate valorile indicelui CC i concentra iile de ADN extras. Liniile punctate sunt trendline-uri pentru câte un individ i respect codul de culori de la legend . La cele mai multe probe, trendline-ul arat o propor ionalitate direct între valoarea CC i concentra ia ADN, dar exist i indivizi pentru care dreapta este înclinat invers sau este orizontal . Oricum, i la indivizii cu propor ionalitate direct se observ diferite grade de corelare, liniile din grafic fiind înclinate la unghiuri foarte variate. A adar, valoarea CC nu pare s prezic nicicum concentra ia de ADN din probe.

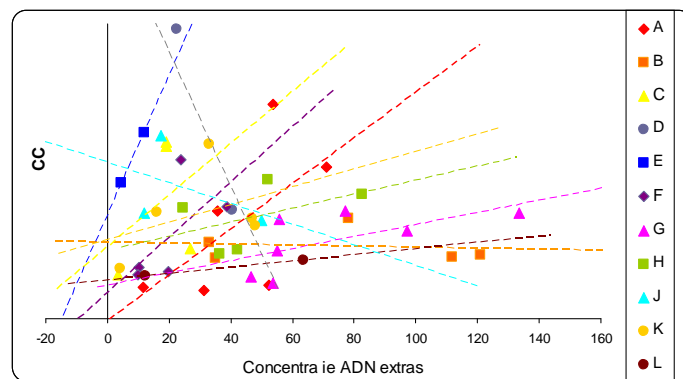


Fig.6. Slaba corelare dintre valoarea CC i concentra ia de ADN ob inut pentru toate probele studiate. Fiecare individ este reprezentat cu un alt simbol, iar axele de trend corespund codului de culori. Se observ o varia ie a unghiului dintre trendline i axa ox.

S-a observat o leg tur între înclinarea axei dintre CC i concentra iile de ADN extras per individ i vârsta acestuia. Ecua iile axelor de trend sunt notate în tabelul 2, ordonate cresc tor dup panta lor. Astfel, axele cele mai ‘orizontale’ sunt ale datelor de la indivizii M3-B i M160-L, de 26-70, respectiv 26-39 ani. La individul L, îns , graficul a fost trasat din doar dou puncte, deci e probabil ca unghiul trendline-ului s fie mai mare în realitate. A adar vârsta lui de maxim 39 de ani nu ar mai contrazice teoria propus aici. În ordinea cresc toare a unghiurilor trendline-urilor urmeaz indivizii M7-G i M11a-H care au vârstele cuprinse între 33-42 respectiv 21-53 ani. Urm toarele drepte sunt ale indivizilor M115A-K i M2-A, aproxima i ca având 20+ i 20-23 de ani. Urcând înspre vertical, urmeaz dreptele indivizilor M4-C i M6-F, de 15-25 respectiv 17-19 ani. Dreapta cu cea mai mare pant din această serie de drepte este cea a individului M5b-E, infans. Exist i dou axe puternic deviate, unde rela ia dintre CC i concentra ia de ADN este invers , dar acestea apar în tot unor copii i unghiul de înclina ie e în continuare dependent de

vârsta lor: M5a-D având vârsta de 11-15 ani și M11b-J de 7-12 ani. A adar, fie individual infans, fie cei doi copii prezint erori de la modelul urmat în acest grafic. Oricum, este important de subliniat această legătură în cazul fiecărui individ, între unghiul de înclinație al axei dintre valorile CC și concentrația, legătura care poate reda informații privind vârsta individului.

Tab.2. Ecuațiile dreptelor de trendline ale funcțiilor dintre valoarea CC și concentrația ADN pentru fiecare individ studiat, și vârsta atribuită indivizilor prin metode antropologice și antropometrice. Datele sunt ordonate crescător după valoarea pantei dreptei.

Individ	Ecuația dreptei	Vârsta
B	$y = -0.0075x + 10.43$	26-70
L	$y = 0.0427x + 5.2831$	26-39
G	$y = 0.0819x + 4.5159$	33-42
H	$y = 0.0944x + 9.2929$	21-53
K	$y = 0.1191x + 10.716$	20+
A	$y = 0.3105x - 0.4069$	20-23
C	$y = 0.3502x + 9.7025$	15-25
F	$y = 0.3749x + 3.514$	17-19
E	$y = 0.9444x + 14.056$	bebe
D	$y = -0.9112x + 54.206$	11-15
J	$y = -0.1399x + 21.16$	7-12

La indivizii tineri conținutul de colagen este mult mai mare raportat la cantitatea de ADN, în comparație cu cazurile de oseminte adulte, unde valoarea CC crește mai lent cu creșterea concentrației de ADN. Probabil explicația constă în strânsa relație dintre fracțiunile minerală și organică ale osului. Cu cât un individ este mai avansat în vârstă, oasele îi sunt mai mineralizate, iar la momentul morții acest element pare să aibă un efect de protejare a ADN. La indivizii foarte tineri, conținutul de colagen raportat la cel de hidroxiapatit este mai mare, de unde și valori superioare ale indicelui CC, dar cantitatea de ADN ce supraviețuiește trecerii timpului este redusă, posibil din cauza lipsei protecției minerale.

Dintr-o reprezentare grafică a intervalelor de vârstă determinate prin standarde antropologice și a valorii pantei axelor obținute din graficul CC-concentrație ADN, se obține figura 11. Cu negru sunt reprezentate intervalele de vârstă conform analizei antropologice, cu maximum la 70 de ani, iar cu albastru sunt valorile pantelor axei de trend pentru fiecare individ, ordonate descrescător. Între indivizii K-B, valorile pantelor scad aproximativ liniar, așa că s-a considerat că diferența de vârstă între ei este una cu variații mici. La fel este cazul și între indivizii F-C-A, însă diferența de vârstă dintre individul F (17-19 ani) și infans E este bruscă. Pentru a completa acest grafic până la o liniaritate pe tot intervalul este necesară investigarea unui număr mai mare de indivizi tineri. Există posibilitatea ca în zona de sub 18 ani relația vârstă-panta să nu mai fie liniară, ci exponențială, însă asta nu se poate clarifica deocamdată. Poate din acest motiv indivizii J și D (7 – 12, respectiv 11 – 15 ani) prezintă deviații atât de puternice de la grafic. Considerând, a adar, o relație de liniaritate, s-au trasat (cu albastru) drepte paralele cu dreapta de variație a pantei, drepte care îndeplinesc condiția de a trece prin toate intervalele de vârstă determinate clasic. Pe baza acestui grafic s-au dedus vârstele cele mai probabile ale indivizilor dintre 17 și 90 de ani. Valorile deduse se regăsesc în tabelul din figura 7.

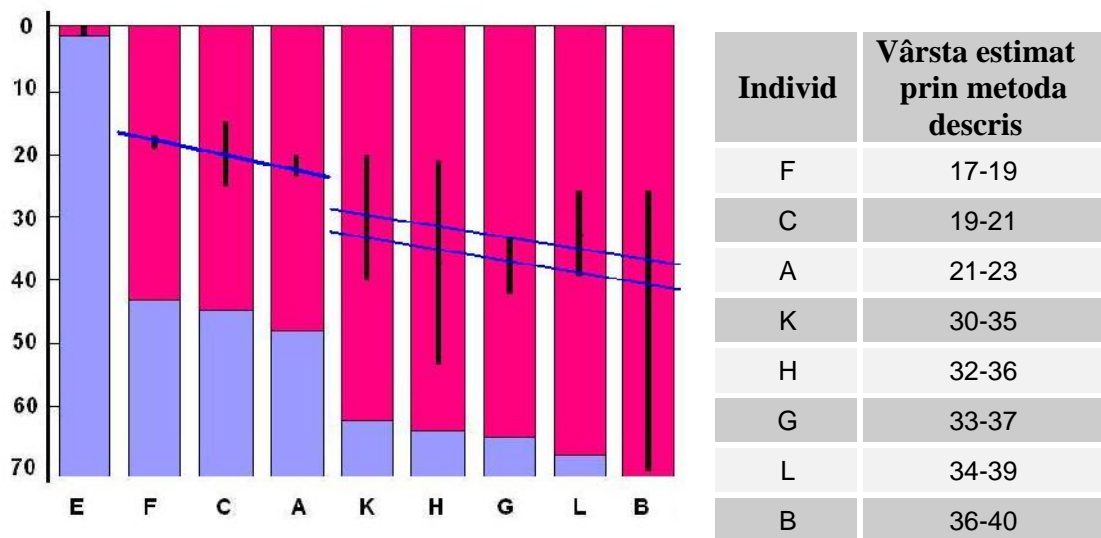


Fig.7. A. Metoda de deduc ie a vârstei indivizilor pe baza pantei func iei CC-concentra ie ADN. Cu negru sunt reprezentate intervalele de vârst deduse prin metode antropologice. Cu albastru sunt valorile pantelor func iilor corespunz toare fiec rui individ. Prin trasarea unor drepte paralele cu valorile pantelor astfel încât acestea s se intersecteze la fiecare individ cu intervalul dedus anterior, se pot ob ine intervale mult mai restrânse ale vârstei indivizilor –B.

Excep ii ale valorilor indicilor FTIR la oasele de copii

În c utarea corel rii dintre indicii FTIR i concentra ia de ADN extras din diferite tipuri de oase, în cazul coastelor i a oaselor craniului s-a observat o anomalie. Figura 8 arat indicii C/P i CC în rela ie cu concentra ia de ADN din coastele diferi ilor indivizi. Punctul unde apare o cre tere a valorilor indicilor corespunde osemintelor unui individ nou n scut.

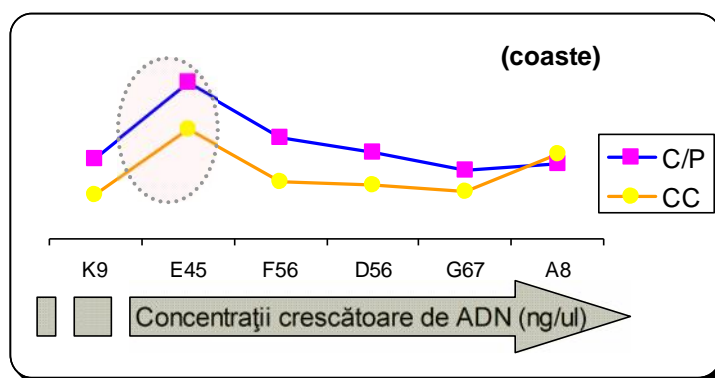


Fig.8. Indicii C/P i CC în rela ie cu concentra ia de ADN extras din coastele diferi ilor indivizi. Individul E, la care apare o abera ie în grafic, este un nou n scut.

Figura 9 con ine valorile indicilor FTIR pentru probe preluate din oasele craniului ale indivizilor investiga i. Se poate observa cre terea valorilor C/P i CC i sc derea lui IRSF fa de restul probelor în dou cazuri. Individul E (M5b) este acela i nou n scut eviden iat în graficul anterior, iar individul D (M5a) este un copil de 11-15 ani. Restul indivizilor reprezenta i în aceste dou grafice au vârste mai mari (Tabel 3).

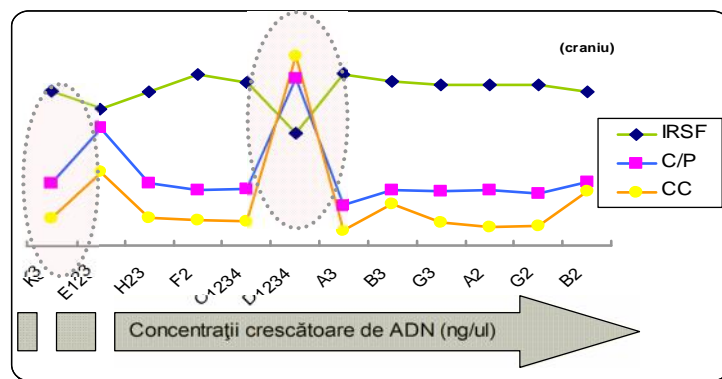


Fig.9. Indicii FTIR în relație cu concentrația de ADN extras din oasele craniilor. Probele aparținând indivizilor D (M5a) și E (M5b) prezintă abateri față de trendline.

Tab.3. Vârstele indivizilor reprezentați în figurile 12 și 13. Cu roșu sunt încadrate probele care prezintă anomalii de la grafic. Cu verde este evidențiată proba care în oasele craniului prezintă diferențe de la linia generală dar în coastă nu.

Proba	Concentrația ADN (ng/ul)	Vârsta individului	Proba	Concentrația ADN (ng/ul)	Vârsta individului
K9	4.8	20+	K3	0.4	20+
E45	11.8	nou născut	E123	1.6	nou născut
F56	38.6	17--19	H23	2	21--53
D56	40.3	11--15	F2	2.6	17--19
G67	55.7	33--42	C1234	3.7	15--25
A8	71.1	20--23	D1234	5.1	11--15
			A3	31.2	20--23
			B3	33	26--70
			G3	46.7	33--42
			A2	52.4	20--23
			G2	53.8	33--42
			B2	78.2	26--70

Oasele craniului au prezentat o creștere a valorilor C/P și CC la indivizi sub 15 ani, efect observat la oasele costale doar la indivizi sub 11 ani. Prin diferența de osificare între anumite oase ale corpului și prin compararea cu date de osteologie juvenilă se poate determina vârsta unui individ la momentul morții. Rezultatele acumulate aici sunt insuficiente pentru formarea unui etalon complet, dar indică spre o metodă alternativă de determinare a vârstei la oasele arheologice, acolo unde rămășițele umane sunt incomplete, lipsind markeri esențiali ai determinării vârstei. Desigur, pentru o analiză comprehensivă, sunt necesare mult mai multe probe decât am avut noi la dispoziție și indivizii aflați în etape ale vieții mai apropiate între ele, pentru a forma o linie continuă. Probele ar trebui alese astfel încât să se urmărească toate oasele corpului, mai puțin părțile de articulații care deja sunt folosite în analiza antropologică la determinarea vârstei, unde analiza ar fi redundantă.

S-au mai făcut încercări de corelare a vârstei cu proprietățile ale spectrelor FTIR a oaselor și s-a arătat că odată cu înaintarea în vârstă are loc o intensificare a mineralizării în esuturile osoase animale (Alvarez-Lloret *et al.*, 2006).

Valorile indicilor FTIR și concentrația de ADN, în funcție de tipul de os

Pentru a diferenția oasele cu cea mai mare cantitate de izolare a ADN, s-au calculat valorile medii ale indicilor FTIR și ale concentrațiilor de produs extras (Tabel 4). Cea mai mare cantitate de material genetic a fost extrasă din probele de os spongios din corpurile vertebrale (50-60 ng/μl), urmat de coaste (~45-50 ng/μl) și de osul spongios al oaselor scurte și al epifizelor

testate (~40-46 ng/μl). Urmează osul compact al diafizelor, cu valori ale concentrației de aproximativ 30-34 ng/μl și osul craniului, cu ~28-33 ng/μl. Valoarea mai mică a mediilor s-a calculat folosind toate datele disponibile, iar cea mai mare (“*Media’*”) s-a obținut eliminând valorile extreme ale unui individ, unde probabil diferența a rezultat dintr-o eroare de manipulare în etapa de extracție.

Indicele CC se referă la conținutul de material organic dintr-un os. Valorile minime (~0.11) s-au găsit la oasele închise (diafize și craniu) acolo unde și cantitățile de ADN extras au fost cele mai mici, iar oasele spongioase și coastele au valori mai mari ale CC (0.15-0.18). Explicația ar fi faptul că în oasele spongioase există contaminare cu material organic microbial. În ciuda măsurilor luate pentru a distruge urmele de ADN exogen, este foarte probabil că în spațiile din interiorul esutului spongios curățarea nu a fost destul de eficientă. Probele din oasele compacte ale diafizelor și din osul craniului au fost preluate din adâncime, deoarece grosimea esutului a permis, astfel reducând substanțial șansa ca acolo să se fi dezvoltat bacterii.

Raportul C/P se distribuie, de asemenea, în aceleași două direcții: valorile mici (0.17) corespund oaselor cu CC și concentrație de ADN mai mici, iar cele mari (0.21-0.25) celelalte categorii. Valoarea mare a carbonatului oaselor spongioase se poate datora carbonatului din sol, care, dizolvat în apă, a putut ptrunde mai ușor în spațiile din esutul spongios decât în oasele compacte, recristalizând pe suprafața apatitei.

Indicele IRSF are valori de 3.3-3.6 pentru oasele compacte și 3.1-3.2 pentru oasele spongioase, ceea ce înseamnă că mărimea cristalitelor de hidroxiapatit din oasele compacte este superioară celei din oasele spongioase, unde, conform deducției de mai sus, o mare cantitate de carbonat s-a încorporat în rețeaua minerală. Carbonatul, având structura diferită de a fosfatului, reduce cristalinitatea prin dezordonarea structurii, nepermițând cristalului să crească natural, deci ptrund o valoare mai mică a indicelui IRSF.

Valorile medii ale indicilor FTIR se potrivesc cu modelul descris în subcapitolul *Corelarea indicilor FTIR cu concentrația de ADN extras*, concentrația mai mare de ADN corespunzând probelor cu CC și C/P mai mari și IRSF mai mic, și invers. Adică, cele mai potrivite oase pentru extracția de ADN sunt cele compacte, groase și nedeschise, astfel, se reduce contaminarea cu bacterii și cu alte substanțe chimice inhibitoare din sol. Din aceste considerente, în continuare se vor aprofunda și compara caracteristicile tipurilor de os cranian și a unor diafize.

Tab.4. Valori medii ale concentrațiilor de ADN extras și ale indicilor FTIR pe grupe de oase.

	Conc ADN (ng/ul)		CC	C/P	IRSF
	Media	Media’	Media	Media	Media
Vertebre - S	50.707	59.063	0.158	0.214	3.243
Coaste	44.812	50.528	0.184	0.231	3.199
Spongios	40.4	46.114	0.187	0.254	3.109
Diafize - C	29.469	34.363	0.114	0.177	3.37
Cranii	28.223	33.171	0.115	0.176	3.623

Oasele craniului

În cadrul osului craniului se disting straturile de os spongios și compact. S-au comparat valorile indicilor FTIR și concentrația de ADN extras pentru cele două tipuri de esut cranian la câțiva indivizi, unde starea de reprezentare a permis acest lucru. La oasele indivizilor foarte tineri, osul craniului este prea subțire pentru a putea prelua cele două tipuri de probe într-un mod

precis. Concentrația de ADN obținută din probele de os cranian compact și spongios se corelează pozitiv cu valorile C/P și CC și negativ cu valoarea indicelui IRSF, corespunzând observațiilor făcute mai sus (Figura 10). În grafic, datele sunt reprezentate relativ și nu ca valori absolute, pentru a arăta relația între probele aparținând aceluiași individ. Datele exacte sunt prezentate în tabelul 5. Rândurile gri deschis reprezintă oase compacte, iar cele gri închis sunt oase spongioase. Valorile foarte mici ale concentrației ADN de la individul K le-am atribuit unei greșeli de manipulare în etapa de extracție, de aceea le-am eliminat de la calcularea valorilor medii (mai sus), dar am considerat că pierderea a fost proporțională la toate probele, deci în discuția comparării datelor intra-individual, rezultatele se pot lua în considerare.

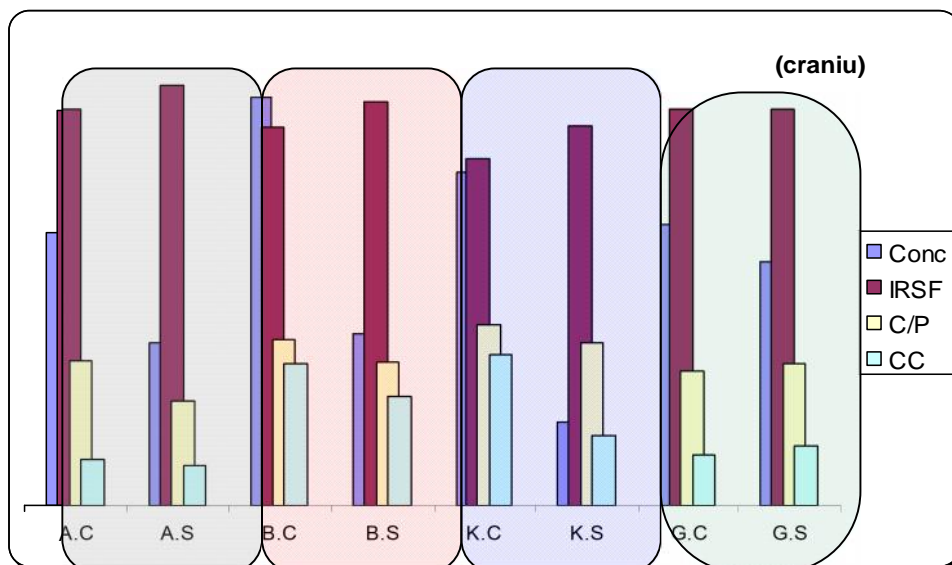


Fig.10. Corelarea directă între concentrația de ADN extrasă și indicii CC și C/P și corelarea lor inversă cu IRSF, la indivizii A, B, K. Individul G prezintă o neconcordanță cu restul rezultatelor observate. A = individul M2, B = individul M3, K = individul M115A, G = individul M7, C = os compact, S = os spongios. Indicii nu sunt reprezentați în valori absolute.

Tab.5. Valorile concentrației ADN extrasă din porțiunea compactă (gri deschis), respectiv spongioasă (gri închis) a oaselor craniene de la indivizii A, B, G și K, și valorile indicilor FTIR corespunzătoare.

Individ	Conc (ng/μl)	IRSF	C/P	CC
A	52.4	3.803	0.139	0.045
	31.2	4.034	0.1	0.038
B	78.2	3.63	0.159	0.136
	33	3.876	0.138	0.104
G	53.8	3.791	0.129	0.048
	46.7	3.791	0.136	0.056
K	1.6	3.323	0.174	0.145
	0.4	3.633	0.156	0.068

Dintre indivizii studiați, unul singur (M7-G) nu se supune modelului: în acest caz, indicii FTIR au avut valorile IRSF și C/P aproape identice pentru osul spongios *versus* cel compact, iar CC a fost invers proporțional cu concentrația de ADN extrasă. Probabil că osul compact a suferit o fosfatizare concomitentă cu o decarbonatare, ceea ce a dus la scăderea indicilor CC și C/P și la creșterea IRSF. Mormântul M7 are într-adevăr o deosebire majoră față de celelalte din necropol, și anume prezența unor bârne de lemn și a ocrului. Este posibil ca materialul organic

vegetal suplimentar s fi fost legat preferen ial de carbonatul din vecin tatea scheletului i astfel exteriorul craniului s fie mai pu in carbonatat decâ t stratul spongios profund.

În figura 11 sunt reprezentate spectre ale diferen ei dintre spectrul osului compact i cel al osului spongios pentru fiecare din indivizii testa i. Spectrele explic datele prezentate în figura 10. Se observ diferen a mare între valorile indicelui CC la individul K, prin în l imea peak-ului amidei I în spectru i egalitatea indicilor la individul G, unde spectrul de diferen nu are un vâr f. În ceea ce prive te indicele C/P, diferen a se manifest la nivelul peak-ului fosfatului: pentru indivizii A, B i K valoarea diferen ei absorb iei între compact i spongios este o valoare negativ , pe când la individul G osul compact are un con inut de fosfat mai mare decâ t cel spongios. i pentru IRSF (cu detaliu în medalion) diferen a se poate ar ta de pe spectru: la individul A zona de diferen a spectrelor corespunz toare peak-ului despicat arat ca litera “W”, i în contrast, la individul G spectrul este invers, ca un “M”.

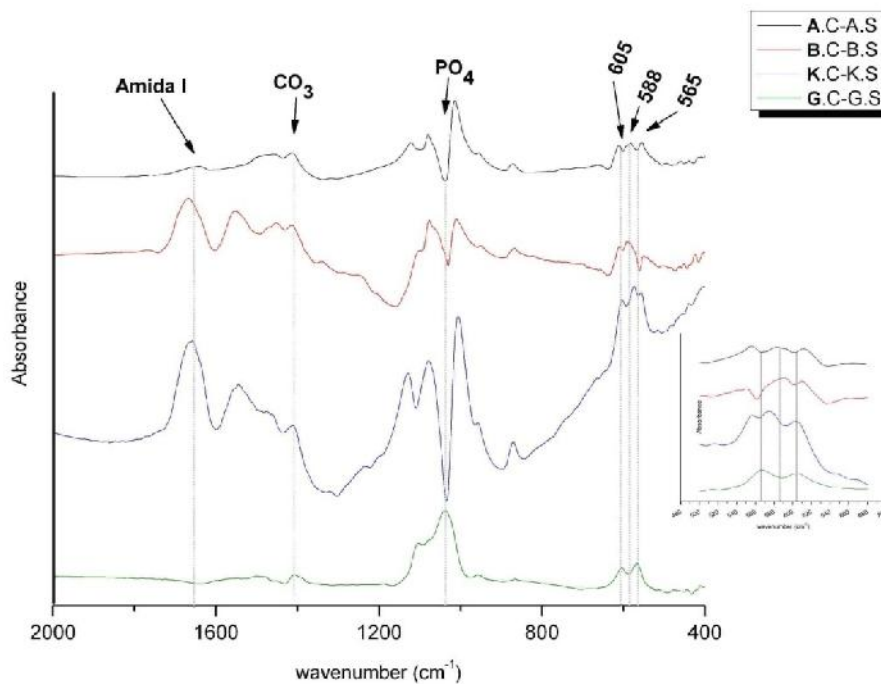


Fig.11. Diferen a dintre spectrele de absorb ie ale osului compact i spongios pentru indivizii A, B, K i G. Se observ diferen ele de la nivelul amidei I, al carbonatului i fosfatului i din zona de calcul a indicelui de cristalinitate IRSF, care se vede în detaliu în medalion.

Diafize

S-a comparat randamentul extrac iei de ADN din osul compact a unor diafize degradate diferit, apar înând acelaia i individ. În cazul individului M7-G, indicii i concentra ia de ADN sunt în rela ie identic cu a cazurilor prezentate mai sus i în concordan cu atribuirea vizual a caracterului de degradare (Figura 12A). i pentru diafizele individului M3-B, concentra ia ADN extras a coincis cu degradarea macroscopica a osului (Figura 12B, Tabel 6), îns valorile indicilor nu au corespuns: IRSF i CC au fost aproape identice pentru cele dou oase, iar C/P fost inversat (Tabel 6). Totu i, faptul c aici indicii FTIR nu aduc mult ajutor în alegerea osului mai potrivit pentru extrac ie, este normal s alegem osul mai pu in degradat dac urm rim purificarea de ADN.

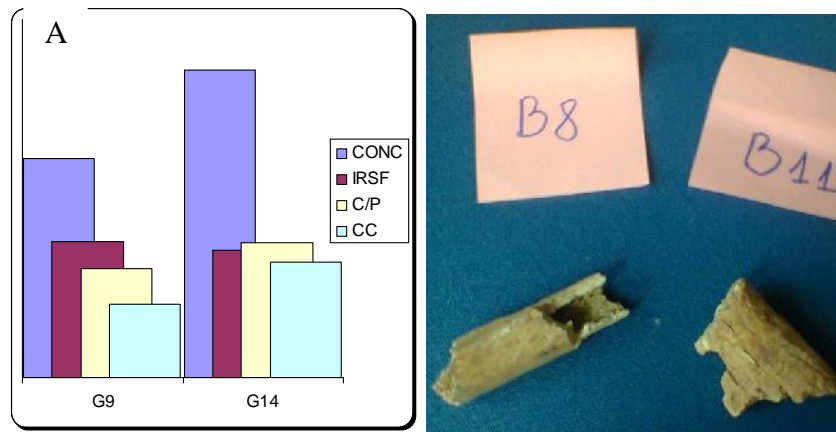


Fig.12. A. Corelarea dintre concentrația ADN extras din două diafize ale individului M7-G (proba G9 mai slab conservată decât proba G14) și indicii FTIR pentru oasele respective. B. Fotografie a probelor din individul M3-B, unde proba B8 este vizibil mai bine conservată decât proba B11.

Tab.6. Valorile concentrației ADN extras din probele de os compact lung pentru indivizii B și G și ale indicilor FTIR în oase cu grade de degradare vizibil diferite. Pe rândurile gri deschis sunt probele mai slab conservate și pe rândurile gri închis sunt probele mai bine conservate.

	Concentrație(ng/ul)	IRSF	C/P	CC
B11	35	3.554	0.165	0.082
B8	111.8	3.505	0.144	0.084
G9	54.9	3.421	0.152	0.093
G14	77.3	3.189	0.189	0.146

Extracția de ADN vechi

ADN-ul extras din probe arheologice este puternic degradat. După cum se vede în Figura 13, majoritatea materialului extras are lungimi sub 50 pb. Primele două probe sunt extrase din oasele craniului, compact și spongios. Toate celelalte probe (din corp vertebral, coastă, două diafize compacte și o epifiză spongioasă) prezintă urme majore de contaminare cu ADN modern, în partea de sus a gelului. ADN modern nu este la fel de degradat, deci nu migrează la fel de repede în gelul de agaroz. Contaminarea este cel mai probabil de origine microbială, în probele extrase din os spongios fiind mult mai evidentă. Blankul de extracție nu conține ADN.

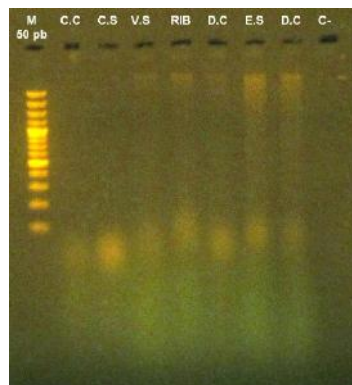


Fig.13. Gel de agaroz 2% cu ADN vechi extras din probe de os. Banda inferioară a markerului are 50 pb.

Determinarea inhibitorilor PCR co-extra i cu ADN antic

Este un fapt bine cunoscut în literatură că ADN extras din probe antice conține inhibitori ai PCR, ceea ce constituie o mare problemă. Chiar și la adăugarea unui puțin de extras ADN într-un PCR cu ADN modern, reacția este inhibată (Kalmari *et al.*, 2000). S-a încercat deducerea substanțelor rămase în extrasul de ADN și inhibițiile ulterioare, pentru a putea dezvolta o metodă eficientă și direcționată de purificare. Prin compararea spectrelor de absorbție FTIR (de fapt de Transmisie) ale probelor de ADN extras cu ale substanțelor folosite în etapa de extracție ADN (sursa: chemicalbook.com), s-au exclus fenolul și cloroformul dintre potențiali inhibitori (Figura 14). În intervalul $3000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, fenolul are câteva peakuri care în probele noastre nu apar, iar cloroformul are un peak puternic la $800 - 750 \text{ cm}^{-1}$, peak ce nu se observă în probe.

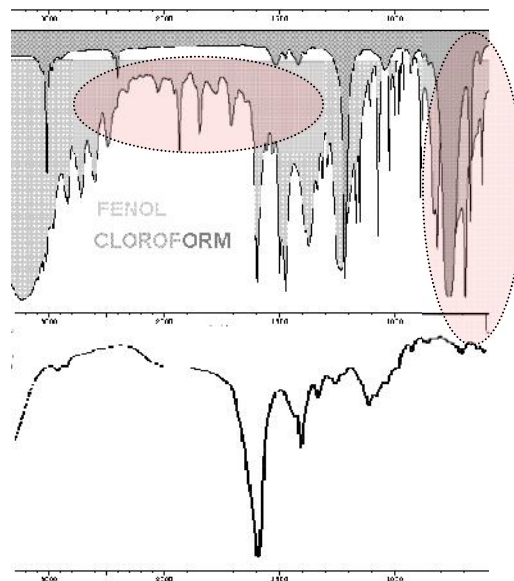


Fig.14. Evidențierea diferențelor dintre spectrele de absorbție în IR ale fenolului (gri deschis) și cloroformului (gri închis) în comparație cu spectrul specific al ADN antic extras (jos). Cu roșu sunt marcate peak-urile care infirmă prezența acestor substanțe în produsul extras.

Substanțele folosite în soluția de decalcifiere au fost de asemenea verificate prin compararea spectrelor individuale (chemicalbook.com) cu spectrul probelor obținute prin extracție. SDS-ul iese din calcul din cauza peak-ului puternic de la $3000 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ și TRIS-ul datorită peakului îngust de la 1040 cm^{-1} . În schimb, EDTA pare să corespundă spectrului de absorbție al probelor investigate, având un peak puternic la 1600 cm^{-1} , și mai multe mici între $1400 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, la fel ca probele de ADN extras (Figura 15).

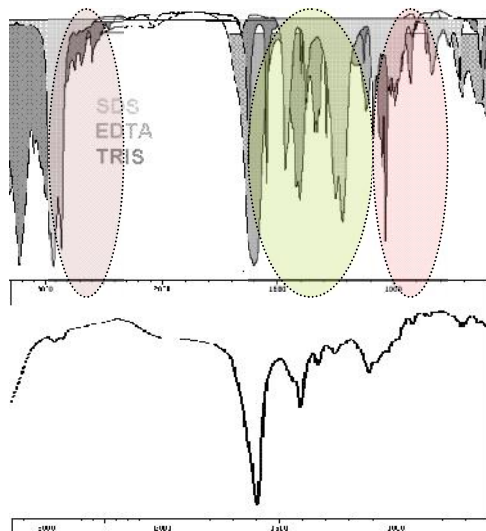


Fig.15. Compara ie a spectrelor SDS (gri pal), EDTA (gri i) i TRIS (gri i nchis) cu al ADN-ului antic extras (jos). Marcate cu ro u sunt peak-urile care dovedesc absen a SDS i TRIS i n produsul de extrac ie. Cu verde e eviden iat EDTA, cu un spectru asem n tor cu al probei.

A adar, se pare c substan a care r m n e i n probele de ADN i inhib amplificarea prin PCR ar putea fi EDTA, un cunoscut inhibitor al polimerazei, ce ac ioneaz prin chelatarea ionilor de magneziu, necesari enzimei pentru func ionare.

Pe l n g culoarea maronie a probelor ob inute, s-a observat c extractul de ADN are fluorescen albastr i n UV (Figura 16). Pe l n g aceste dou observa ii, Pääbo spunea c probele de ADN antic extras au un miros pl cut, dulciu (2014). Aceste indicii conduc i n spre existen a i n probe a produ ilor Maillard.

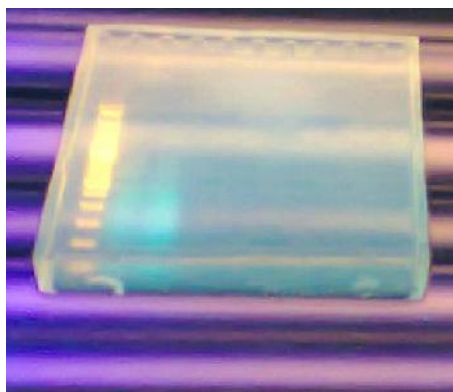


Fig.16. Gel de agaroz i n UV, pe care s-a migrat ADN antic. Se observ fluorescen a albastr .

Produ ii Maillard copurifica i cu ADN antic pot fi de origine endogen (din condensarea colagenului cu zaharuri) sau pot proveni din sol. Principala component organic a solului sunt acizii humici (Figura 17), molecule organice complexe de origine abiogen , ce se formeaz de-a lungul timpului, prin reac ie Maillard i ntre molecule de resturi organice r mase i n sol. I n plus, acizii humici sunt cunoscu i ca fiind inhibitori ai polimerazei i n PCR. Figura 18 arat spectre de absorb ie i n IR ale unor acizi humici. Primele 2 casete con in imagini preluate din literatur , caseta C con ine spectrele IR ale acizilor humici conform chemicalbook.com, iar caseta D con ine spectrul de absorb ie al probei G9 de ADN extras din os. Complexitatea i varia ia structurii chimice a acestor molecule duce la diferen e i n spectru i n func ie de propriet ile solului din care provin. I n plus, i n probele studiate aici, acizii humici sunt i n amestec cu ADN, care contribuie i el cu mici diferen e la propriet ile spectrale, iar posibilitatea ca i EDTA s fi fost copurificat nu trebuie omis .

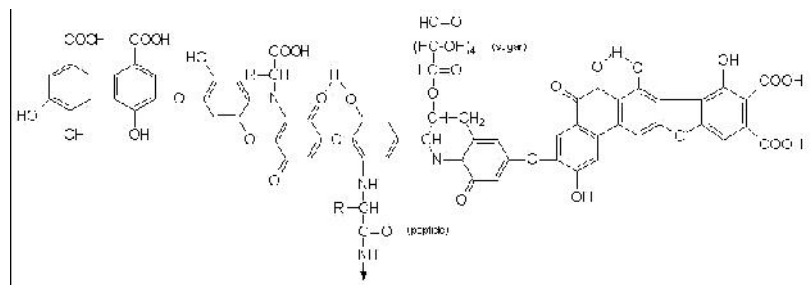


Fig.17. Formula chimic general a acizilor humici.

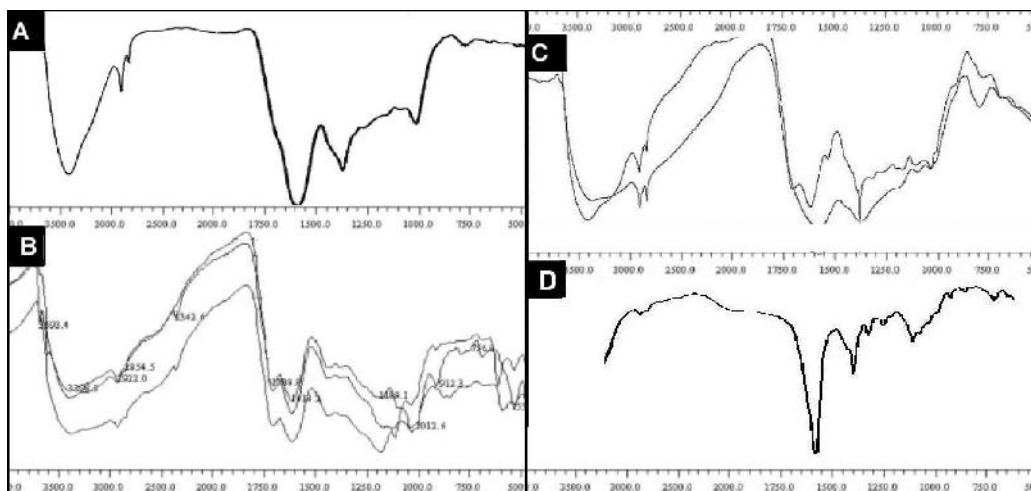


Fig.18. Spectre de absorb ie în IR ale unor acizi humici. A – dup Rodriguez i colab., 2009; B – dup Fong i colab., 2006; C – chemicalbook.com; D – proba G9 de ADN extras din os.

Înl turarea produ ilor inhibitori din extractul de ADN

S-a încercat purificarea ADN-ului extras cu kitul SureClean Plus de la Bioline®, dar f r a folosi co-precipitantul roz, care ar fi putut da semnale spectrale care s interfereze cu interpretarea datelor, i la UV i în IR. Diferen a dintre spectrele de absorb ie în IR ale probelor înainte i dup purificare se poate observa în figura 19, unde spectrul de sus, negru, arat transmitan a probei D1 înainte de purificare, spectrul ro u – dup purificare, iar spectrul albastru este diferen a celor 2 spectre, fiind o vizualizare a cantit ilor i tipurilor de contaminan i înl tura i. Colorarea maronie a probelor a fost redus sau înl turat prin folosirea kitului, iar spectrele confirm înl turarea unei p r i din contaminan i.

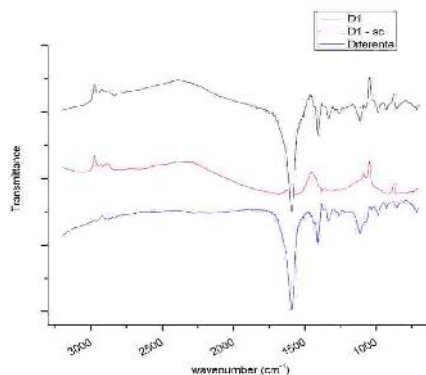


Fig.19. Spectrele de absorb ie în IR ale probei D1, înainte i dup purificarea cu kitul SureClean Plus de la Bioline® (spectrul negru, respectiv ro u) i diferen a dintre acestea (spectrul albastru). Se observ c peak-ul puternic de la 1600 cm⁻¹ i peak-urile mai mici dintre 1400 – 1100 cm⁻¹ dispar.

Valorile concentra iei de ADN citite prin spectrometrie UV înainte i dup etapa de purificare ar trebui s fie corelate liniar, a a cum este în cazul probelor apar inând indivizilor D

i G (Figura 20.1), dar nu întotdeauna rela ia se p streaz (Figura 20.2). La indivizii A i B nu exist o corelare între concentra iile ADN citite la spectrofotometru pentru fiecare prob . Se poate ca din cauza faptului c nu s-a folosit co-precipitantul roz, ADN s fi fost aruncat din anumite probe, astfel explicând necorelarea. Cantitatea de ADN în aceste probe este prea mic pentru a se forma un pellet vizibil, crescând posibilitatea arunc rii materialului genetic. O alt explica ie ar putea fi legat de degradarea ADN, fragmentele sub 100 pb fiind eliminate de kit. Deci, dac o anumit prob coninea un raport mai mare de fragmente sub 100 pb, concentra ia de ADN dup purificare trebuie s fi sc zut mai mult decât la o prob cu pu ine fragmente mici.

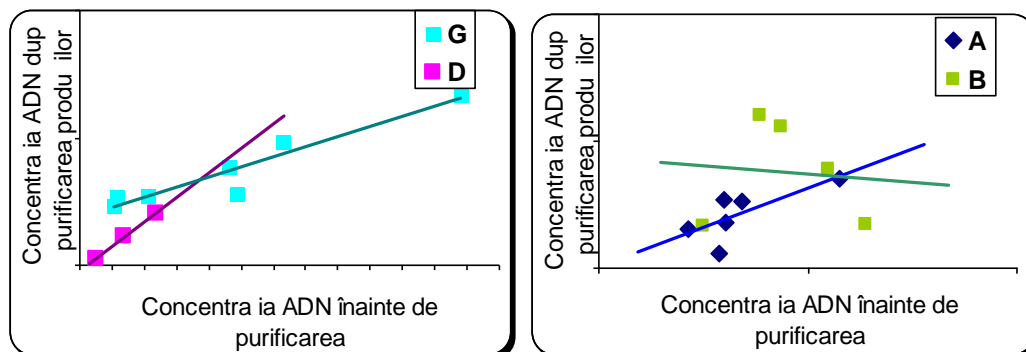


Fig 20.1. Corelarea liniar a concentra iilor de ADN înainte i dup purificarea cu kitul SureClean Plus de la Bioline®. 2. Probe pentru care corelarea liniar nu s-a p strat.

Efectele etapei de purificare asupra randamentului PCR

Nu s-a reu it cre terea randamentului PCR prin purificarea cu kitul SureClean Plus de la Bioline®. Urmeaz s se încerce i alte metode de purificare a ADN, cum ar fi precipitarea cu izopropanol (Hänni i colab., 1955), sau introducerea în procesul de extrac ie a PTB (N-phenacylthiazolium bromide), substan ce inverseaz reac iile Maillard.

Nici cre terea concentra iei de $MgCl_2$ pân la 2.5 mM, i nici reducerea concentra iei amorselor pân la 0.5 pmoli/ μ l nu au avut efect pozitiv asupra reac iei de amplificare. Folosirea adjuvan ilor, ca BSA i 2x Polymate AdditiveTM (Bioline) nu au reu it s contracareze efectul inhibitor al compu ilor copurifica i. S-au încercat diferite dilu ii ale ADN, dar rezultatul a fost întotdeauna negativ. Pe toate gelurile s-au v zut dimeri de amorse, la ~50pb.

Totu i, faptul c probele au fost cur ate eficient de compu ii Maillard prin metoda adoptat (dup cum demonstreaz rezultatele prezentate în lucrarea de fa) se contrazice cu nereu ita tuturor încerc rilor de a îmbun t i randamentul PCR. Se poate ca într-adev r ADN s fie atât de puternic degradat, încât reac ia nu are matrice de lungimea potrivit de la care s porneasc , având în vedere faptul c popula ia studiat aici are 4500 de ani vechime (conform dat rii radiometrice). Prin compara ie, la un individ ce dateaz din secolele IV – V d.Cr (Rusu-Bolinde i colab., 2014), deci cu o vechime de aproape o treime din cea a popula iei de la Mireasa, s-au putut efectua amplific ri ale fragmentelor HVR1 A, B, C, i D, folosind aditivii BSA sau Polymate, cu 2.5 mM $MgCl_2$ i o dilu ie a ADN matrice de 1:30. Produsul de extrac ie de la acest individ nu a fost purificat, dar tot a dat rezultate, în ciuda color rii maronii. A adar, se pare c timpul petrecut de oseminte în sol are o influen asupra randamentului experimentelor ulterioare, mai ales când diferen ele de perioade sunt atât de mari. Pentru indivizi data i la intervale de timp apropiate, factorii de mediu sunt decisivi în procesul de diagenez , dar aici diferen a de vârst î i spune cuvântul.

CONCLUZII

O comparație între valorile indicilor FTIR la indivizi diferiți nu se poate face în mod relevant, fiecare dintre ei suferind un grad de diagenză diferit, în funcție de condițiile din imediata vecinătate. Se pot compara doar oase ale aceluiași individ pentru a alege varianta optimă pentru o extracție ulterioară.

În general, se recomandă extragerea de ADN din oase lungi sau ale craniului, din zone groase de os compact, care nu au fost deschise, deci au șanse mult mai mici de contaminare, și în niciun caz din oase spongioase, care deși par să conțină mai mult ADN, acesta este în mare parte de origine exogenă, bacteriană cel mai probabil.

O legătură impresionantă s-a observat între valorile indicilor FTIR și vârsta indivizilor la moarte. Astfel de tehnici pot veni cu mult în ajutorul metodelor clasice de atribuire a vârstei.

S-au identificat compuși colorați din extrasul de ADN, puternici inhibitori ai PCR, ca fiind acizi humici, probabil în amestec cu EDTA.

Prin purificări suplimentare ale ADN se poate reduce cantitatea de substanțe coextrase nedorite care inhibă PCR, dar apare și riscul reducerii cantității de material genetic din probe.

La populația de la Mireasa, datând din epoca Bronzului, nu s-a reușit amplificarea nici unui fragment de ADN mitocondrial, motivul cel mai probabil fiind vechimea oaselor.

Studiul II.

Diagnosticul molecular al tuberculozei la o populație gotică din Gherăseni, România

Din necropola de la Gherăseni, județul Buzău, au fost deshumate doi indivizi, notați M3 și M4, despre care s-a presupus că au fost afectați de boala lui Pott (tuberculoză osoasă). Pentru că au trăit în aceeași perioadă, o boală infecțioasă ar putea ușor să explice distribuția acestor simptome într-o comunitate restrânsă. Dat fiind lipsa dovezilor patognomice, scopul acestei lucrări experimentale a fost confirmarea sau infirmarea prin metode moleculare a prezenței tuberculozei. Lumea științific este preocupată de secvența ADN-vechi provenită din organisme patogene deoarece astfel se poate identifica rata mutațiilor în situsuri implicate în patogenitate. Dat fiind dezvoltarea în ultimele decenii a tulpinilor MDR și XDR de *M. tuberculosis*, este importantă identificarea mecanismului de achiziție a rezistenței la antibiotice. Deși experimentul în discuție nu va putea răspunde la această întrebare, el îi propune să confirme existența tuberculozei în această populație antică și astfel va pune bazele unui studiu mai aprofundat.

Analiza antropologică

Analiza antropologică s-a realizat pe baza unor standarde de antropologie fizică pentru existența grilei de atribuire a scorurilor pentru fiecare marker osteologic (Brickley și McKinley, 2004). Vârsta este determinată folosind suturile craniene, uzura suprafeței auriculare și a simfizei pubiene. Pentru stabilirea sexului se iau în calcul: markerii cranieni: glabella, protuberanța nucală și mental, linia supraorbitală, procesul mastoid; markerii pelvieni: arcul ventral, concavitatea subpubiană, aspectul ramurii ischiopubiene și al sulcusului. Se pot semnala și unele patologii care afectează osul, dar toate caracterele determinate prin antropologie fizică sunt probabilistice. În afară de vârstă, celelalte ipoteze pot fi confirmate prin metode moleculare.

Păstrarea condițiilor de sterilitate

Pentru a se evita contaminarea probelor cu ADN-modern sunt urmate reguli stricte de procedură în laboratoare. Etapele de burghiere a osului, extracție de ADN-vechi și amplificarea prin PCR și electroforeză, sunt separate fizic, realizându-se în laboratoare diferite. Toate laboratoarele de ADN-vechi se află la un etaj al institutului unde nu există laboratoare în care se lucrează cu ADN-modern. Cele trei laboratoare de ADN-vechi sunt dotate cu filtre cu UV și 1 lmpi de UV. Filtrele funcționează non-stop iar 1 lmpi de UV sunt pornite pe timpul nopții dar și în timpul zilei atunci când se încheie munca la un individ și se trece la altul. Se lucrează în hote cu presiune pozitivă și 1 lmpi cu UV. Personalul este echipat cu combinezoane, măști cu filtru, măști. Există un circuit al personalului, astfel că nu se intră în laboratorul de extracție după ce s-a lucrat în cel de PCR.

Analiza FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy)

Probele pentru analiza FT-IR au fost prelevate din vertebre și coaste, zone preponderent afectate de tuberculoză. În plus, s-au testat probe din oasele lungi (ex. radius) ca și control negativ. 0,8 mg pudră de os s-au amestecat cu 150 mg KBr și s-au mojarat folosindu-se mojar și pistil din agat. Proba se comprimă cu ajutorul unei prese hidraulice până la presiunea de 175 kg/cm² până când se formează o pastilă translucidă. În urma spectroscopiei se obține un spectru

între numerele de undă 400 - 4000 cm^{-1} . Pentru fiecare probă s-a făcut blank-ul cu o probă compusă doar din KBr iar baseline-ul a fost corectat. După prelucrarea fiecărei probe s-au cutat semnalele specifice date de acizii micolici. Oasele pentru extracția ADN au fost selectate pe seama spectrului FT-IR. Pentru fiecare probă s-a calculat indicele de cristalinitate (infrared splitting factor) ca raportul dintre absorbanțele (A) la numerele de undă $(A_{565}+A_{605})/A_{588}$. Această valoare este importantă pentru că se află în corelație cu dimensiunea cristalelor de hidroxiapatit. S-a calculat și raportul dintre carbonat/fosfat (A_{1415}/A_{1035}) care ne spune cât anume din carbonat s-a pierdut, probabil în urma dizolvării în sol. Cantitatea de collagen pierdut în oase se poate deduce pe seama raportului $A_{1660}-A_{1645}/A_{1035}$. Această valoare este proporțională cu cantitatea de ADN-endogen pierdut. Toate aceste valori se folosesc atunci când se alege o probă de os pentru extracția ADN.

Protocolul de extracția al ADN-vechi

Decontaminarea

Probele alese pentru extracția ADN-vechi au fost tratate pentru a îndepărta contaminarea cu ADN modern de la suprafața oaselor. Oasele au fost spălate cu apă UV/UP, uscate și iradiate pe fiecare parte cu UV pentru 20 min. Suprafața osului a fost îndepărtată cu o freză dentară sterilă și osul a fost iradat pentru încă 10 min.

Decalcifierea și îndepărtarea collagenului de tipul I

Osul decontaminat a fost transformat în pulbere cu ajutorul unei freze dentare sterile și a unui micromotor rulat la viteză mică pentru a se evita degradarea ADN-vechi prin încălzire. 200 mg pudră de os au fost incubate peste noapte la 56°C cu 1 mL soluție de decalcifiere (0.5 M EDTA pH 8.0–8.5; 0.5% SDS; 50 mM Tris HCl pH 8.0; 1 mg/ml proteinaza K).

Extracția cu fenol-cloroform

1. Probele incubate peste noapte au fost centrifugate 5 min la 6.000 rpm.
 2. S-a transferat supernatantul într-un tub Eppendorf nou și s-a adăugat un volum egal de fenol-cloroform-alcool izoamilic (25:24:1) și s-a agitat.
 3. Probele au fost centrifugate 15 min la 6.000 rpm.
 4. S-a preluat faza apoasă, faza se atinge faza organică, și s-a transferat într-un tub nou. S-a adăugat un volum egal de fenol-cloroform-alcool izoamilic (25:24:1) și s-a agitat. Probele au fost centrifugate 15 min la 6.000 rpm.
 5. S-a transferat faza apoasă într-un tub nou și s-a adăugat un volum egal de cloroform, apoi tuburile s-au agitat. Tuburile au fost centrifugate 15 min la 6.000 rpm.
 6. Faza apoasă s-a transferat într-un tub nou. S-au adăugat 1/10 volume de $\text{CH}_3\text{-COONa}$ 3M, pH 5.2 și 2,5 volume de etanol absolut.
 7. Probele au fost ținute la -80°C pentru 10 min (o alternativă: 30 min la -3°C).
 8. Tuburile se centrifughează 15 min la 12.400 rpm.
 9. Supernatantul s-a îndepărțat cu pipeta, iar pellet-ul s-a spălat cu 1 mL etanol 80% și a fost centrifugat 15 min la 12.400 rpm. S-a repetat până când s-a format un pellet stabil*.
- *Deoarece ADN-vechi este foarte contaminat cu substanțe din sol, e posibil să fie necesari mai mult de trei pași de spălare.*
10. Pellet-ul a fost uscat la 37°C pentru a se îndepărta orice urmă de etanol.
 11. ADN a fost resuspendat în 50 μL apă PCR Grade sau tampon TE.

Cuantificarea ADN-vechi extras

Cantitatea de ADN din fiecare probă a fost cuantificată prin două metode: electroforeză în gel de agaroză și spectrofotometrie.

Electroforeză în gel de agaroză

Deoarece ADN-vechi este foarte degradat și se găsește aproape în totalitate în fragmente de 50-200 pb, s-a preparat un gel cu concentrația de 2% agaroză. 100 mL tampon TAE se amestecă cu 2 g agaroză într-un pahar Erlenmeyer. S-a topit agaroză folosindu-se un cuptor cu microunde. S-a lăsat să se răcească amestecul și s-au adăugat 5 μL bromură de etidiu (10mg/mL) pentru a se ajunge la concentrația finală de 0,5 μg/mL. ADN-vechi s-a încălzit în godeuri. Se migrează cu 5-10 V/cm (distanța dintre electrozi). ADN s-a vizualizat prin iradierea gelului cu UV într-un transiluminator (Barbas et al., 2001).

Spectrofotometrie

Acizii nucleici absorb radiația luminoasă cu lungimea de undă de 260 nm, proteinele absorb la 280 nm iar fenolul la 230 nm. Pentru această analiză este necesară proba de ADN ce se dorește cuantificată, o probă martor (apa sau tamponul TE în care s-a resuspendat ADN) și un spectrofotometru (NanoDrop Spectrophotometer). Suprafața optică superioară și inferioară s-a ștersă cu apă UV/UP. S-a deschis software-ul aparatului și s-a selectat modulul - acizi nucleici. Mai întâi se citește o probă de apă. Apoi se citește proba martor prin adăugarea a 1-2 μL pe suprafața optică și selectarea butonului - Blank. Apoi s-au adăugat câte 1-2 μL din probele de ADN și s-a selectat opțiunea - Measure. După fiecare măsurătoare suprafețele optice au fost șterse cu apă UV/UP. Pentru o cuveta cu latura de 1 cm, o soluție pură de ADN dublu-catenar cu concentrația de 50 ng/μL are densitatea optică (OD₂₆₀) egală cu 1. Pe baza acestei corelații, aparatul afișează concentrația de ADN existentă în probe. Valoarea optimă pentru raportul 260/280 este cuprinsă între 1.8 - 2. O valoare mai mică este interpretată ca o contaminare cu proteine, iar una mai mare indică prezența ARN sau a ADN mono-catenar (Barbas et al., 2001).

PCR (Reacția în lanț a polimerazei)

Pentru confirmarea tuberculozei s-a dorit amplificarea unor secvențe de ~100 pb din locii: *pncA*, *oxyR*, IS1081 și D1. Amorsele au fost concepute de Taylor și colab. (2005) când au investigat cazul de la Tarrant Hinton. Aceștia au descris și condițiile de reacție (Tabelul 1).

Tabelul 1. Condițiile de reacție descrise de Taylor și colab. (2005)

Locusul	Amorsa	Secvența	MgCl ₂ (mM)	Ta (°C)	Produsul (pb)
IS1081	Forward F2	5'-CTGCTCTCGACGTTTCATCGCCG	2.0	58	113
	Reverse R3	5'-TGGCGGTAGCCGTTGCGC			
<i>oxyR</i>	Forward F3	5'-CACTGCCTACGCGACCAGACG	1.5	67	110
	Reverse R1	5'-TCIGCGGAATCAGTGTACAC			
<i>pncA</i>	Forward F2	5'-GGCGGACTACCATCACGTCG	2.0	58	117
	Reverse R2	5'-GGAGTACCGCTGACGCAATGC			
D1 flanking	Forward F	5'-ATCGAAAGGCYAACGGGIGC	2.0	58	112
	Reverse R2	5'-CTGCTCGCCGAGTTGCTCGATA			
D1 internal	Forward F3	5'-CGAGCTACGACGCTCGCTATTA	2.0	60	115
	Reverse R3	5'-GCATATCGTGATCCGTCCTCGAT			

Pentru fiecare set de amorse s-a realizat un control pozitiv folosind ADN-genomic de la *M. tuberculosis* primit de la Institutul Cantacuzino, România. Reacțiile pentru ADN modern și vechi s-au realizat în laboratoare diferite (aflate la etaje diferite) ale institutului pentru a se evita contaminarea și obținerea de rezultate fals- pozitive.

Pentru a crește randamentul reacțiilor pe ADN-vechi este sczut, pentru fiecare set de amorse s-au realizat două reacții succesive, la al doilea PCR folosindu-se 1 μ L din produsul primului. Am adaptat reacțiile crescând temperatura de aliniere la *pncA* și IS1018 cu 2°C. Aceasta ne-a ajutat să creștem specificitatea reacțiilor. Am folosit BSA (albumină serică bovină), PEG (polietilen glicol) și DMSO (dimetil-sulfoxid) ca aditivi pentru a crește randamentul reacției. Pentru fiecare PCR s-au realizat 30 de cicluri.

Purificarea ADN din gelul de agaroză

Produsele PCR s-au migrat în gelul de agaroză urmând metoda descrisă mai sus. Etapa de purificare a ampliconilor din gel s-a realizat cu ajutorul kitului "Agarose Gel extraction Kit, Jena Bioscience".

Clonarea produsilor PCR

Această etapă s-a realizat folosind kitul "CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific". Am folosit protocolul de clonare cu "capete boante" (Blunt-End Cloning Protocol). Prima dată s-au digerat "capetelor adezive" prin realizarea mixului: 2X tampon de reacție - 2 μ L, H₂O - 1.5 μ L și DNA Blunting Enzyme - 0.5 μ L. Amestecul s-a vortexat, centrifugat apoi s-a incubat la 70°C pentru 5 min. Probele s-au răcit pe gheață. Reacția de ligare s-a realizat prin adăugarea la amestec a 0,5 μ L pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ μ L) și 0,5 μ L T4 DNA -ligase. Tuburile s-au vortexat, centrifugat și incubat la temperatura camerei pentru 30-60 min. Pentru clonare s-a realizat următorul amestec: KCM 5X - 20 μ L, H₂O - 70 μ L, Produs de ligare - 10 μ L. Celulele competente s-au scos de la -80°C și s-au dezghețat pe gheață. 100 μ L suspensie de celule competente s-au adăugat la amestecul descris mai sus. Tuburile s-au purtat pe gheață pentru 20 min, apoi la temperatura camerei pentru încă 10 min. S-a adăugat peste amestec 1 mL mediu LB lichid. Tuburile s-au ținut la 37°C pentru 20 min. 200 μ L amestec s-a folosit pentru inocularea plăcilor cu agar. Acestea s-au incubat la 37°C pentru ~16 ore.

* Prepararea mediului LB (Lysogeny broth) - lichid: 25 g LB - 1000 mL H₂O
- solid: 15 g agar la 1000mL H₂O

- antibiotic - Ampicilin (100mg/mL) se adaugă pentru un volum final de 100 μ g/mL.

* Prepararea KCM 5X: 2M KCl - 2.5 mL, 1M MgCl₂ - 2.5 mL, 1M CaCl₂ - 1.5 mL, H₂O - 3.5mL.

Pentru preculturi se toarnă 5 mL mediu LB lichid cu Ampicilin în tuburi de 15 mL pentru preculturi. Acestea se inoculează cu o colonie de pe placa Petri. Preculturile se incubează la 37°C, cu agitare 200 rotații/minut, pentru ~16 ore.

Purificarea de plasmide

Această etapă s-a realizat utilizând kitul "Fast-n-Easy Plasmid Mini Prep Kit", Jena Bioscience. ADN s-a eluat în 50 μ L tampon de eluție.

Secvențializarea ADN

Procedura de secvențializare a plasmidelor s-a realizat de către MacroGen Company, Netherlands. Pentru reacțiile de secvențializare s-au folosit amorsele specifice ale plasmidului pJET 1.2.

Analizele bioinformatic

Produsele PCR s-au identificat în interiorul secvențelor vectorilor prin utilizarea amorselor folosite la PCR utilizând software-ul BioEdit 7.2.5. Fiecare secvență s-a identificat prin comparare cu cele existente în GenBank (NCBI) folosind instrumentul BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) cu opțiunea *blastn*.

În cazul genei *pncA*, atunci când nu s-a obținut niciun rezultat folosindu-se parametrul *Highly similar sequences*, am schimbat parametrii algoritmului astfel: Program selection: *Somewhat similar sequences*; Expect threshold: 15; Word size: 7; Match/Mismatch Scores: 2,-3; Gap Costs: existence 2, extension 2 și s-a deselected *Low complexity regions filter*. Secvențele obținute s-au aliniat cu toate secvențele omoloage din genul *Mycobacterium* din baza de date *Gene* folosindu-se algoritmul Muscle în Mega 5. Ca și secvență outgroup s-a folosit secvența omoloagă a genei *pncA* de la *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Alinierea a fost exportată în formatul MEGA, necesar pentru construirea de arbori filogenetici. Am rulat în Mega 5 opțiunea Models - *Find Best DNA/Protein Models (ML)* și am stabilit că trebuie folosit modelul evolutiv Tamura 3 cu distribuție discretă Gamma.

Istoria evolutivă a secvențelor a fost calculată prin metoda Maximum Likelihood (Tamura, 1992). Arborele final este cel cu cea mai mare valoare log likelihood (-684.5563). Procentul arborilor în care secvențele au fost asociate în același cluster este afișat în dreptul ramurilor (valoarea Bootstrap). Lungimea ramurilor este proporțională cu numărul de substituții/situs. Toate pozițiile cu gap-uri au fost eliminate astfel că în setul final au fost luate în considerare 73 de poziții. Au fost analizate în total 45 de secvențe nucleotidice (Tamura și colab., 2011).

Analiza antropologică

Din necropola de la Gher seni au fost deshumate resturile osteologice a trei indivizi. Pe baza standardelor de antropologie fizică s-au dedus următoarele aspecte:

- Individul M3 (M - mormânt)
 - a. Reprezentarea. Din craniu s-a păstrat doar calota craniană. Vertebrele cervicale, toracale și lombare, precum și coastele, s-au păstrat în proporție de 1/3. Sternul nu este prezent. Dintre oasele lungi se păstrează partea proximală a humerusului de pe partea stângă, partea distală a celui de pe dreapta, regiunea medială și proximală a radiusului de pe dreapta. Omoplatul drept este mai bine reprezentat decât cel stâng. Clavicula de pe partea dreaptă este întreagă.
 - b. Conservarea. În general suprafața oaselor arată bine, iar conservarea a primit scor maxim.
 - c. Sexul. Patru din cei 5 markeri osteologici cranieni lipsesc (glabella, creasta nucală, marginea supraorbitală, mentonul). Mastoida a fost notată cu scorul 2 (1-feminin; 5-masculin), valoare corelată cu genul feminin. Niciunul din markerii pelvieni nu este reprezentat.
 - d. Vârsta. Markerii osteologici lipsesc. Aspectul general spune că individul a ajuns la maturitate.

e. Patologia. Se observă o artroz puternică pe partea proximală a humerusului stâng. Artroza a afectat și vertebrele cervicale și toracale, ducând la distrugerea platoului superior și inferior. Două din vertebrele toracale sunt unite - corpurile vertebrale lipsesc dar procesele spinuoase se păstrează (Figura 1). Procesele spinuoase sudate, o vertebra cervicală și două coaste (stânga și dreapta) au fost supuse analizelor fizice și moleculare.

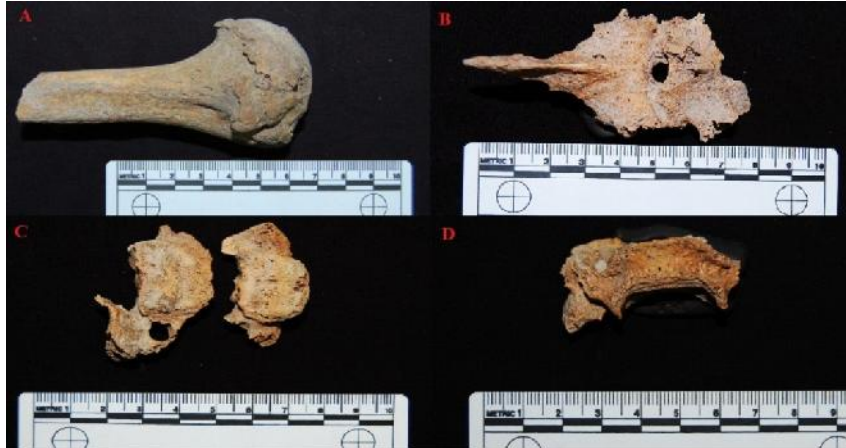


Figura 1. A. Epifiza proximală a humerusului stâng afectat de artroz ; B. Apofizele spinuoase a două vertebre toracale sudate între ele; C. Platouri vertebrale afectate de artroz ; D. Fața anterioară a unei vertebre cervicale afectat de artroz .

- Individul M4

a. Reprezentarea. Pentru că scheletul este aproape complet vom menționa doar oasele care lipsesc: oasele mâinii (dreapta și stânga), vertebrele cervicale C1, C3, C5 și toracale T1, T12, ischiul și pubisul, femurul stâng, patela, talusul și calcaneul (dreapta și stânga), oasele labei piciorului (dreapta).

b. Conservarea. În general conservarea este foarte bună .

c. Sexul. Scorurile acordate markerilor osteologici sunt prezentați în Tabelul 2. Se presupune că individul avea genul feminin dar acest aspect urmează să fie clarificat prin tehnici moleculare.

Tabel 2. Scorurile acordate individului M4 markerilor osteologici asociați genului.

CRANIU	Scor (1= ; 5=)	PELVIS	Scor (1= ; 9=)
Creasta nuchală	3	Concavitatea subpubiană	4
Mastoida	3	Unghiul subpubic	-
Marginea supraorbitală	3	Ramura ischio-pubiană	2
Glabela	3	Arcul ventral	6
Mentonul	4	Arcul compozit	7
		Incizura sciatică	7
		Sulcusul preauricular	9

d. Vârsta. Vârsta individului s-a estimat pe baza markerilor din Tabelul 3 ca fiind cuprins între 38-58 ani.

Tabel 3. Estimarea vârstei individului M4 pe baza markerilor osteologici.

Marker osteologic	Vârsta estimat
Capetele sternale	43-58
Simfiza pubian	38
Suprafața auriculară	45-47
Sinostoza suturilor	45-56
Uzura dentar	40-45

e. Patologia. Se observă sudarea următoarelor perechi de vertebre: C6 și C7, T7 și T8, T10 și T11. Platoul inferior al vertebrei lombare L5 este complet distrus, la fel și platoul superior la S1. În aceste regiuni țesutul compact lipsește iar cel spongios este expus (Figura 2). Aceste modificări s-a presupus că ar fi cauzate de boala lui Pott (tuberculoză localizată în oase).

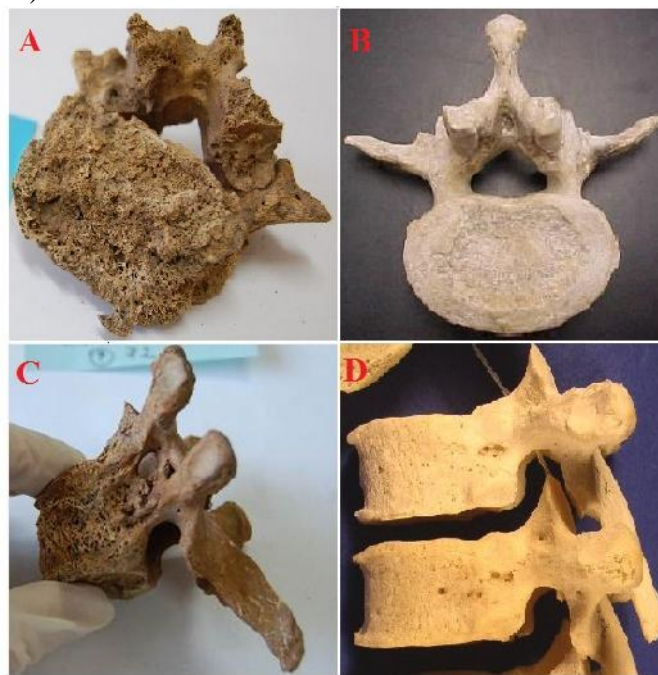


Figura 2. Probe din care s-a extras ADN pentru confirmarea diagnosticului de tuberculoză. A. Vertebra L5 cu platoul inferior distrus în comparație cu (B) o vertebra sănătoasă; C. Vertebre toracale sudate versus două vertebre dispuse anatomic.

- Individul M5
 - Reprezentarea. Din individul M5 se prelevează în mică măsură calota craniană, vertebrele toracale, lombare și coastele. Manubriul este întreg dar din corpul sternal s-a conservat doar jumătatea superioară. Omoplatul drept este întreg, la fel ca și humerusul, radiusul și ulna de pe partea dreaptă. Clavicula stângă este prezentă în întregime.
 - Conservarea. Oasele sunt conservate foarte bine, având scor maxim.
 - Sexul. Se prelevează un singur marker osteologic asociat sexului, creasta nucală, care i s-a acordat scorul maxim masculin.
 - Vârsta. Estimarea vârstei la 33-42 ani s-a realizat doar pe baza capetelor sternale ale coastelor, fiind singurul marker existent.
 - Patologia. Individului M5 nu i s-a asociat nicio patologie.

Analiza FT-IR

Datorit deform rilor osoase ale indivizilor M3 i M4 s-a presupus c ambii ar fi putut suferi de tuberculoz . Acesta este un diagnostic realist deoarece o boal infecioasă ar fi o bună explicaie pentru aceeași simptomatologie existentă în aceeași perioadă și într-o singur necropol . S-au prelevat probe pentru FT-IR din ace ti doi indivizi, atât din oase afectate de boal cât din cele care p reau neafectate. În spectrul obținut s-au identificat peak-uri asociate acizilor micolici (Figurile 3, 4), precum: absorbanța grup rii metilen la 2955 cm^{-1} , a grup rii metil la 2860 cm^{-1} și deformarea lanțurilor alifacice cu catenă lungă la 722 cm^{-1} (Coates, 2000; Mark i colab., 2009; Rafidinarivo i colab., 2009). Aceste rezultate îns , nu au valoare de diagnostic. Mark i colab. (2009) au testat probele lor pentru confirmarea tuberculozei i prin MALDI-TOF-MS. Minnikin i colab. (2011a, 2011b) i Gernaey i colab. (2001) s-au folosit de tehnica HPLC pentru stabilirea patologiei. Datele obținute de noi la FT-IR s-au folosit în selectarea oaselor din care s-a extras ADN, pe baza raționamentului că dacă există acizi micolici în acestea, probabil se g se te i ADN-vechi provenit de la MTBC.

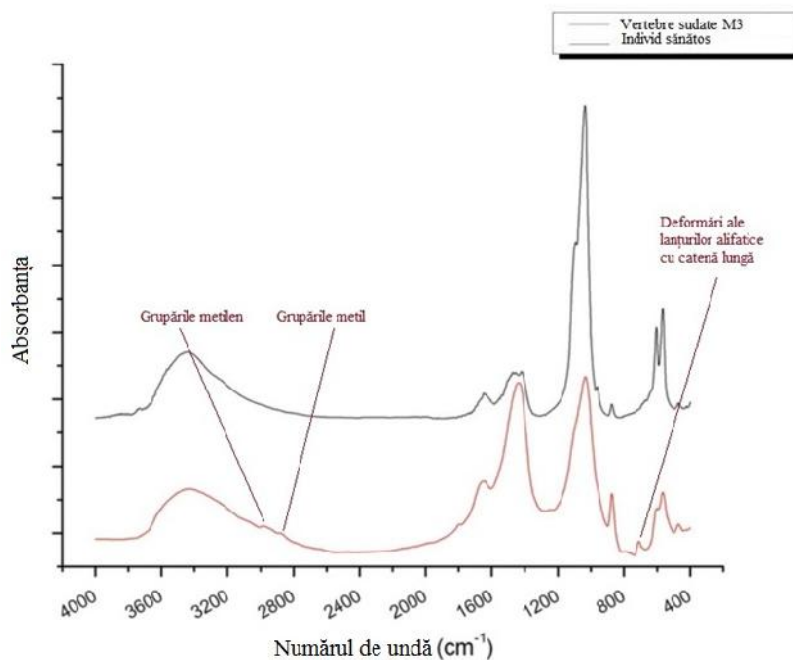


Figura 3. Spectrul FT-IR al unui individ s n tos versus M3, presupus a fi infectat cu MTBC.

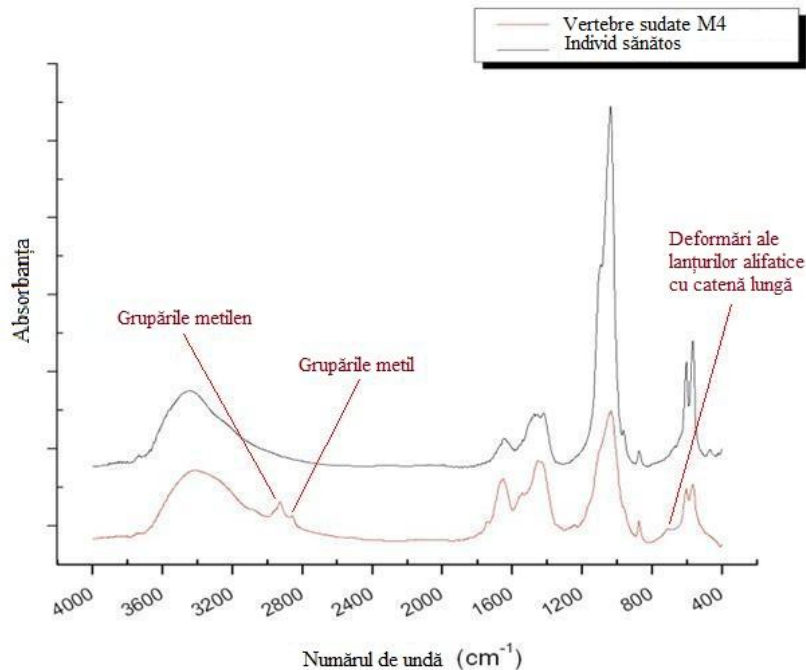


Figura 4. Spectrul FT-IR al unui individ sănătos versus M4, presupus a fi infectat cu MTBC.

Spectrul FT-IR se utilizează și pentru stabilirea indicelui de cristalinitate (CI) a hidroxiapatitei. Acesta se calculează ca raportul $(A_{595}+A_{605})/A_{588}$ dintre suma absorbanelor fosfatului (atunci când legăturile covalente P-O sunt îndoite antisimetric, iar aceasta rezultă într-o degenerare a semnalului de la numerele de undă 600 cm^{-1} , la 595 cm^{-1} și 605 cm^{-1}), și valoarea minimă dintre ele (Termine și Posner, 1966). Această valoare se corelează cu gradul de diagenză suferit de țesutul osos astfel că, cu cât acest raport este mai mare, cu atât este mai mare dimensiunea cristalelor. Comparațiile între oasele actuale și cele antice au arătat că CI în cazul primelor nu depășește valoarea de 2,7 pe când cele vechi au în general peste 3. Oasele fosilizate pot avea valori de până la 4,1 sau chiar 7 în cazul dinozaurilor (Bernard și colab., 2004). Totuși, în cazul indivizilor afectați de tuberculoză, acest raport este diminuat față de valoarea așteptată (Nagy și colab., 2008). Valoarea CI a individului M3 este de 3.04 iar a lui M4 de 2.65.

Un alt parametru calculat este raportul carbonat/fosfat (C/P) care indică ce cantitate de fosfat s-a pierdut din HA și a fost înlocuit de carbonat. În cazul oaselor infectate cu MTBC s-a observat o modificare a acestui parametru. Acest raport are media în jurul valorii de 0,23 la indivizii sănătoși, dar în infecțiile cu tuberculoză valoarea medie este mult crescută datorită calcifierii oaselor. Nagy și colab. (2008) au calculat o medie de 0.47 a raportului C/P pentru indivizi afectați de tuberculoză, iar media calculată de noi pentru indivizii de la Gherșeni este de 0.50 (M3) și respectiv 0.53 (M4).

Conținutul de collagen (C/C) este un alt indice care se poate calcula din spectrul FT-IR. Acesta reprezintă cantitatea de collagen prezent în matricea osoasă. Se calculează ca raportul dintre absorbanelor amidei I și PO_4 (A_{1640}/A_{1035}). O valoare de 0,2 corespunde la 15 wt% (procente de masă) și una de 0,8 la 30 wt% materie organică în os (Lebon și colab., 2010). Noi am presupus că există o relație proporțională între cantitatea de collagen din os și cea de ADN-vechi. Indivizii M3 și M4 au avut valoarea C/C de 0,3 respectiv 0,5, acestea sugerând că există posibilitatea izolării ADN-vechi endogen.

Extracția de ADN-vechi

După extracția cu fenol-cloroform conform protocolului descris, ADN a fost precipitat cu etanol și s-a observat depunerea unui precipitat brun-negricios. Acesta s-a resuspendat în 50 μ L apă PCR Grade, iar 8 μ L au fost migrați în gel de agaroz 1,5% (Figura 5).

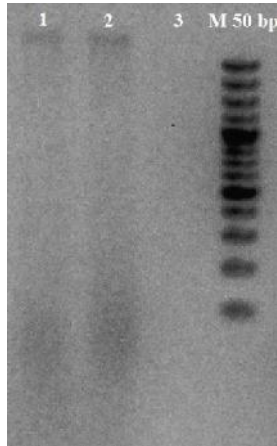


Figura 5. Electroforegrama obținută în urma migrației ADN-vechi extras din individul M4; 1. ADN extras dintr-o coastă; 2. ADN extras din vertebre sudate; 3. control negativ de extracție.

Deoarece s-au obținut rezultate similare la extracții succesive din același individ, M4, dar și din M3, s-a atașat doar Figura 9. Se poate observa în gelul de agaroz un "smear" de ADN datorat degradării în diageneză, astfel că majoritatea fragmentelor au o dimensiune mai mică de 50 pb. Mai mult, s-a observat în lumină UV o fluorescență albastră. Numeroase surse au raportat acest aspect și s-a arătat că fluorescența este datorată produșilor Maillard. Aceștia se formează în timpul diagenezei, prin cross-linkarea colagenului de tipul I cu acizii humici infiltrați din sol în oase. Aceștia migrează împreună cu ADN în gelul de agaroz iar în PCR au un efect puternic inhibitor. Kalmár și colab. (2000) și Hänni și colab. (1995) au încercat îndepărtarea acestor compuși în timpul extracției prin înlocuirea etanolului cu izopropanol și au observat o diminuare a semnalului fluorescent, dar inhibiția PCR poate fi evitată și prin diluarea ADN de 10 - 100x (Herrmann și Hummel, 1994).

Rezultatele amplificărilor prin PCR

Hänni și colab. (1995) au testat inhibiția produsilor Maillard prin realizarea unui PCR unde au adăugat 1 μ L ADN-vechi la mixul de reacție, iar ca ADN matriță au pus ADN-modern. Ei au observat că acel 1 μ L a fost suficient pentru a inhiba reacția, chiar dacă ADN-matriță era intact. Pentru a stabili la ce diluții activitatea polimerazei este restabilă, am diluat ADN-vechi extras din două vertebre sudate ale individului M3 de 25x, 50x, 75x, 100x. Inițial, la migrarea ADN-vechi în gelul de agaroz s-a observat o puternică fluorescență albastră. Rezultatul acestui PCR se poate observa în Figura 6. Astfel, atunci când o probă de ADN-vechi extras avea o fluorescență albastră puternică, s-a stabilit că la PCR se folosea o diluție a acestuia de 50x.

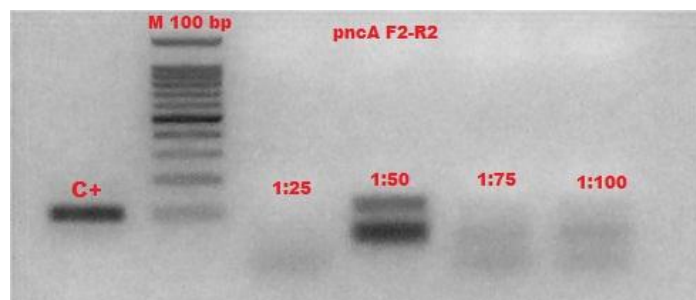


Figura 6. Amplificarea fragmentului de 117 pb din gena *pncA* cu amorsele F2-R2; se observă că diluția de 50x este suficientă pentru ca inhibiția datorată produșilor Maillard să fie depășită; se observă că diluția de 75x și 100x este prea mare, motiv pentru care ADN-matriță lipsește.

Gena *pncA* (pirazinamidaza/nicotinamidaza)

După mai multe teste s-a constatat că 3 μL de ADN-vechi sunt suficienți pentru o amplificare PCR într-un volum final de 25 μL . S-au realizat două amplificări succesive cu amorsele F2-R2 (vezi Tabelul 2). În prima reacție s-a adăugat BSA la un volum final de 1 mg/mL. Acest aditiv nu lasă ca ADN-matriță să adere la pereții tubului în care are loc reacția, aspect important mai ales atunci când concentrația acestuia este scăzută, și scade efectul inhibitor al acizilor humici (Pääbo și colab., 1988; Farrell și Alexandre, 2012; Simonovi și colab., 2012). Alinierea amorselor s-a făcut la 60°C în prima reacție și la 62°C în cea de-a doua, pentru a se crește specificitatea. În a doua reacție s-a folosit ca și matriță 1 μL din produsul reacției precedente. Electroforegrama pentru amplificarea *pncA* F2-R2 folosindu-se ADN extras din M4 poate fi observată în Figura 7.

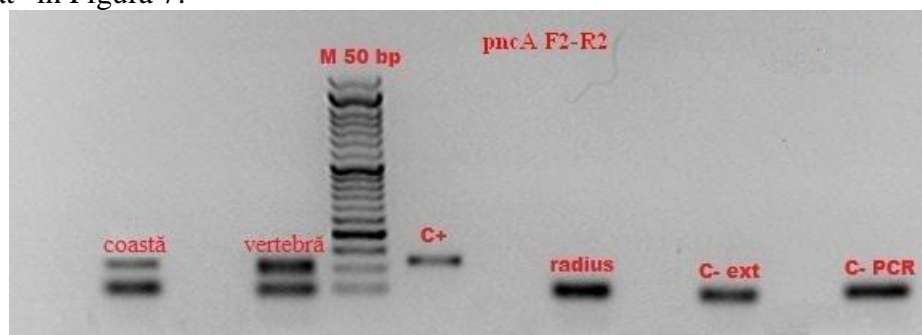


Figura 7. Produșii PCR amplificați cu amorsele *pncA* F2-R2 și cu ADN-matriță extras din individul M4; s-a obținut amplificare specifică doar din oase afectate de tuberculoză (coastă și vertebră); a fost testat și ADN extras din radius, dar nu s-a obținut amplificare; controalele de extracție și de PCR sunt curate, dovedind lipsa contaminării cu ADN modern; benzile cu dimensiune mai mică de 50 pb s-au constatat a fi dimeri de amorse.

Rezultate similare au fost obținute și pentru M4. Produșii au fost purificați din gelul de agaroz folosindu-se kitul Agarose Gel extraction Kit - Jena Bioscience, apoi au fost clonați cu ajutorul kitului CloneJET PCR Cloning Kit - Thermo Scientific.

Pseudogena *oxyR*

În reacția de amplificare a fragmentului de 110 pb din pseudogena *oxyR* s-au folosit 2 μL de ADN-matriță. Concentrația finală în mixul de reacție a MgCl_2 a fost crescută de la 1,5 mM la 2 mM deoarece inițial nu s-a obținut nicio amplificare. Ca și în cazul *pncA* s-a adăugat ca și

aditiv BSA (1 mg/mL) în reacția inițială. În a doua reacție s-a folosit 1 μL din produsul primului PCR. Rezultatele pot fi observate în Figurile 8 și 9.

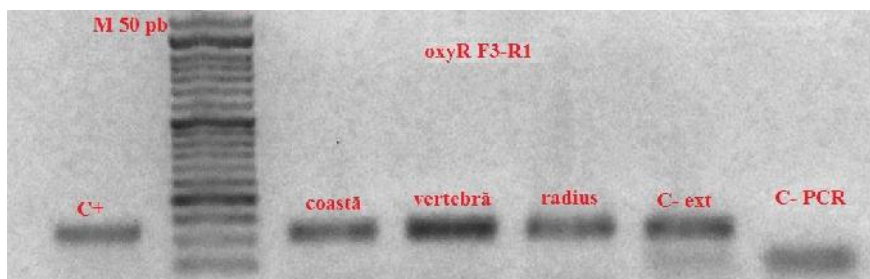


Figura 8. Electroforegrama produilor de PCR *oxyR* F3-R1 pentru individul M3; se observă cea mai bună amplificare a rezultat din ADN provenit din vertebra afectată diluat de 50x; există amplificare și în controlul de extracție, dar controlul de PCR este curat, ca urmare se exclude posibilitatea contaminării cu ADN-modern.

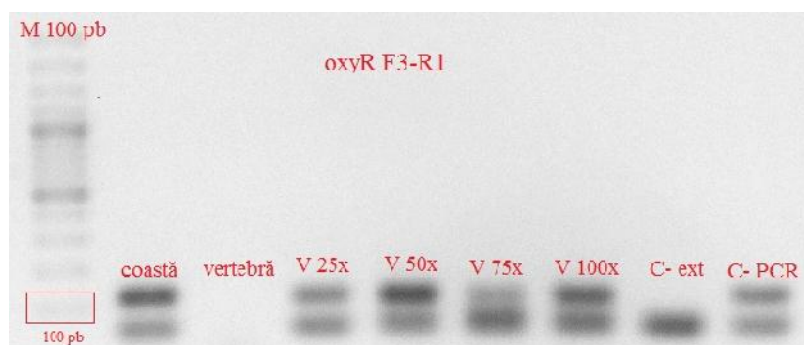


Figura 9. Electroforegrama produilor de PCR *oxyR* F3-R1 pentru individul M4; v - vertebră; s-a obținut amplificare specifică pentru probe din coastă, vertebre, dar și în controlul de PCR. Deoarece nu există amplificare în controlul de extracție, se consideră că nu a existat contaminare cu ADN-modern, dar probabil a intervenit o eroare de manipulare.

Produșii PCR au fost purificați din gel cu kitul de la Jena Bioscience. Până acum au fost clonați și secvențializați doar cei de la individul M3, cei de la individul M4 urmând a fi clonați ulterior.

Deleția *TbD1*

S-a încercat amplificarea unui fragment care flanchează deleția D1, folosindu-se amorsele F-R2. Deoarece la concentrația de 2 mM MgCl₂ nu s-a obținut nicio amplificare, s-a crescut concentrația la 2,5 mM. S-au folosit 2 μL ADN matri, iar în cazul ADN extras din vertebră s-a folosit o diluție de 50x. Ca și în cazurile anterioare, în prima amplificare s-a folosit BSA (1 mg/mL) (Figura 10).

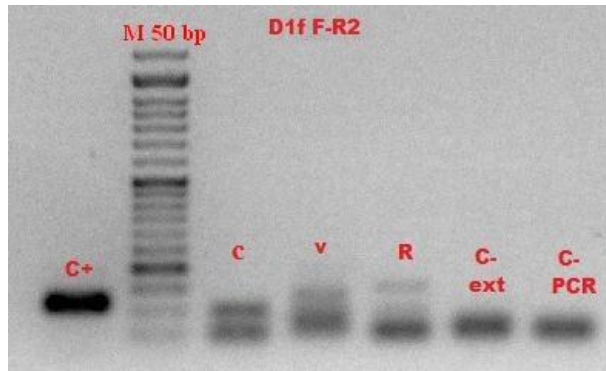


Figura 10. Electroforegrama ampliconilor D1f F-R2 pentru individul M3; c - coast , v - vertebr , r - radius; se observ c s-au obținut trei ampliconi de marimi diferite; fiecare bandă a fost purificată din gel, urmând a fi clonat ; controalele de extracție și de PCR sunt curate, de aceea se elimină posibilitatea contaminării cu ADN-modern.

Prezența deleției TbD1 face diferență între cele două tipuri de tulpini *M. tuberculosis*: ancestrale și moderne. De fapt, ambele tipuri există astăzi, așa cum arată un studiu realizat în India, responsabil pentru 21% din cazurile globale de tuberculoză. Stavrum și colab. (2009) au testat 65 de izolații de *M. tuberculosis* și au realizat că 26,2% aveau regiunea TbD1 intactă. Până acum, am reușit obținerea unor produse PCR folosind amorse care flanchează deleția, dar testăm și un set de amorse interne. Până acum am obținut o amplificare specifică în blankul de extracție. Presupunem că în probe nu avem amplificare datorită produselor Maillard. Urmează să optimizăm reacția prin diluții succesive și utilizarea aditivilor. Deși avem un rezultat pozitiv în controlul negativ de extracție nu credem că poate fi vorba de o contaminare cu ADN modern de *M. tuberculosis* din controlul pozitiv deoarece acesta a fost testat anterior și este TbD1⁺.

Analiza bioinformatică

Toate plasmidele secvențializate au fost prelucrate cu software-ul BioEdit 7.2.5. Ampliconii PCR identificați au fost comparați cu cei din GenBank (NCBI) folosindu-se opțiunea *blastn*. Atunci când nu s-a obținut niciun rezultat folosind setările automate ale *blastn*, ele au fost modificate conform descrierii de la materiale și metode. În continuare vor fi descrise analizele bioinformatică pentru fiecare amplicon PCR în parte.

Gena *pncA*

Fragmentele *pncA* obținute de la secvențializare au fost cu 10 nucleotide mai scurte decât fragmentul așteptat. Parametrii *blastn* au fost modificați, așa cum s-a descris la *Materiale și metode*, astfel încât să se conformeze unui ADN-vechi foarte degradat ca urmare a diagenzei. Primele 22 de rezultate *blastn* pot fi observate în Figura 11.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Trichoderma reesei GMDa predicted protein (TRREDRAFT_01400), partial mRNA	41.5	41.4	32%	0.67	91%	XM_006988492.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium sp. CMT 352, complete genome	40.0	40.0	47%	1.9	80%	G2001074.1
<input type="checkbox"/>	Bradyrhizobium sp. BIA1, complete genome	40.0	40.0	88%	1.9	71%	G2000454.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome	39.5	38.5	100%	5.3	70%	G2002852.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium mageritense GUS-DNA, complete genome	38.5	38.5	73%	5.3	73%	G2013283.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium tropici CMAI 899 plasmid pRHD:RI899c, complete sequence	39.5	38.5	73%	5.3	73%	G2004015.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium neoaurum IS611, complete genome	38.5	38.5	66%	5.3	73%	G2003073.1
<input type="checkbox"/>	Tuber melanosporum Ve22 hypothetical protein (M01UM_00001591001) mRNA, complete cds	33.5	38.5	36%	5.3	85%	XM_002836604.1
<input type="checkbox"/>	Actinobacteria strain DSM 43827, complete genome	39.5	38.4	62%	5.3	76%	G2001630.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome (GSI:2508) truncated pncA gene (pncA) gene, complete cds	38.5	38.5	100%	5.3	68%	G743316.1
<input type="checkbox"/>	Paenibacillus sibiricus pv. phaeosolus 1443A, complete genome	39.5	38.0	37%	5.3	84%	G2000052.1
<input type="checkbox"/>	Thurmonospora sp. NK65, complete genome	37.0	37.0	35%	1b	86%	G2000430.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone cpnAT1:anox120 CopA (copA) gene, complete cds	37.0	37.0	52%	15	76%	F0503081.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium tropici CMAI 899, complete genome	37.0	37.0	33%	15	86%	G2004015.1
<input type="checkbox"/>	Paenibacillus mendocinus H501, complete genome	37.0	37.0	26%	15	93%	G2002022.1
<input type="checkbox"/>	Bacteroides sp. CG8E1002 chromosome 2, complete sequence	37.0	37.0	32%	15	88%	G2002014.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium lotum H7001b01 gene for beta-galactosidase, complete cds, strain JCM 1254	37.0	37.0	69%	1b	73%	AF142711.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome (GSI:2508) truncated pncA gene (pncA) gene, complete sequence	37.0	37.0	100%	15	68%	E151180.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium eudimorphum Bv1103 (W38/2104), complete genome	37.0	37.0	42%	15	78%	G2001191.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium lotum H7001b01 gene for beta-galactosidase, complete cds, strain JCM 1254	37.0	37.0	66%	15	73%	G2014278.3
<input type="checkbox"/>	Chlamydomonas reinhardtii strain CC-502 cw52 mt	37.0	37.0	29%	15	90%	XM_001607625.1
<input type="checkbox"/>	Nematostella vesperis predicted protein (K6M2LUN4-1_v1029/905) partial mRNA	37.0	37.0	65%	15	73%	XM_001632357.1

Figura 11. Rezultatele obținute la blastn prin compararea secvențelor pncA F2-R2 cu secvențele din GenBank.

Deși primele rezultate nu aparțin grupului MTBC ele pot fi excluse deoarece alinierea acoperire mic . Singurele rezultate cu acoperire de 100% aparțin speciei *M. tuberculosis*, i au o identitate de 68-70% cu fragmentul omolog modern *pncA*.

Ulterior, pentru a susține încadrarea secvențelor de ADN-vechi la grupul MTBC, am desc rcat toate secvențele genei *pncA* ale genului *Mycobacterium* depuse în baza de date *Gene*. Am desc rcat atât secvențele speciilor patogene cât și a celor ambientale. Am aliniat secvențele obținute de noi, din oase, extracții sau indivizi diferiți cu cele existente în bazele de date. Pentru aliniere am folosit algoritmul ClustalW în Mega 5 (Figura 12).

Se pot observa din aliniere, trei deleții care se păstrează în dreptul situsurilor 29-31, 53-57 i 95-96. Acele deleții nu puteau apărea în diferite zone din corp și mai ales la indivii diferiți ca urmare a diagenzei pentru c acesta este un proces randomic. Dar ele ar putea fi explicate de apariția buclelor în moleculele monocatenare de ADN. Așa cum se poate observa în Figura 9, ADN-vechi extras de noi este deja foarte degradat i fragmentat. Forma cea mai stabil a ADN este aceea de dublu-helix supra-r sicut, dar în momentul fragment rii orice supra-r sucire este înl turat . Astfel, ADN este mult mai u or de denaturat (Cox i colab., 2010). Mai mult, se tie c extracția cu fenol - cloroform - alcool izoamilic este una agresiv (Ausubel i colab., 1995) iar fenolul oxidat cauzează degradarea i ruperea catenelor de ADN. De aceea am presupus c în timpul extracției s-ar putea forma monocatene de ADN, care ar putea adopta structuri secundare (Liang i colab., 2006).

Toate PCR s-au realizat cu *Taq*-polimeraza, iar o serie de articole au analizat activitatea acesteia în momentul în care întâlne te o bucl în molecula de ADN-matriță (Viguera și colab., 2001; Canceill i Ehrlich, 1996; Levinson i Gutman, 1987). S-a ar tat c polimeraza poate ignora nucleotidele implicate în formarea buclei astfel c în molecula rezultat va exista o deleție aproximativ egal cu dimensiunea buclei (Figura 13).

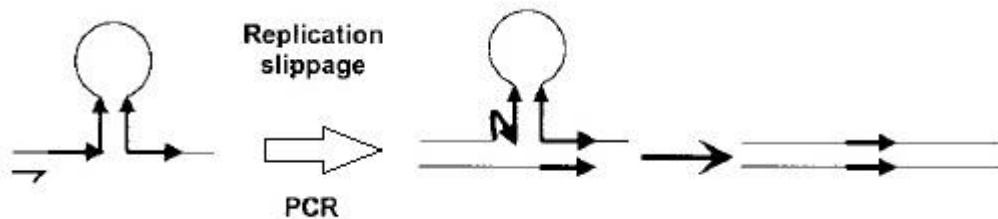


Figura 13. Reprezentarea schematică a modelului prin care *Taq*-polimeraza induce la locul de formare a unei bucle apariția unei deleții în molecula de ADN (după Viguera și colab., 2001)

Pentru a observa dacă fragmentul de 117 pb formează structuri secundare de tipul buclelor am folosit aplicația *DNA Folding Form* a *The Mfold Web Server*. S-a setat concentrația $MgCl_2$ folosit în PCR. Rezultatul modelării 2D poate fi observat în Figura 14. Se poate observa că cele trei bucle evidențiate (A, B și C) se suprapun peste cele trei deleții în alinierea multiplă din Mega 5.

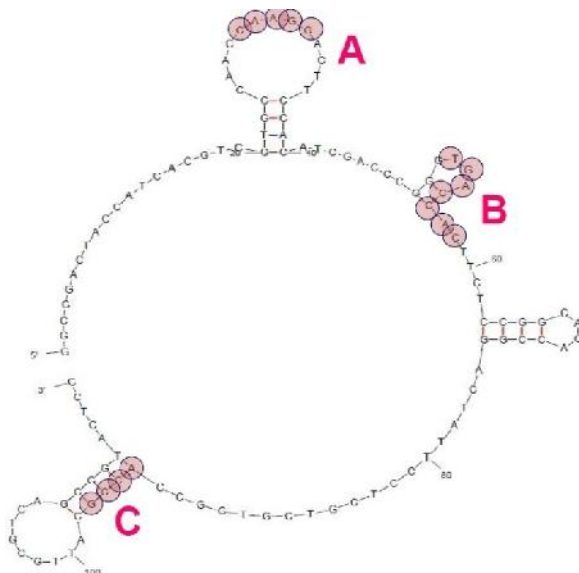


Figura 14. Modelarea 2D a fragmentului de 117 pb al genei *pncA* de la *M. tuberculosis* folosind aplicația *DNA Folding Form* a *The Mfold Web Server*.

Datorită divergenței observate în alinierea multiplă între secvențele de ADN-vechi și cele moderne, încadrarea secvențelor de ADN-vechi în MTBC are nevoie de dovezi suplimentare. Astfel s-a formulat ipoteza că dacă într-un arbore filogenetic secvențele noastre s-ar grupa cu cele ale MTBC și nu cu secvențele provenite de la specii ambientale, atunci cel mai probabil divergența este cauzată de degradarea din timpul diagenезei și nu este datorată apartenenței lor la o specie diferită.

Pentru a se afla modelul evolutiv care ar putea explica cel mai bine datele observate, am rulat în Mega 5 opțiunea *Find Best DNA/Protein Models (ML)*. S-a folosit în construcția arborelui prima opțiune raportată: Tamura 92 (Tamura 3 - parametru cu distribuție discretă Gamma) cu cel mai mic scor BIC (Bayesian Information Criterion). Un scor BIC mic implică existența unui număr scăzut de variabile explicative necesare pentru justificarea datelor obținute (Baxevanis și Ouellette, 2001).

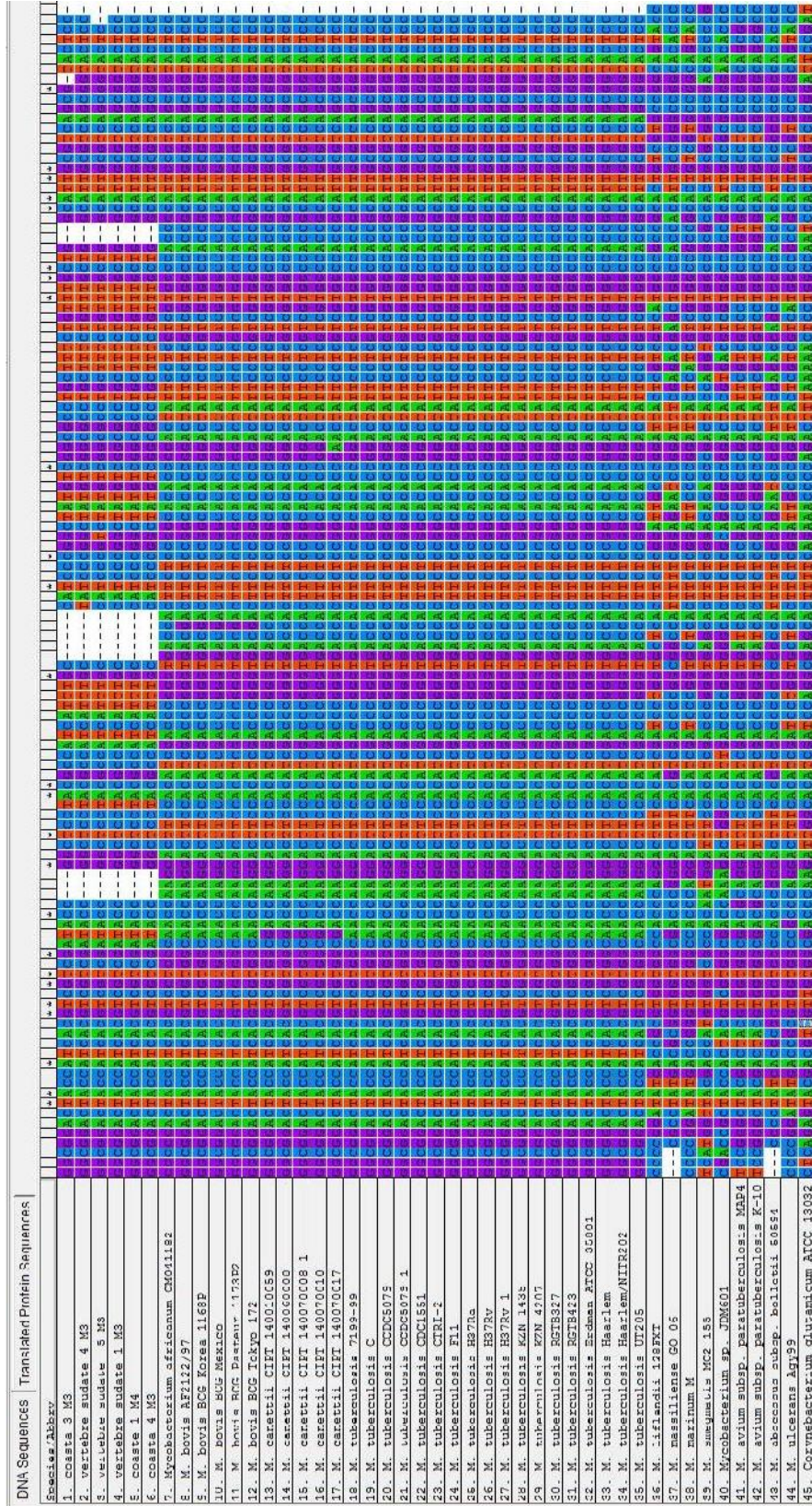


Figura 12. Alinierea multiplă a secvențelor *pncA* obținute de noi și a celor din baza de date ale genului *Mycobacterium*.

Arborele a fost realizat prin metoda Maximum Likelihood. Referitor la modul în care urmau să fie tratate cele trei deleții, am ales opțiunea Complete deletion - Gap/Missing Data Treatment. Alegerea este justificată prin faptul că am pornit de la ipoteza conform căreia delețiile sunt produsul activității *Taq*-polimerazei, și nu al evoluției sau al diagenzei.

Pentru că modificările în secvența nucleotidică (exceptând delețiile) sunt produsul degradării post-mortem a ADN, am considerat că în construcția arborelui secvențele nucleotidice ar trebui tratate ca secvențe non-codificatoare. Dacă în schimb, am fi selectat opțiunea automată - *Protein coding* - doar primele două poziții din codon ar fi fost analizate pentru a se evita influența celui de-al treilea nucleotid, care poate varia fără a influența secvența proteică. Așadar, nici în acest caz diferențele nu sunt produsul mutagenzei și al selecției naturale, ci al diagenzei.

Mai mult, porțiunea de 117 pb a genei *pncA* codifică în lanțul polipeptidic o regiune de 39 de aminoacizi înalt conservată. Lanțul polipeptidic formează un buzunar care susține un ion de Fe^{2+} prin intermediul a șapte aminoacizi: H51, H57, H71, D49, D8, C138, K96. Patru dintre aceștia sunt codificați de porțiunea amplificată de noi: D49, H51, H57, H71 (Petrella și colab., 2011). În Figura 15 se observă structura 3D a proteinei prelucrată în Rastop 2.2 astfel încât să fie evidențiat buzunarul și aminoacizii implicați în susținerea fierului.

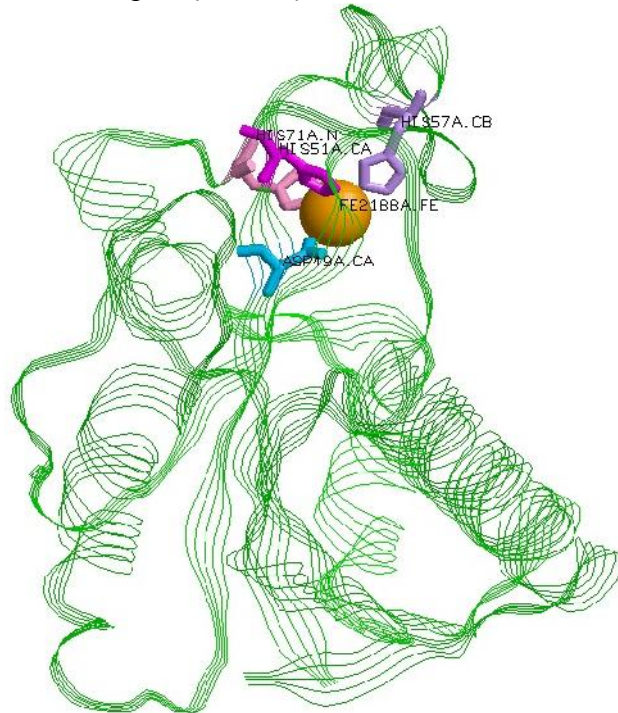


Figura 15. Structura 3D a pirazinamidazei de la *Mycobacterium tuberculosis* prelucrată în Rastop 2.2; se observă buzunarul catalitic și cei patru aminoacizi implicați în susținerea Fe^{2+} .

Histidina din poziția 57 este substituită de acidul aspartic la *M. bovis* ca urmare a unei mutații punctiforme, această specie devenind astfel rezistentă la tratamentul cu pirazinamidă. Deoarece existența acestor patru poziții este esențială pentru funcția enzimei, este puțin probabil ca modificările observate în alinierea multiplă să fi survenit în timpul evoluției.

Pentru ca relația dintre secvențele obținute de noi și secvențele moderne să fie stabilită cu o mai mare certitudine am construit un arbore filogenetic prin metoda Maximum Likelihood. Aceasta poate reconstitui relațiile filogenetice dintre taxonii analizați și oferă suport statistic

(Bootstrap sau Jack-knife) (Harrison i Langdale, 2006). Arborele rezultat pe baza alinierii din Figura 12 poate fi observat în Figura 16.

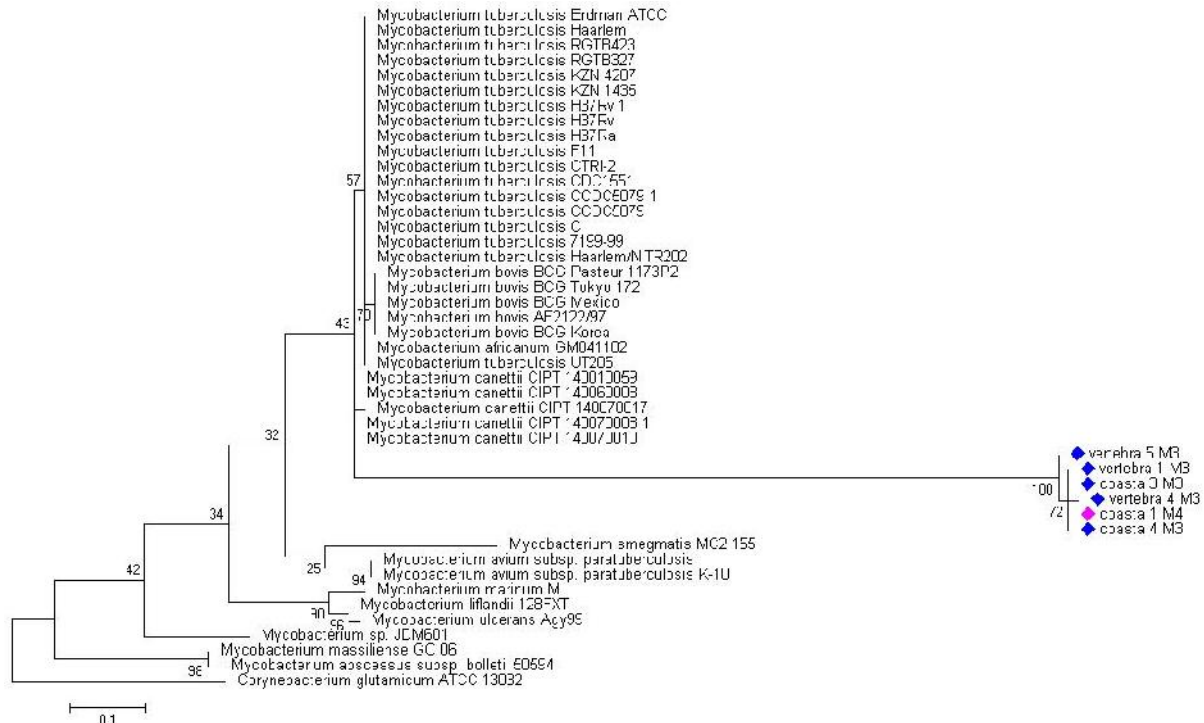


Figura 16. Arborele filogenetic realizat prin Maximul Likelihood: Bootstrap 100, modelul evolutiv Tamura 3 cu distribuție discretă Gamma, pozițiile cu gap-uri s-a eliminat din analiză.

Pentru ca arborele realizat să fie relevant s-au ales doar din alinierea multiplă o parte din secvențele amorsoare, păstrându-se secvența minimă unică de nucleotide de la capătul 3', adică 6 nucleotide. Pentru a fi siguri că topologia arborelui nu este influențată de secvențele conservate ale amorsoarelor, am păstrat de la capătul 3' doar 5 nucleotide. S-a făcut această alterare bazându-ne pe raționamentul că acele nucleotide sunt necesare pentru legarea amorsoarelor de catenă matrice pentru activitatea *Taq*-polimerazei. După cum se poate observa în Figura 16, secvențele obținute de noi sunt evidente prin romburi, culorile diferite reprezentând indivizi diferiți, iar ele formează un cluster care se păstrează în toată arborii generată (Bootstrap 100). Apoi, acest cluster este legat de un alt grup ce cuprinde secvențele *pncA* ale tuturor speciilor din MTBC, scorul Bootstrap fiind tot 43. Speciile ambientale și care cauzează boli similare tuberculozei la animale, formează un grup separat, în care majoritatea valorilor Bootstrap sunt reduse, deci cu o stabilitate mai scăzută. Ca și secvență outgroup am ales fragmentul omolog *pncA* de la *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Pentru a echilibra diferențele observate în lungimea ramurilor am încercat să utilizăm un cluster de secvențe outgroup, format din mai multe fragmente *pncA* ale genului *Corynebacterium*. Rezultatele nu au fost satisfăcătoare, obținându-se un arbore cu valori Bootstrap scăzute. Acest aspect nu este surprinzător deoarece nu ne putem aștepta ca rata evolutivă să fie aceeași în două grupuri taxonomice diferite, chiar dacă genurile sunt înrudite (Luo și colab., 2010). Aadar, gruparea secvențelor de ADN-vechi cu MTBC este susținută statistic și putem concluziona că divergența observată se datorează diagenezei și nu unei amplificări PCR nespecifice.

CONCLUZII

Rezultatele analizei antropologice au indicat posibilitatea ca indivizii M3 și M4 din necropola de la Ghereni să fi fost afectați de boala lui Pott. Am încercat confirmarea acestui diagnostic utilizând tehnici fizice (FT-IR) și de biologie moleculară. Astfel, în spectrele FT-IR au fost identificate peak-uri asociate acizilor micolici dar s-au determinat și modificări ale indicilor de cristalinitate și a rapoartelor C/P specifice tuberculozei.

Am reușit amplificarea prin PCR a secvențelor *pncA* din ambii indivizi și secvențializarea acestora, iar analizele bioinformatică ne-au ajutat să încadrăm secvențele în MTBC, chiar dacă ADN-vechi a suferit schimbări datorate diagenezei.

Mai mult, au fost obținute secvențele ale pseudogenei *oxyR* cu similaritate de 99-100% cu secvențele omoloage moderne. Deoarece controlul negativ de PCR este curat, posibilitatea contaminării cu ADN modern este înlăturată.

În continuare se dorește obținerea secvențelor TbD1 externe și interne.

Studiul III.

Diversitatea genetică reflectată de analiza regiunii de control mitocondriale la o populație de secol X din Capidava (Constanța, România)

Antropologia fizică

Înainte de efectuarea analizelor moleculare, s-a realizat o analiză osteologică a scheletelor provenite din necropola de la Capidava pentru a evalua starea de reprezentare și conservare a oaselor, pentru a identifica sexul indivizilor și pentru a estima vârsta la care aceștia au decedat. Pentru determinarea acestor caracteristici s-au utilizat protocoalele descrise în *Standards for data collection from human skeletal remains* (Buikstra și Ubelaker, 1994).

Sexul indivizilor a fost atribuit pe baza trăsăturilor morfologice de la nivelul craniului (marginea supraorbitală, glabella, mental) și de la nivelul pelvisului (concavitatea subpubică, arcul ventral, incizura sciatică, sulcusul preauricular). Pentru fiecare din aceste trăsături s-a atribuit un anumit scor, conform protocolului standard, care reflectă gradul de siguranță cu care a fost identificat sexul. În cazul indivizilor subadulți, sexul nu a putut fi determinat pe baza analizelor de antropologie fizică, deoarece, fiind încă în curs de dezvoltare la momentul morții, resturile osoase nu prezintă trăsăturile specifice unui anumit sex.

Pentru estimarea vârstei la momentul morții au fost examinați mai mulți markeri osteologici printre care sinostoza suturilor craniene, simfiza pubică, suprafața auriculară a iliumului și capetele sternale ale coastelor. Pentru stabilirea vârstei subadulților s-a folosit un set diferit de criterii. Acestea au inclus caracterizarea stadiului de dezvoltare al danturii precum și măsurători ale oaselor realizate cu ublerul electronic, fie cu placa osteometrică.

În plus, a fost examinat gradul de artroză al articulațiilor pentru a aprecia dacă individual folosea frecvent anumite părți ale corpului în activitățile sale fizice, fapt ce poate reflecta stilul de viață. Informațiile legate de nutriție care ilustrează condiția socială pot fi deduse prin evaluarea stării de afectare a dinților, o altă caracteristică analizată. În același timp a fost urmărită eventuala apariție a unor stări patologice speciale cum ar fi tuberculoza sau sifilisul, precum și prezența traumelor care indică starea de sănătate a indivizilor și uneori posibila cauză a morții.

Prevenirea contaminării și autentificarea rezultatelor

Pe lângă degradarea moleculară, studiile de ADN se confruntă cu o altă dificultate majoră. Din moment ce ADN-ul modern uman și microbial este ubicuitar, riscul contaminării cu ADN exogen apare în fiecare etapă a procesului probelor de ADN vechi. Astfel, pentru a evita contaminarea în laborator au fost urmate regulile și protocoale stricte (Yang și Watt, 2005).

Extracția ADN-ului și amplificarea PCR au fost realizate în laboratoare separate fizic, destinate doar pentru lucrul cu probe de ADN vechi. În aceste încăperi au fost montate filtre de aer dotate cu lampi UV care au fost utilizate înainte de începerea fiecărui proces pentru menținerea unui mediu de lucru steril. Toată aparatura, suprafețele de lucru, precum și ustensilele din laborator au fost curățate în mod regulat cu Clorox ultra-pur și etanol 70%, iar apoi iradiate cu UV. Tot personalul care a intrat în laborator a purtat combinezon, mască, încălțăminte de protecție și mănuși de unic folosință pentru a minimizea, pe cât posibil, riscul de contaminare.

Din același motiv, persoanele care au lucrat într-o anumită zi cu probe moderne nu au avut acces în ziua respectivă în laboratoarele de ADN vechi.

Totodată, fiecare intrare în laborator a fost realizată conform unui program bine-organizat și a fost manipulată o probă de la un singur individ o dată. Pentru fiecare extracție au fost colectate sistematic blank-uri de control, iar pentru fiecare amplificare enzimatică au fost rulate controale negative de PCR pentru a monitoriza o posibilă contaminare a substanțelor folosite. De asemenea, pentru a detecta contaminarea cu ADN modern provenit de la personalul care are acces în aceste laboratoare, rezultatele obținute au fost comparate cu o bază de date ce conține secvențele genetice de interes ale cercetătorilor din instituție (Sampietro et al. 2006).

Din cauza faptului că, în ciuda respectării tuturor acestor măsuri de precauție, existau șansa de contaminare în laborator, se recomandă replicarea independentă a analizelor într-un laborator separat de ADN vechi (Gilbert et al. 2005; Pääbo et al. 2004; Willerslev and Cooper 2005). În acest context, pentru fiecare schelet analizat în acest studiu, au fost trimise cel puțin câte un dinte întreg, fără carii sau fisuri la un laborator de ADN vechi din Spania cu scopul de a autentifica rezultatele obținute.

Pregătirea probelor și extracția ADN

Extracția ADN-ului din probele osteologice a fost realizată prin două metode diferite, ambele frecvent utilizate în astfel de studii. Una dintre ele este extracția cu fenol-cloroform (Hervella et al. 2012), iar cealaltă metodă implică utilizarea unor coloane cu silica (Anderung et al., 2008; Yang et al., 1998). Extracția ADN a folosit ca și sursă atât oase cât și dinți, în cazurile în care acestea au fost găsite intacte. Au fost alese ca probe pentru acest proces cele mai bine conservate oase, mai exact diafiza humerusului pentru 4 dintre indivizi: M1, M3, M4, M5. Extracția din dinți a fost efectuată pentru 3 dintre indivizi: M4, M5, M8.

Pentru eliminarea contaminanților din sol, acesta a fost curățat mai întâi suprafața osului/dintelui cu Cl 10% și apoi ultra-pur. Apoi, întreaga suprafață a osului, respectiv a dintelui a fost iradiat UV în UVilink crosslinker (Uvitec Cambridge) pentru a reduce riscul de contaminare cu ADN exogen. Din același motiv, în cazul probelor reprezentate de piese osoase au fost înălțurați 1-2 mm din partea externă a osului, cu micromotorul dentar. Ulterior, cu ajutorul acestui instrument a fost obținută pulberea osoasă în cantitatea necesară extracției. În cazul utilizării dinților, a fost deschisă camera pulpară și recoltat sub formă de pulbere tot conținutul. Burghierea electrică a fost realizată la viteză mică pentru prevenirea distrugerii ADN-ului datorită încălzirii excesive (Adler et al., 2011). O singură probă provenind de la un anumit individ plus un control de extracție au fost prelucrate în același timp (nu au fost prelucrate concomitent probe de la indivizi diferiți).

Pentru extracția cu fenol-cloroform au fost utilizate 20 mg de esut osos sub formă de pulbere. Acesta a fost incubat peste noapte la 56°C în soluție de decalcifiere ce conține: 0.5 M EDTA pH 8.0-8.5, 0.5% SDS, 50mM TrisHCl pH 8.0 și 1 mg/ml Proteinază K (Ginther et al., 1992; Hagelberg și Clegg, 1991). Soluția a fost apoi centrifugată, iar ADN-ul a fost extras din supernatant, urmând protocolul de extracție cu fenol-cloroform (Hervella et al., 2012). Au fost efectuate două extracții succesive cu un volum egal de 25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (Calbiochem), urmate de adăugarea cloroformului la faza apoasă pentru a înălțura urmele de fenol. Ulterior, ADN-ul a fost precipitat folosind două volume de etanol absolut (1 ml etanol absolut la 500 ml supernatant) și 1/10 volum de acetat de sodiu 3 M. Prin centrifugare, a fost obținut un pellet de ADN care a fost spălat de 2 ori cu 1 ml de etanol 80%, apoi acesta a fost

uscat la 56°C timp de 10 minute și resuspendat într-un mililitru de apă PCR Grade. ADN-ul a fost purificat și concentrat prin trecerea soluției prin centricoane de tipul Amicon Ultra - 0.5 mL 30K Centrifugal Filters (Merck Millipore) (obținându-se 50-70ul soluție finală). ADN-ul eluat a fost stocat în alicote de 20 μl la o temperatură de -20°C pentru o scurtă perioadă de timp, astfel încât să nu se degradeze până la efectuarea amplificării.

Probele reprezentate de dinți au fost supuse extracției printr-o metodă simplă și eficientă, ce nu implică folosirea solvenților organici. Metoda presupune purificarea și concentrarea ADN-ului din probe osteologice antice prin intermediul unor coloane cu silica (QIAquick, QIAGEN) (Anderung et al., 2008; Yang et al., 1998). Aceasta a fost adaptată la condițiile și aparatura disponibilă în laborator. Digestia pulberii obținute din dinți a fost realizată prin adăugarea a 100 μl Proteinase K (20 mg/ml) și a unui tampon de extracție alcătuit din 0,5 M EDTA pH 8 și 5% SDS. Amestecul a fost păstrat la 55°C peste noapte, iar apoi la 37°C timp de 24 de ore. După ce amestecul a fost centrifugat, supernatantul a fost preluat și împărțit în alicote de 250 μl, în tuburi de 2 ml. Peste acestea au fost adăugate 5 volume de PB Buffer (1250 μl) și amestecat. Ulterior, câte 750 μl din soluție au fost încercate succesiv pe coloană și centrifugate 1 minut la 12400 g. La terminarea amestecului, ADN-ul legat de particulele de silica a fost spălat prin adăugarea a 750 μl PE Buffer, iar apoi a fost eluat în 100 μl Elution Buffer.

Amplificarea PCR și electroforeza

Strategia de amplificare a secvențelor ADN de interes a fost bazată pe utilizarea unor seturi de amorse proiectate pentru amplificarea unor fragmente nucleotidice scurte, care tind să fie mai numeroase chiar și în probele arheologice degradate (Gabriel et al. 2001; Pääbo et al. 2004). În acest mod, există mai multe șanse de a produce copii suficiente de secvențe autentice. Pentru fiecare specimen, secvențele din regiunea hipervariabilă I (HVR-I) și regiunea hipervariabilă II (HVR-II) ale genomului mitocondrial au fost determinate prin amplificarea a 8 segmente care se suprapun pe întreaga regiune hipervariabilă. Dimensiunea acestor segmente este cuprinsă între 126 de perechi de baze și 170 de perechi de baze (Gabriel et al. 2001) (Tabelul 1).

Tabelul 1. Design-ul amorselor pentru amplificarea HVR-I și HVR-II (Gabriel et al. 2001)

Fragm. amplificat	Dimensiunea ampliconului (pb)	Secvența amorsei	Intervalul secvenței informative ADN	Temp. de aliniere
HVR-I A	170	F: 5'-CCC AAA GCT AAG ATT CTA AT-3' R: 5'-TAC TAC AGG TGG TCA AGT AT-3'	16009-16138	50
HVR-I B	126	F: 5'-CAC CAT GAA TAT TGT ACG GT-3' R: 5'-TGT GTG ATA GTT GAG GGT TG-3'	16132-16217	50
HVR-I C	133	F: 5'-CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT-3' R: 5'-TGG CTT TAT GTA CTA TGT AC-3'	16210-16302	46

HVR-I D	143	F: 5'-CAC TAG GAT ACC AAC AAA CC-3' R: 5'-GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC-3'	16288–6390	48
HVR-II A	126	F: 5'-GGG AGC TCT CCA TGC ATT TGG TA-3' R: 5'-AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGA ATC-3'	57–135	54
HVR-II B	132	F: 5'-GCA CCC TAT GTC GCA GTA TCT GTC-3' R: 5'-TAT TAT TAT GTC CTA CAA GCA-3'	133–219	46
HVR-II C	142	F: 5'-CTA TTA TTT ATC GCA CCT-3' R: 5'-ATT TTT TGT TAT GAT GTC T-3'	169–273	46
HVR-II D	158	F: 5'-TGC TTG TAG GAC ATA ATA AT-3' R: 5'-GTG TTA GGG TTC TTT GTT TT-3'	240–357	47

Au fost utilizate mai multe tipuri de ADN polimeraz , disponibile comercial, printre care MangoTaqTM (Bioline), MyTaqTM (Bioline), Platinum[®]Taq (Invitrogen). Fiecare reac ie PCR a fost optimizat prin varia ia concentra iilor substan elor folosite pentru amplificare, în func ie de calitatea i cantitatea de ADN extras . În majoritatea cazurilor, ADN polimeraza MangoTaqTM (Bioline) s-a dovedit a fi cea mai eficient pentru amplificarea secven elor degradate de ADNvechi. S-au ob inut rezultate constante atunci când urm torul design de PCR a fost folosit pentru o reac ie de 25 µl: 5 µl tampon de reac ie colorat MangoTaq, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM fiecare dNTP, 0.5 µM fiecare amors , 1.25 unit i de MangoTaqTM polimeraz i, de obicei, 2 µl de ADN matri . Pentru a dep i dificult ile întâmpinate la amplificare, datorit prezen ei urmelor de fenol i ai inhibitorilor PCR în ADN-ul extras conform protocolului cu fenol-cloroform, acesta a fost, de regul , diluat de cel pu în 5 ori înainte folosirii pentru amplificare. Programul de PCR standard folosit a presupus: denaturarea ini ial 95°C 5 min, urmat de 35 de cicluri: 95°C 30 sec, 46-50°C (în func ie de amorse), 72°C 30 sec i elongarea final 72°C timp de 5 min. Monitorizarea unei posibile contamin ri a reactivilor folosi i s-a realizat prin ad ugarea controalelor negative de PCR.

La finalul PCR-urilor s-a verificat faptul c au fost amplificate fragmentele de interes prin intermediul electroforezei în gel de agaroz . Aceast metod analitic presupune separarea moleculelor de acizi nucleici care migreaz în câmp electric în func ie de dimensiunea pe care o au. Astfel, cunoscând dimensiunea ampliconului, în urma migr rii sale într-un gel de agaroz colorat cu bromur de etidiu, se poate vizualiza la UV prezen a ADN-ului de m rimea a teptat . Un exemplu în acest sens se regase te în figura 4 care ilustreaz amplificarea segmentelor HVR-I A i HVR-I B de la individual M4, vizualizat în gel de agaroz (Fig. 1).

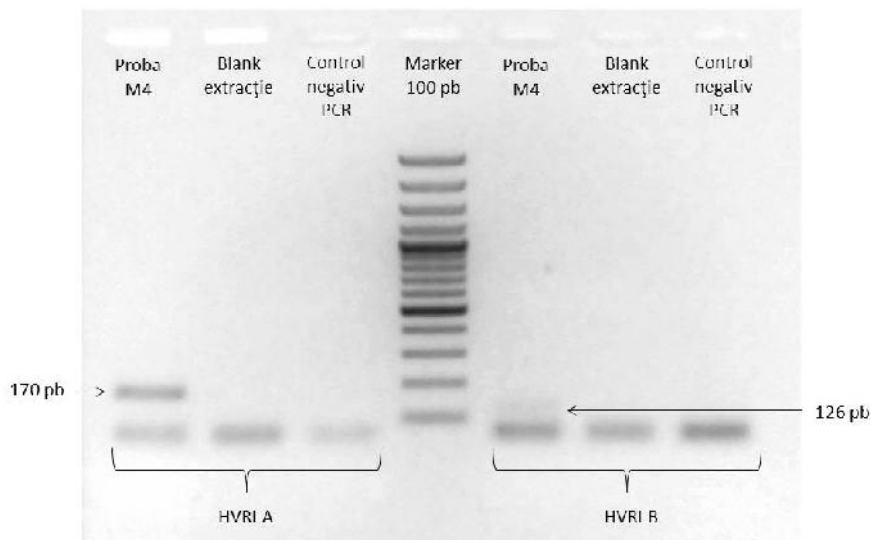


Fig. 1. Electroforeza în gel de agaroz

Segmentele de ADN de interes obținute în gel au fost purificate, în vedea clonării lor. În acest scop s-au utilizat kit-uri speciale pentru purificare din gel (FavorPrep™ GEL Purification Kit, Favorgen Biotech Corp) și s-a respectat protocolul disponibil în kit. În situațiile în care s-a remarcat prezența amplificării în controlul de extracție, acesta a fost de asemenea purificat pentru a identifica sursa de contaminare. Totodată, atunci când au apărut amplificări în controlul negativ de PCR, probele nu au fost purificate. În schimb a fost repetat acel pas, utilizând alioate noi de reactivi ne-contaminați.

Clonare și secvențializare

Înainte de secvențializare, produsele PCR purificate au fost clonate (CloneJet PCR Cloning Kit, Thermo Scientific), ceea ce permite, ulterior, realizarea distincției dintre mutațiile autentice specifice fiecărui individ și greșelile induse de alterarea post-mortem a integrității moleculelor de ADN. Având în vedere faptul că produsele PCR au avut capete coezive 3'-dA generate de Mango Taq polimeraza s-a urmat protocolul de clonare din kit, specific pentru îndepărtarea acestor capete (Sticky-End Cloning Protocol), înainte de ligare. Bacteriile competente DH5 alpha, una din cele mai frecvent utilizate tulpini de *E. coli*, în clonarea de rutină, au fost transformate cu produsele de ligare, iar apoi depuse pe plăci de cultură. Doar clonele recombinante care conțin insertul au crescut pe plăci, datorită proprietății vectorului pJET1.2/blunt de a exprima o enzimă de restricție letală dacă se recircularizează după transformare. Câte 6 colonii izolate de pe fiecare placă au fost folosite pentru precultiuri.

După ce bacteriile au crescut timp de aproximativ 15 ore la 37°C cu agitare, ADN-ul plasmidic a fost purificat conform instrucțiunilor din kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Cantitatea și puritatea ADN-ului plasmidic obținut au fost determinate spectrofotometric. Totodată, pentru a certifica prezența insertului de dimensiunea așteptată, a fost

realizat digestia probelor cu enzima de restricție *Bgl* II (Thermo Scientific) conform recomandărilor și au fost vizualizate pe gel de agaroz.

Un minim de 5 clone care au conținut inseratul au fost secvențializate (Macrogen, Korea), folosind amorsa standard pJET1.2 R. Secvențele care au rezultat au fost aliniate cu ajutorul programului BioEdit și comparate cu secvența ADNmt de referință (revised Cambridge Reference Sequence; Andrews et al. 1999). De asemenea, rezultatele obținute au fost comparate atât cu secvențele provenite de la personalul implicat în acest studiu, pentru a elimina posibilitatea contaminării, cât și cu secvențele regăsite în bazele de date.

Rezultate și discuții

Antropologie fizic

Analizele de antropologie fizică efectuate pe cele 9 schelete recuperate din necropola de la Capidava au pus în evidență faptul că 3 dintre ele apar în unor femei (M1, M3, M8), unul este al unui individ de sex masculin (M4), iar restul apar în unor indivizi subadulți (M2, M5, M6, M9, M10) al căror sex nu a putut fi determinat prin metode de antropologie fizică. În cazul adulților a fost remarcat prezența a mai mult de 75% din schelet ceea ce semnifică o reprezentare foarte bună. În același timp, aceste schelete sunt foarte bine conservate, fiind alterat mai puțin de 25% din suprafața osoasă sub acțiunea solului. Nu se poate spune același lucru despre gradul de reprezentare și conservare a scheletelor indivizilor subadulți. În afara resturilor osoase ale individului M10 care sunt reprezentate și conservate moderat, celelalte schelete sunt slab păstrate.

Pe baza markerilor osteologici analizați, a fost estimată vârsta la momentul morții pentru individual M1, de sex feminin, între 38-48 de ani. Nu au fost identificate patologii speciale, dar a fost observat existența unei fracturi oblice vindecate la nivelul humerusului stâng, în zona diafizei proximale. Celei de-a doua femei (M3) i s-a atribuit o vârstă cuprinsă între 43-56 de ani, iar pentru cea de-a treia femeie (M8) s-a stabilit vârsta în intervalul 20-24 de ani. În cazul individului M8 s-a identificat o traumă la nivel cranian, parietal stâng. Cel mai probabil aceasta este datorată unei lovituri antemortem cu un obiect contondent. De asemenea, a fost remarcat existența unei fracturi oblice la nivelul unei coaste de pe partea stângă, vindecată, fără urme de infecție. Vârsta pentru individul M4 a fost aproximată în intervalul 33-43 de ani și s-a constatat că dantura sa a fost păstrată intactă, într-o stare foarte bună, fără carii sau abcese, fapt ce reflectă o stare de sănătate relativ bună. Scheletele M2 și M5 apar în unor indivizi tineri, preadulți cu vârsta cuprinsă între 9-12 ani. Cu toate că resturile osoase ale indivizilor M6, M9 și M10 sunt puternic alterate, a putut fi determinată vârsta lor pe baza erupției dentare și a lungimii oaselor. Astfel, M6 este cel mai tânăr individ, având 38-40 săptămâni prenatal, M8 0-2 luni postnatal, iar M9 2,6-4 ani.

Analiza molecular

Dintre cei 9 indivizi ale căror rămășițe osoase au fost recuperate din situl arheologic Capidava au fost analizați prin metode moleculare doar 5 dintre aceștia. Au fost analizați mai întâi adulții (M1, M3, M4, M8), deoarece piesele osoase sunt bine păstrate, fapt ce permite extragerea ADN-ului. Prezența dinților intacti, fără carii sau fisuri, care pot fi folosiți pentru extracția ADN reprezintă un motiv suplimentar pentru alegerea acestora. Spre deosebire de adulți,

scheletele indivizilor tineri sunt slab conservate, iar dinii permanenți au rădăcinile deschise, fiind în curs de dezvoltare, fapt ce ridică dificultăți în analiza secvențelor de ADN provenite din astfel de probe, datorită riscului crescut de contaminare cu ADN exogen. Totuși, a fost efectuată analiza de genetică moleculară pentru subadultul M5 care prezintă un interes deosebit, deoarece a fost găsit în vecinătatea mormintelor M3 și M4, iar o astfel de analiză poate reliefa o eventuală relație de rudenie între acești indivizi.

Rezultate obținute prin extracția ADN cu fenol-cloroform (M1, M3, M4, M5)

Extracția ADN a fost realizată prin două modalități distincte, una bazată pe fenol-cloroform, iar cealaltă prin intermediul coloanelor cu silica. Pentru extracția cu fenol-cloroform s-a prelevat pulbere osoasă de la indivizii M1, M3, M4 și M5. Cantitatea și calitatea ADN-ului, astfel obținut au permis doar amplificarea celor 4 segmente din regiunea hipervariabilă I (HVR-I) a genomului mitocondrial. Având în vedere faptul că s-a remarcat prezența urmelor de fenol în ADN-ul extras, precum și a anumitor inhibitori de PCR cum ar fi acizii humici, fiecare amplificare enzimatică a fost optimizată și s-au testat diferite concentrații de ADN matri în amestecul de PCR. Din această cauză, ADN-ul rezultat în urma unei extracții unice nu a fost suficient pentru obținerea rezultatelor pentru cel de-al doilea segment hipervariabil din regiunea de control.

Primul dintre indivizii analizați este M3. Pentru 3 din 4 fragmente clonate și secvențializate, blank-urile de extracție au fost curate, adică nu au rezultat amplificări, fragmentul HVR-I D fiind singurul care a prezentat amplificare în blank, cel mai probabil datorită unei erori de manipulare. Secvențele obținute au fost comparate cu secvența de referință (rCRS) pentru a identifica mutațiile specifice acestui individ. A fost evidențiată o tranziție C-T în poziția 16069 în toate clonele analizate. Pe lângă aceasta au fost identificate încă 2 polimorfisme în pozițiile 16111T și 16126C. Interesant este faptul că în secvențele în care s-a regăsit una dintre aceste mutații (de exemplu 16111T) nu a fost prezent cealaltă (16126C), fapt ce indică cel mai probabil existența a două surse de ADN. De asemenea, s-a constatat prezența unor mutații punctiforme, caracteristice moleculelor vechi de ADN care sunt supuse degradării post-mortem. Acestea sunt mult mai frecvente în acele secvențe care conțin substituția 16111 C-T, ceea ce sugerează că acestea provin de la individul M1. Această idee este susținută prin faptul că mutația 16111T apare pentru prima dată în setul de analize efectuate în laboratorul nostru. Cu toate acestea, rezultatele pentru M1 trebuie autentificate prin replicarea analizelor și investigarea mutațiilor din HVR-II care să confirme încadrarea într-un anumit haplogrup.

În secvențele obținute de la individul M1 nu s-au semnalat diferențe față de rCRS, ceea ce implică încadrarea acestuia în haplogrupul european H2a2. Pentru certificarea acestei încadrări se vor analiza și secvențele pentru HVR-II, precum și un segment nucleotidic care să includă poziția 7028, poziție definitorie pentru încadrarea în haplogrupul H (Dissing et al., 2007).

În cazul indivizilor M4 și M5 s-au obținut două seturi de rezultate, primul în urma analizei ADN-ului extras cu fenol-cloroform. Deși au fost obținuți produși de amplificare pentru HVR-I, rezultatele de la secvențializarea clonelor sunt inconclusive. Unul dintre factorii care a contribuit la acest aspect este cel mai probabil conservarea slabă a ADN-ului în rămișoarele osoase. Este bine cunoscut faptul că gradul de păstrare al moleculelor de ADN este influențat de factorii de mediu și s-a observat că acesta poate varia chiar în rândul specimenelor excavate din același

complex arheologic (Burger et al. 1999). Din acest motiv analizele au fost repetate, folosind dinii biradiculari (premolari) ca sursă de ADN.

Rezultate obținute pentru extracția ADN cu coloane silica (M4, M5, M8)

Inițial, s-a încercat extracția ADN-ului prin această metodă din os, dar metoda s-a dovedit a fi ineficientă, iar ca urmare, s-au utilizat dinii foarte bine conservați ca sursă de ADN. În acest mod, s-a reușit recuperarea unei cantități suficiente de ADN pentru amplificarea tuturor celor opt segmente care cuprind cele două regiuni hipervariabile ale genomului mitocondrial. Totodată, prin folosirea coloanelor cu silica la extracția ADN s-au eliminat dificultățile întâmpinate la amplificarea enzimatică din cauza prezenței urmelor unor solvenți organici. În plus, nu au rezultat amplificări în probele de control folosite la extracție, fapt ce indică absența unei contaminări cu ADN exogen sau chiar cu ADN din probă în timpul manipulării lor. De asemenea, toate controalele negative de PCR au fost curate. Secvențele nucleotidice pentru fiecare segment amplificat au nucleotide încorporate greșit (Fig. 2) ceea ce sugerează că acestea provin de la specimene antice care au fost supuse degradării post-mortem. Toate aceste aspecte cresc gradul de siguranță ce reflectă autenticitatea rezultatelor.

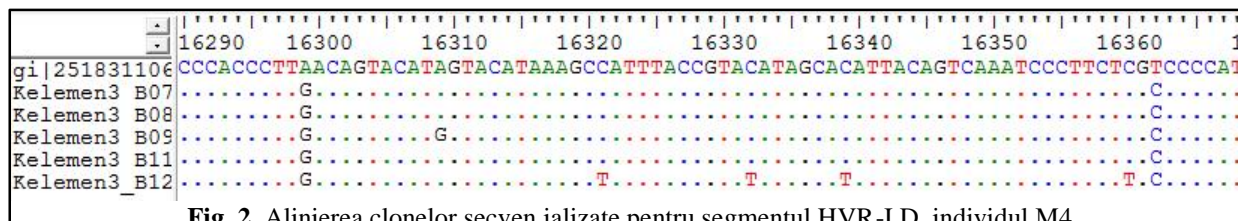


Fig. 2. Alinierea clonelor secvențializate pentru segmentul HVR-I D, individul M4

Pentru fiecare dintre cei trei indivizi, M4, M5 și M8 s-au analizat câte șase clone. În secvențele pentru HVR-I provenite de la individul M4 s-au identificat 4 mutații ce apar în toate clonele analizate, după cum urmează: 16126C, 16278T, 16299G, 16362C. Pe baza acestor mutații, individul M4 poate fi încadrat în haplogrupul R0a2i cu o probabilitate de 80.2% conform aplicației on-line de atribuire a haplogrupului, cunoscut sub numele de Haplogrep (<http://haplogrep.uibk.ac.at/about.html>). Dintre acestea, 16278T este substituția definitorie pentru încadrarea în haplogrup, iar 16299G este considerat o mutație locală privată. În regiunea HVR-II s-au identificat 6 puncte de divergență comparativ cu rCRS: 39T, 58C, 60.1T, 64T, 263G și 315.1C. Aceste puncte de diagnostic confirmă încadrarea secvențelor de ADN mitocondrial ale individului M4 în haplogrupul R0a2i. Dintre mutațiile regsite în semnătura genetică a lui M4, 16126C este singura care a fost identificată în probele de ADN modern analizate în laborator, dar ea a apărut întotdeauna în conjuncție cu 16069T și conduce spre clasificarea într-un haplogrup distinct, și anume J. Acest fapt conferă un plus de încredere rezultatelor obținute.

Datele de secvențializare ale individului M8 conțin motivele nucleotidice caracteristice haplogrupului U3a. Pe intervalul investigat (15989-16410, 34-377) din regiunea de control s-au evidențiat 7 mutații, după cum urmează: 16343G, 16390A, 39T, 73G, 150T, 263G și 315.1C. Primele 6 dintre acestea fac posibilă încadrarea cu o siguranță de 100% în haplogrupul U3a, iar inserția din poziția 315 este considerat un hot-spot mutațional (<http://haplogrep.uibk.ac.at/about.html>). Acest tipar genetic a fost comparat cu o bază de date conținând informații genetice mitocondriale a tuturor cercetătorilor implicați în acest studiu,

precum și cu probele moderne analizate în laborator și nu s-au descoperit similarități, fapt ce sporește încrederea în rezultatele obținute.

Sucesiunea nucleotidică care include HVR-I și HVR-II de la individul M1 conține variații specifice (16261T, 263G) haplogrupului H7a1. Gradul de încredere al acestei încadrări este 58,7% conform HaploGrep, din pricina faptului că restul mutațiilor care îl definesc se află în afara regiunii examinate. Drept consecință, pentru confirmarea acestei ipoteze se vor analiza SNPs definitorii cuprinse în regiunea codificatoare a genomului mitocondrial. Modificarea din poziția 16261 a fost întâlnită într-o singură probă de ADN modern, dar asociată cu alte câteva mutații care contribuie la un diagnostic diferit al haplogrupului, ceea ce exclude o posibilă contaminare a probei M5.

Informațiile oferite de aceste rezultate preliminare subliniază că indivizii analizați poartă semne genetice distincte. Fiind clasificați în haplogrupuri diferite, pe baza variației în cadrul secvențelor nucleotidice, este sugerată absența unor relații de rudenie pe linie maternă între indivizii analizați. Totuși, alte legături de tip familial, cum ar fi cel de soț-soție, nu pot fi excluse. Aceste aspecte au o importanță deosebită pentru înțelegerea organizării sociale a populației medievale de la Capidava. Contextul arheologic și distribuția mormintelor în situl arheologic reflectă ipoteza existenței a două grupuri sociale distincte. Unul dintre ele cuprinde indivizii M3 și M4, singurii care au avut inventar funerar. Descoperirea mormântului subadultului M5 în vecinătatea acestor adulți, conduce spre ideea existenței unui ansamblu de tip familial. Datele moleculare actuale aduc informații suplimentare în acest sens, prin eliminarea ipotezei prezenței unor legături maternale între acești indivizi.

Compararea datelor cu ADN-ul populațiilor moderne

Clasificarea variației ADN-ului uman mitocondrial în grupuri genealogice care au un ancestor matern comun este utilizată în studiile de genetica populațiilor pentru urmărirea migrațiilor populaționale majore din trecutul istoric. Aceste informații sunt deduse prin compararea distanțelor genetice observate cu cele din rândul populațiilor moderne, precum și cu cele ilustrate în alte studii de ADN vechi.

Haplogrupul mitocondrial U3a din care face parte individul M8 reprezintă o ramură a haplogrupului major U și se deosebește de U3b prin prezența unei mutații specifice (16390A) întâlnită în regiunea HVR-I (Achilli et al., 2005). Prezența acestui haplogrup a fost detectată în

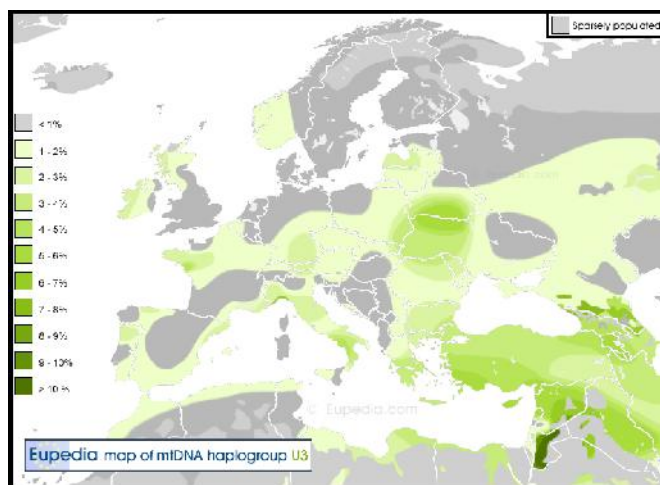


Fig. 3. Distribuția haplogrupului mitocondrial U3 în Europa, Orientul Apropiat și Nordul Africii (http://www.eupedia.com/europe/maps_mtdna_haplogroups.shtml#U3)

numeroase popula ii actuale din Europa i vestul Asiei, cele mai ridicate frecven e fiind întâlnite în rile din preajma M rii Negre (Bulgaria, Georgia) i Caucaz (iranieni, armeni, avari, turci), dup cum se poate observa i în imaginea de mai jos (Fig. 3).

De asemenea, frecven e mari ale acestui haplogrup s-au distins în popula ii actuale de romi, ai c ror str mo i au migrat prin teritoriul Armeniei i al Imperiul Bizantin în ruta lor spre Europa (Malyarchuk et al., 2006). Mai mult, o frecven sporit a acestui haplogrup mitocondrial a fost remarcat pe teritoriul României, mai exact în cadrul unor indivizi de etnie român din Ploie ti (Bosch et al., 2006). Studiul rela iilor genetice pe linie matern ce privesc leg turile dintre popula iile evreie ti subliniaz , de asemenea, existen a grupului genealogic U3a în rândul acestora (Behar et al., 2008). Datele arheologice legate de popula ia medieval de la Capidava, sugereaz c probabilitatea ca această popula ie s aib vreo conexiune cu cele evreie ti este extrem de mic , din moment ce indivizii au fost înmormânta i dup un ritual cre tin. Considerând contribu ia haplogrupului U3a la fondul genetic actual se poate deduce faptul c acesta a avut un rol în istoria popula iilor str vechi, marcând numeroase valuri de migra ie din diferite perioade. Zona Caucazian , situat între Levant i Europa, poate fi considerat una dintre poten ialele rute de colonizare a Europei de c tre omul modern (Schönberg et al., 2011). De asemenea, este foarte posibil ca dispersia major din regiunea Caucaz înspre Europa de-a lungul bazinului Dun rii s se fi realizat în timpul exapnsiunii neolitice, de i diversitatea genetic curent este influen at i de amestecul ulterior al popula iilor (Quintana-Murci et al., 2004).

Analiza haplotipurilor mitocondriale umane din cadrul popula iilor moderne ilustreaz frecven e ridicate pentru haplogrupul vest Eurasiatic, R0a, în numeroase din regiunile geografice în care s-a remarcat o frecven crescut a haplogrupului U3a. Acest fapt este eviden iat în cele dou imagini (Fig. 3., Fig. 4) care surprind distribu ia acestor haplogrupuri.

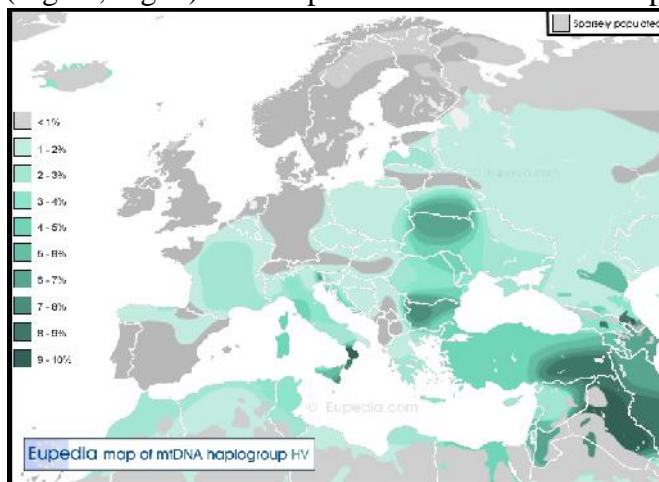


Fig. 4. Distribu ia haplogupului mitocondrial R0 (HV) în Europa, Orientul Apropiat i Nordul http://www.eupedia.com/europe/maps_mtdna_haplogroups.shtml#HV

Prezen a haplogrupului R0a, cunoscut anterior drept HV, este întâlnit cel mai adesea în structura genetic a popula iilor din Turcia, Iran, Yemen i Bulgaria (http://www.eupedia.com/europe/european_mtdna_haplogroups_frequency.shtml).

Prezen a celor mai ridicate frecven e ale acestui grup mitocondrial în peninsula arab se poate datora faptului c în această regiune a avut loc o diversificare intern a sa, ca urmare a expansiunii demografice de dup ultima glacia iune (erný et al., 2011). În acela i timp, s-a

observat o frecvență de 48% a haplogrupului R0a în cadrul aromânilor de pe teritoriul românesc și una de 34% pentru românii din Constanța, zona geografică în care se regăsește situl arheologic Capidava (Bosch et al., 2006). Cele două distribuții ale frecvențelor celor două tipuri de varietăți mitocondriale oglindesc prezența unor "hotspot-uri" în partea sudică a Belarusului și în sud-vestul Ucrainei. O explicație plauzibilă pentru acest aspect ar fi expansiunea nordică a populațiilor culturii Cucuteni din regiunea pontică, în neoliticul târziu, ca urmare a invadării teritoriului lor de către indo-europeni (Nikitin et al., 2011).

Compararea datelor cu alte studii de ADN vechi

În ceea ce privește studiile de ADN vechi, literatura de specialitate despre evoluția ADN-ului este puternic dominată de probe foarte vechi care datează din Paleolitic, Neolitic, Epoca Bronzului, Epoca fierului.

Același tipar genetic ca și în cazul individului M8 a fost semnalat prin analiza resturilor osoase ale unui individ descoperit într-o peșteră din regiunea Levantului, un important coridor de comunicare, migrație și comerț (Salamon et al., 2010). Datarea cu carbon a osemintelor plasează mormintele din aceste peșteri în Epoca Bronzului (mileniul 5-4 înapoia erei noastre). Un alt haplotip identic a fost pus în evidență în cazul unui schelet din Epoca Fierului, aflat într-o așezare stăruie veche din Danemarca (Melchior et al., 2008). O frecvență ridicată a liniei materne U3 a fost constatată în cadrul unei populații Bizantine din situl arheologic Sagalassos din sudul Anadoliei, ce datează din secolele 11-13 AD (Ottoni et al., 2011). Rezultatele discutate în acest studiu subliniază afinitatea genetică a populației din Sagalassos cu cea a populațiilor Balcanice, o consecință a interacțiunilor frecvente dintre ele în trecutul istoric. Mai mult, sunt prezentate două ipoteze pentru originea liniei mitocondriale U3. Una dintre ele identifică U3 ca fiind o componentă levantină, fapt explicat prin schimburile comerciale intense stabilite între populații, din cele mai vechi timpuri, dar aceasta nu exclude posibilitatea unei origini caucaziene.

Studiile de ADN vechi care se fac referire la modul în care haplogrupul R0a2i a contribuit la diversitatea genetică a populației actuale sunt aproape inexistente. În literatura actuală există un singur studiu care atribuie haplogrupul R0 unui individ descoperit în peștera Paglicci din sudul Italiei și care datează de acum 24000 de ani (Caramelli et al., 2003).

Din contextul istoric și arheologic al populației de secol 10-11 AD de la Capidava pot fi deduse mai multe ipoteze pentru apartenența acestora la un anumit grup populațional. Printre acestea se numără: bulgari, turci (bizantini), avari, armeni, cumani, pecenegi, slavi. Prin corelarea datelor moleculare cu cele istorice și arheologice se poate restrânge intervalul acestora. Astfel, cel mai probabil indivizii analizați provin dintr-un fond bulgar sau turanic, având originea în zona Caucazului. Rezultatele genetice actuale nu exclud posibilitatea ca cei doi indivizi să provină din același fond etnic. Informații suplimentare care să ofere o imagine mai comprehensivă asupra situației din regiunea Dobrogei în secolul X, pot fi ilustrate prin analiza diversității genetice a mai multor indivizi din necropolele din această zonă. De asemenea, tiparul de migrație și modul în care mișcările demografice au lăsat amprente în fondul genetic actual poate fi completat prin integrarea datelor moleculare cu cele obținute prin analize de izotopi stabili, mai exact stronțiu.

Concluzii

Studiile de ADN vechi au potențialul de a oferi indicii despre modul în care evenimentele din trecutul istoric au modelat fondul genetic actual, precum și despre legăturile genetice inter și intra populaționale. Datele de ADN vechi disponibile la ora actuală sunt infinitesimal de mici, datorită eforturilor, costurilor și dificultăților pe care o analiză de acest tip le presupune. Astfel, cele mai multe informații pot fi deduse logic din datele de ADN modern, corelate cu cele istorice și arheologice.

Rezultatele moleculare din acest studiu pun în lumină informații legate de originea populației medievale excavate din situl arheologic de la Capidava, precum și despre relațiile de rudenie dintre indivizi. A adăria, această populație își are originea cel mai probabil în zona Caucazului și face parte dintr-o populație turanică sau **bulgară**. Totodată, datele moleculare indică faptul că cei trei indivizi, M4, M5 și M8 nu împărtășesc o relație de rudenie apropiată pe linie maternă, deși alte relații de tip familial nu pot fi excluse. Estimarea diversității genetice a acestei populații este limitată de prezența în număr mare a indivizilor subadulți, în cazul cărora ADN-ul este slab conservat.

O imagine mai cuprinzătoare asupra trecutului istoric al acestei populații poate fi conturată prin integrarea datelor moleculare cu cele obținute prin analiza izotopilor stabili (stronțiu) și datarea cu carbon radioactiv.

Studiul IV.

Optimizarea diagnosticului molecular al sexului la probe arheologice umane

Scopul principal experimental al lucrării de față este acela de a testa patru amorse nou concepute pentru a amplifica fragmente din genele pentru amelogenin prezente pe cromozomul X, respectiv Y, în vederea determinării sexului, pe baza ADN-ului extras din dinți sau oase aparținând indivizilor de diverse vârste, descoperiți în diverse situri arheologice, fiind datați în secole diferite. Totodată se urmărește standardizarea unui protocol, în vederea obținerii de rezultate constante, indiferent de particularitățile fiecărui individ analizat. Mai mult decât atât sunt urmăriți în obținerea datelor.

1. Extracția ADN-ului

Oasele sau dinții sunt utilizați în extracția ADN-ului. Cum problema contaminării este foarte serioasă și poate influența într-o măsură covârșitoare datele obținute, sunt luate măsuri pentru a diminua cantitatea de agenți contaminanți care vin în contact cu fiecare probă analizată. Au fost puse la punct două protocoale de extracție: unul pe bază de fenol-cloroform (Harvella *et al.*, 2012, Hagelberg and Clegg, 1991, Ginther *et al.*, 1992) și unul altul care utilizează coloane cu membrană de siliciu (Yang *et al.*, 1998, Anderung *et al.*, 2008). Trăsăturile ADN-ului vechi legate de cantitatea redusă a acestuia, calitatea scăzută și prezența inhibitorilor sunt luate în calcul atunci când este elaborat un protocol de extracție.

a) Curățarea probelor

Fiecare probă utilizată pentru extracție este mai întâi spălată cu apă ultrapură. Urmează apoi spălarea suprafețelor oaselor cu clor, respectiv imersarea dinților în clor pentru 10-15min. Din nou, se utilizează apă ultrapură pentru îndepărtarea clorului. Probele sunt ulterior luate la UV timp 10-15min pe fiecare parte.

b) Decalcifierea și îndepărtarea substanțelor organice

Probele astfel curățate sunt introduse în hot, unde cu ajutorul unui micromotor și al frezelor dentare se obține 0,2g de pulbere din osul compact, după ce suprafața acestora a fost îndepărtată, respectiv din pulpa dentară în cazul dinților, preferențial în extracția realizată cu ajutorul coloanelor cu membrană de siliciu. Peste pulbere se adaugă soluția de decalcifiere. Pentru extracția cu fenol soluția conține: 0,5M EDTA (ethylene diaminetetra-actic acid), cu rol în chelatarea ionilor de calciu, 0,5% SDS (sodium dodecyl sulfate), 50mM TrisHCl și 1 mg/ml proteinază K, pentru digestia proteinelor. pH-ul soluției se aduce la 8. Peste fiecare 0,2g pulbere os/dinte se adaugă 1ml din soluția de decalcifiere, lăsându-se peste noapte la 56°C. În ceea ce privește extracția cu ajutorul coloanelor cu membrană de siliciu, soluția de decalcifiere are o compoziție ușor diferită: 0,5M EDTA, 5% SDS și 20mg/ml proteinază K, aducându-se pH-ul la 8. Se adaugă 1 ml de soluție peste pulberea de dinte. Se lasă peste noapte la 55°C, iar apoi 24h la 37°C. Pentru a verifica gradul de contaminare cu ADN modern în timpul extracției soluția de decalcifiere se aplică într-un tub gol, care nu conține pulbere de os sau dinte, utilizată ca și control negativ de extracție. După acest pas, controlul negativ de extracție va suferi același tratament ca probele propriu-zise.

c) Extrac ia cu fenol-cloroform

Extrac ia propriu-zis a ADN-ului se realizeaz într-o înc pere separat fizic de cea în care s-a realizat extrac ia materialului osos/dentar sau de cea destinat PCR-ului, dotat cu o hot cu presiune pozitiv . Principiul extrac iei cu fenol-cloroform este acela al extrac iei lichid-lichid bazat pe separarea moleculelor pe baza gradului lor de solubilitate în medii lichide nemiscibile. ADN-ul se g se te în fiecare etap în stratul apos, superior.

Probele con inând pulberea de os sau dinte sunt centrifugate, preluându-se supernatantul care se amestec cu un volum egal de fenol-cloroform (fenol:cloroform:alcool izoamilic 24:25:1, v/v), preluându-se în urma unei centrifug ri supernatantul. Procedul se repet . Dup cea de-a doua centrifugare, supernatantul se amestec cu cloroform, cu rolul de a îndep rta fenolul în exces legat de ADN. Se preia din nou supernatantul, urmând precipitarea ADN-ului cu etanol absolut. Urmeaz dou sp l ri cu etanol 80%, dup care probele sunt uscate, apoi rehidratate i trecute prin centricon (Amicon® Ultra- MILLIPORE), cu rol în concentrarea i purificarea acestora.

Protocoale de extrac ie a fost testate pe o serie de indivizi apar inând unor necropole localizate în diferite zone geografice din România, având vechimi diferite. Localizarea geografic diferit presupune condi ii tafonomice diferite, ac iunea degradant a factorilor de mediu diferind în func ie de amplasare. Extrac ia cu fenol-cloroform a fost testat pe 7 indivizi dup cum urmeaz :

Individ	Localizarea sitului arheologic c ruia apar ine	Datare	Surs de ADN	Sex atribuit dup analiza antropologic
I1	Suplacu de Barc u	Mil IV î. Hr.		b rbat
I2	Coconi		humerus	
I3	Gheorghieni	-	vertebr	posibil femeie
I4	Mireasa	Secol X d.Hr	molar	b rbat
I5	Capidava	Secol X d. Hr	molar	b rbat
I6	Capidava	Secol X d. Hr	molar	femeie
I7	Histria	Secol IV-V d. Hr	craniu	b rbat

d) Extrac ia cu coloane cu membran de siliciu QIAquick PCR Purification Kit Protocol (QIAGEN)

Metoda de extrac ie care implic utilizarea coloanelor se bazeaz pe proprietatea particulelor de siliciu de a re ine ADN-ul (Höss and Pääbo, 1993). Membranele permit re inerea fragmentelor cu dimensiuni cuprinse între 100pb i 10kb, excluzând nucleotidele, proteinele i s rurile. Fragmentele de ADN vechi au în general câteva sute de perechi de baze, fiind preponderent scurte, fragmentele de dimensiuni mari, provenind de fapt de la organisme care vin în contact, postmortem, cu din ii sau oasele analizate. Metoda este mult mai specific pentru ADN, sc zându-se cantitatea de produ i coextra i, având de cele mai multe ori efect inhibitor asupra PCR-ului. Eliminarea compu ilor organici din procesul de extrac ie, în special al fenolului, care interfereaz în special cu determinarea spectrofotometric exact a cantit ii de ADN extras i mai apoi în reac ia de PCR, cresc ulterior ansa de a ob ine amplificarea fragmentelor de interes.

Protocolul de extrac ie utilizând coloane cu membran de siliciu a fost aplicat asupra a trei indivizi caracteriza i în tabelul de mai jos.

Individ	Localizarea sitului arheologic c ruia apar ine	Datare	Surs de ADN	Sex atribuit dup analiza antropologic
I8	Curtea de Arge	Secol XIV d.Hr	molar	b rbat
I9	Capidava	Secol X d.Hr	molar	femeie
I10	Capidava	Secol X d.Hr	molar	b rbat

- e) Determinarea spectrofotometric a concentra iei de ADN din probe cu ajutorul Spectrophotometer Nano Drop ND 1000

Spectrofotometrul permite cuantificarea cantit ii de ADN la absorban a de 260nm. Nanodropul, spre deosebire de un spectrofotometru normal, necesit un volum redus de prob pentru a stabili concentra ia acesteia. Utilizând 1µl din compusul de analizat, pe baza peak-ul de absorb ie se stabile te concentra ia de acid nucleic din prob . Amplitudinea vârfului de aborb ie este propor inal cu cantitatea de acid nucleic analizat .

- f) Electroforeza acizilor nucleici în gel de agaroz

Pentru a verifica dac exist ADN în probe, dup extrac ie, a fost realizat migrarea lor, sub ac iunea curentului electric în gel de agaroz . Moleculele migreaz cu viteze diferite în func ie de m rimea lor, cele mai mici migrând mai u or printre porii gelului spre deosebire de cele mai mari.

2. Amplificarea fragmentelor de interes

Amplificarea prin PCR a fragmentelor caracteristice cromozomilor X i Y în vederea determin rii sexului poate fi problematic atunci când este folosit ca matri ADN-ul vechi. Au fost testate o serie de amorse, corelate cu diverse polimeraze încercându-se i ad ugarea unor aditivi în vederea îmbun t irii productivit ii i specificit ii reac iei.

- a) Amorse

Amplificarea genelor pentru amelogenin corespunz toare cromozomul X i Y a avut loc printr-un PCR multiplex. Acea i amors forward (M4) a fost conceput pentru amplificarea AMELX cât i pentru amplificarea AMELY. Amorsele reverse (M5 pentru AMELX, M6 pentru AMELY) sunt specifice fiec rui cromozom (Faerman *et al.*, 1995). Fragmentele intite sunt de 330pb pentru cromozomul X, respectiv 218pb pentru Y. Amorsa M7 a fost conceput ulterior ca alternativ la M5 (Faerman and Bar-Gal, 1998) pentru a duce la amplificarea unui segment mai scurt, de 270pb pe cromozomul X.

Nume amors	Secven	T _m (°C)
Cromozom X		
M4(F)	5'-CAGCTTCCCAGTTTAAGCTCT-3'	60
M5(R)	5'-TCTCCTATAACCACTTAGTCACT-3'	62
M7(R)	5'-GTGACTATCTTAGAATCAGGAG-3'	62
Cromozom Y		

M4(F)	5'-CAGCTTCCCAGTTTAAGCTCT-3'	60
M6(R)	5'-GCCCAAAGTTAGTAATTTTACCT-3'	62

Pornind de la ideea întiririi unor fragmente cât mai scurte, dorite în cazul studiului ADN-ului vechi, patru noi amorse forward (NP_1, NP_2, NP_3, NP_4) au fost concepute ca substitute ale lui M4. Dimensiunile fragmentelor amplificate sunt: utilizând NP_1 243pb pentru cromozomul X și 131pb pentru cromozomul Y, utilizând NP_2 204pb pentru X și 92pb pentru Y, utilizând NP_3 181pb pentru X și 69pb pentru Y și utilizând NP_4 212pb pentru X și 100pb pentru Y. M5 și M6 sunt folosite în continuare ca amorse reverse.

Nume amors	Secven	T _m (°C)
Cromozom X		
NP_1(F)	5'-CCTCCTAAATATGGCYGTAAG-3'	60
NP_2(F)	5'-CRTCTCAGGRAGGYTCCATC-3'	60
NP_3(F)	5'-AGGGCAAAAAGTMAACTCTGAC-3'	62
NP_4(F)	5'-CATGAACCACTRCTCAGGRAG-3'	62
M5(R)	5'-TCTCCTATAACCACTTAGTCACT-3'	62
Cromozom Y		
NP_1(F)	5'-CCTCCTAAATATGGCYGTAAG-3'	60
NP_2(F)	5'-CRTCTCAGGRAGGYTCCATC-3'	60
NP_3(F)	5'-AGGGCAAAAAGTMAACTCTGAC-3'	62
NP_4(F)	5'-CATGAACCACTRCTCAGGRAG-3'	62
M6(R)	5'-GCCCAAAGTTAGTAATTTTACCT-3'	62

b) Polimeraze

O serie de polimeraze au fost testate în încercarea de a amplifica segmentele întite constant. Probele de ADN ob inute utilizând kitul de extrac ie cu coloane cu membran de siliciu au dat frecvent și constant amplificare atunci când a fost utilizat MangoTaq™ DNA Polymerase (BIOLINE). În cazul ADN-ului ob inut prin extrac ia cu fenol-cloroform niciuna din polimerazele testate nu au dat constant rezultate. Au fost încercate: MangoTaq™ DNA Polymerase (BIOLINE), GoTaq™ DNA Polymerase (Promega), IMMOLASE™ DNA Polymerase (BIOLINE) și MyFi™ DNA Polymerase (BIOLINE).

c) Aditivi

2x PolyMate Additive (BIOLINE) poate fi utilizat alături de orice polimerază termostabilă având rolul de a crește specificitatea și productivitatea PCR-ului. Este indicat de folosit în cazul probelor dificile, cu un conținut ridicat de GC sau cu secvențe repetitive.

Cantitățile utilizate pentru multiplicarea fragmentelor de interes, utilizând MangoTaq™ ca polimerază sunt menționate în tabelul următor.

Componente	Volume (μl)	
H ₂ O	10.5	
Buffer (5X)	5	
MgCl ₂ (50mM)	1.25	
dNTP(10mM)	0.5	
NP_1/2/3/4(F)(10μM)	1.5	
M5(R) (10μM)	1.5	
M6(F) (10μM)	1.5	
MangoTaq(5U/10μl)	0.25	
ADN(40ng/react)	3	Volum final 25μl

Pentru celelalte în care sunt utilizate celelalte polimeraze diferite doar tamponul cu care vine însoțită enzima. În cazul în care este utilizat ca aditiv 2x PolyMate Additive, acesta înlocuiește cantitatea de apă adăugată în mod normal.

Condițiile termice și numărul de cicluri necesare amplificării segmentelor dorite sunt următoarele:

Pasul din PCR	Temperatura	Timp	Numar de cicluri
Denaturarea inițială	95°C	30 s	1
Denaturarea	95°C	30 s	35/40
Alinierea amorsoarelor	58°C	30 s	
Extensia catenelor	72°C	30s	
Extensia finală	72°C	5 min	1
	4°C		1

3. Electroforeza produselor PCR în gel de agaroz (1.5-2%)
4. Purificarea produselor PCR din gel de agaroz cu FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (FAVORGEN)
5. Autentificarea rezultatelor

Autentificarea rezultatelor presupune discriminarea fragmentelor amplificate de pe matrița de ADN veche, respectiv cele amplificate de pe moleculele de ADN moderne, contaminante. Pentru acesta, fragmentele obținute prin PCR, având dimensiunile așteptate au fost clonate utilizând protocolul Sticky-end cloning protocol (Thermo Scientific). Pentru transformare au fost folosite celule de *E. coli*, tulpina DH5, rezistent la ampicilin.

Plasmidele au fost purificate utilizând kitul GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). După verificarea prezenței fragmentelor de interes, plasmidele au fost secvențializate (Macrogen,

Coreea). Pentru ca secvenele obținute să fie atribuite amplificării de pe matricea de ADN vechi este următorul prezența substituițiilor apărute post-mortem în interiorul secvenelor analizate. Prezența substituițiilor în clonele aceluiasi fragment atestă faptul că acesta a fost amplificat pornind de la ADN-ul vechi extras din osul sau dintele analizat.

Rezultate și discuții

Utilizând amorsele propuse de Faerman, nu s-a reușit amplificarea cu succes în niciuna din probele de ADN vechi testate (Figura 1.). Fragmentele întinse, de 330pb pentru cromozomul X, respectiv 218pb pentru Y sunt prea mari. În general, fragmentele din probele de ADN vechi au lungimi medii de 150pb, fragmente ceva mai lungi, de 500-600pb putând fi amplificate în cazul indivizilor bine conservați și având ca sursă ADN-ul mitocondrial (Pääbo et al., 1989).

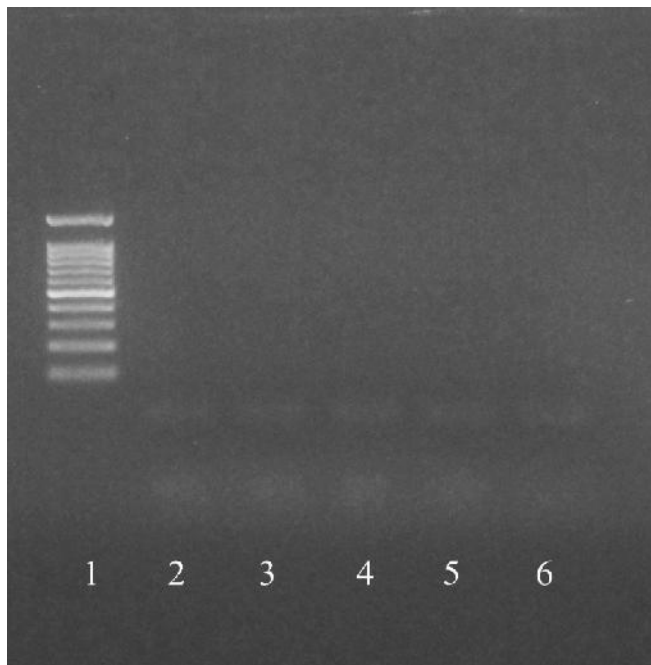


Figura 1. Gel de agaroz conținând produse PCR din probe extrase cu fenol-cloroform din individul I7 descoperit la Histria. Au fost utilizate amorsele propuse de Faerman. Godeuri: 1-marker 100pb, 2- amplificare ADN extras din os scurt, 3- amplificare ADN extras diafiza unui os lung, 4- amplificare ADN extras din epifiza unui os lung, 5- amplificare control negativ de extracție, 6- control negativ PCR. Reacția de amplificare a fost realizată utilizând MangoTaq™ DNA Polymerase. Cantitatea de ADN extras și puritatea acestuia pentru fiecare din probele 2-5 a fost înregistrată spectrofotometric (2: conc ADN- 1089.9, 260/280-1.47, 260/230- 0.53; 3: conc ADN- 550.9, 260/280-1.42, 260/230-0.8; 4: conc ADN-855.3, 260/280-1.47, 260/230-0.44, 5(control negativ de extracție): conc ADN-34.5, 260/280-13.03, 260/230-0.05) Valorile foarte mari ale concentrației de ADN se datorează prezenței altor compuși care manifestă absorbția la 260nm ca în cazul acizilor humici prezenți în sol. Valorile scăzute ale indicelui 260/280 (1.5) față de valoarea la care ADN-ul este considerat pur (1.8) indică prezența proteinelor, fenolului și a altor compuși organici fenolici. Indicele 260/230 este și el sub valorile care indică puritatea (2-2.2) marcând prezența fenolului și a acizilor humici. Pe lângă lungimea fragmentelor întinse, prea mare, pentru studiul ADN-ului vechi, prezența fenolului și a altor substanțe organice co-extrase determină insuccesul reacției de amplificare.

Amorsele nou concepute au fost testate inițial pe probe de ADN modern pentru a se stabili dacă dimensiunea fragmentelor obținute este cea așteptată (Figura 2.). Amplificarea a avut loc cu succes fiind obținute fragmentele dorite. Segmentele întinse sunt mai scurte cu cel puțin

90pb fa a de amorsele testate anterior, motiv pentru care sunt mult mai potrivite pentru studiul ADN-ului vechi.



Figura 2. Gel de agaroz care ilustrează modalitatea de funcționare a amorselor nou concepute când ADN-ul modern este folosit ca matrice. Godeuri: 1. marker 100pb, 2. fragment de 243pb obținut prin amplificarea de ADN feminin (cromozom X), 3. fragmente de 243pb și 131pb obținut prin amplificarea de ADN masculin (cromozom X, respectiv Y), 4. fragment de 204pb obținut prin amplificarea de ADN feminin (cromozom X), 5. fragmente de 204pb și 92pb obținut prin amplificarea de ADN masculin (cromozom X, respectiv Y), 6. fragment de 181pb obținut prin amplificarea de ADN feminin (cromozom X), 7. fragmente de 181pb și 69pb obținut prin amplificarea de ADN masculin (cromozom X, respectiv Y), 8. fragment de 212pb obținut prin amplificarea de ADN feminin (cromozom X), 9. fragmente de 212pb și 100pb obținut prin amplificarea de ADN masculin (cromozom X, respectiv Y), 10. control negativ de PCR. Reacția de amplificare a fost realizată utilizând MangoTaq™ DNA Polymerase.

Dintre toate probele obținute prin extracție cu fenol-cloroform, singura amplificare reușită în vederea determinării sexului a fost posibilă în cazul individului I3 (Figura 3.). Rezultatele vin să confirme atribuirea sexului realizată prin analiza antropologică, remarcându-se în urma amplificării doar banda caracteristică cromozomului X.

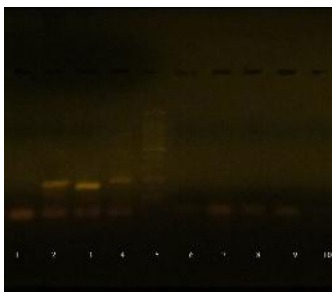


Figura 3. Gel de agaroz în care de găsim produse PCR obținute prin analiza ADN-ului extras din individul I3. Godeuri: 1. amplificarea probei utilizând amorsa NP_1, 2. amplificarea probei utilizând amorsa NP_2, 3. amplificarea probei utilizând amorsa NP_3, 4. amplificarea probei utilizând amorsa NP_4, 5. marker 100pb, 6. amplificarea controlului de extracție utilizând amorsa NP_1, 7. amplificarea controlului de extracție utilizând amorsa NP_2, 8. amplificarea controlului de extracție utilizând amorsa NP_3, 9. amplificarea controlului de extracție utilizând amorsa NP_4, 10. Control negativ de PCR. Reacția de amplificare a fost realizată utilizând MyFi™ DNA Polymerase. Cantitatea de ADN extras și puritatea acestuia pentru probă și controlul de extracție au fost înregistrate spectrofotometric (probă: conc ADN- 401.5, 260/280-1.52, 260/230- 0.6; control de extracție: conc ADN- 0.4, 260/280- 0.62, 260/230-0.09).

O problemă importantă a utilizării noilor amorse este legată de faptul că tind să formeze dimeri atunci când ADN-ul folosit ca matrice este în cantitate redusă (Figura 4.). Dimerii formați ajung

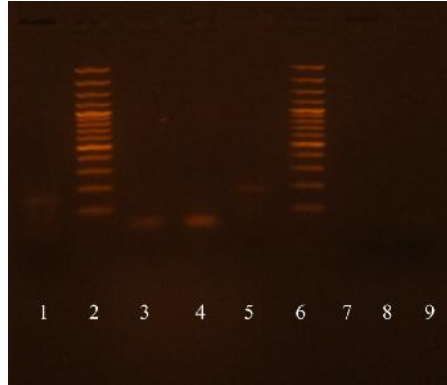


Figura 6. Gel de agaroz care conține produșii de PCR în cazul amplificării ADN-ului extras cu coloane cu membrană de siliciu din individul I8. Godeuri: 1. amplificare specifică cromozomului Y din probă, 2. marker 100pb, 3. amplificare specifică cromozomului Y din control de extracție, 4. control negativ PCR, 5. amplificare specifică cromozomului X din probă, 6. marker 100pb, 7. amplificare specifică cromozomului X din probă, 8. amplificare specifică cromozomului X din controlul de extracție, 9. Control negativ PCR. Reacția de amplificare a fost realizată utilizând MangoTaq™ DNA Polymerase. Cantitatea de ADN extras și puritatea acestuia pentru probă respectiv controlul de extracție a fost înregistrată spectrofotometric (probă: conc ADN- 18.2, 260/280-1.75, 260/230- 2; control de extracție: conc ADN- 2.2, 260/280- -1.13, 260/230- -1.3). Valorile indicilor 260/280 și 260/230 sunt mai apropiate de valorile care definesc puritatea. Nu este astfel deloc surprinzător faptul că ADN-ul extras cu ajutorul coloanelor cu membrană de siliciu este o matrice mai bună în reacția de PCR.

Autentificarea rezultatelor presupune validarea secvențelor obținute ca fiind amplificate de pe matricea de ADN vechi extrasă și nu de pe alte molecule de ADN contaminante, care vin în contact cu probele. În cazul individului I8 a fost clonată și secvențiat fragmentul caracteristic cromozomului Y. Deoarece controalele de extracție, respectiv de PCR, nu au generat amplificare, iar personalul laboratorului în care s-a realizat analiza moleculară este în totalitate de sex feminin, contaminarea cu ADN modern în timpul analizei moleculare desfășurate în laborator poate fi exclusă. Din analiza secvențelor clonelor fragmentului analizat se poate remarca prezența unei substituții C → T la capătul 5' al fragmentului analizat, caracteristic moleculelor de ADN vechi (Figura 7.). Fragmentul analizat este scurt, prezența altor substituții caracteristice fiind limitată de dimensiunea lui. O serie de alte teste moleculare vizând ADN-ul mitocondrial sau nuclear au fost realizate asupra aceluiași individ, în cazul tuturor reacțiilor realizate controalele de PCR și extracție fiind neamplificabile. Corelând lipsa de amplificare din controalele negative de extracție și PCR, cu prezența substituției C → T și rezultatele obținute în cazul celorlalte, fragmentul obținut pentru cromozomul Y poate fi considerat ca fiind amplificat de pe matricea de ADN vechi prezentă în probă.

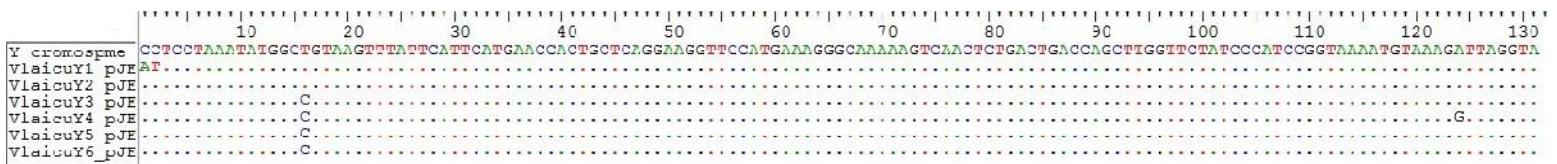


Figura 7. Alinierea secvențelor fragmentelor caracteristice cromozomului Y obținute în cazul individului I8.

Concluzii

Utilizarea amorselor propuse de Faerman în determinarea moleculară a sexului nu a condus la amplificarea segmentelor dorite, cel mai probabil, dimensiunea segmentelor întite fiind prea mare pentru studiul ADN-ului vechi. Amorsele nou propuse care vizează segmente mai scurte au condus în unele probe la amplificări caracteristice.

În ceea ce privește standardizarea unui protocol în vederea determinării constante a sexului utilizând amorsele noi, acesta nu a putut fi încorporat la punct. Inconstanța cu care are loc amplificarea fragmentelor de interes se datorează unei serii de factori legate în primul rând de calitățile ADN-ului extras și de cantitatea de elemente co-extrase cu efect inhibitor asupra reacției de amplificare.

Cu siguranță metoda de extracție a ADN-ului influențează gradul de reușită al amplificării ulterioare. În cazul extracției cu fenol, o serie de substanțe (fenol, acizi humici) sunt co-extrase având ulterior efecte negative asupra PCR-ului. Extracția cu coloane cu membrană de siliciu oferă un ADN ca matrice cu mai puțini contaminanți. Sursa de extracție este și ea importantă dinții oferind rezultate constant mai bune decât oasele analizate.

În ceea ce privește strict eficiența amorselor sintetizate, acestea au rezultatele scontate la amplificare în cazul în care matricea de ADN este în cantitate suficientă. În condițiile în care ADN-ul vechi este degradat, amorsele tind să formeze dimeri, de dimensiuni confundabile cu ale fragmentelor așteptate, motiv pentru care nu pot fi utilizate în PCR multiplex așa cum au fost concepute. Amplificarea într-o singură reacție a fragmentelor caracteristice atât cromozomului X cât și cromozomului Y reprezintă o metodă rapidă și eficientă de atribuire a sexului. Necesitatea utilizării separate a amorselor nou concepute, pentru a evita dimerii este un neajuns al acestora.

O constantă tendință se observă totuși în ceea ce privește extracția ADN-ului cu ajutorul coloanelor cu membrană de siliciu. În toate cazurile, amplificarea a avut succes, ADN-ul extras fiind mai pur decât cel extras cu fenol. Amorsele însă au fost testate separat, în reacții diferite, specifice fiecărui cromozom. În cazul polimerazei, MangoTaqTM DNA Polymerase tinde să ofere rezultatele dorite în cazul ADN-ului extras cu ajutorul coloanelor cu membrană de siliciu.

Pentru standardizarea unui protocol de determinare a sexului va fi necesară analizarea mai multor probe pentru a se putea trage concluzii mai elocvente. Tendința de constantă apărare în cazul extracției cu coloane cu membrană de siliciu, cu siguranță îmbunătățește cantitățile de ADN extras fiind soldată cu reușita atribuirii moleculare a sexului în urma PCR-ului multiplex.

Studiul V.

Diagnosticul interdisciplinar al unui caz de diabet din perioada neolitic

Situl arheologic Suplacu de Barcu se află în județul Bihor, la limita cu județul Sălaj. În această zonă se întâlnesc trei unități geografice importante: Câmpia de Vest, Dealurile de Vest, și o parte a Munților Apuseni (fig. 1.). Complexitatea structurii geologice determină o mare varietate de roci utile: marmură, calcar, gresie, granit, tufuri, o mare parte din ele fiind utilizate de comunitatea de la Suplacu de Barcu pentru producerea de unelte de piatră lefuită (Ignat, 1998).



Fig. 1. Localizarea sitului arheologic Suplacu de Barcu.
(www.maps.google.ro)

Zonele împădurite erau dominate de fag, pe lângă care apar molidul, bradul, gorunul, carpenul, ulmul și frasinul. Aceste specii au fost folosite de comunitățile neolitice ca materiale de construcții (Ignat, 1998). În ceea ce privește agricultura, se practica cultivarea cerealelor, mai ales a grâului (au fost descoperite rășnițe, vase de provizii).

Fauna acestei zone era una tipică pentru regiunile deluroase și montane central-europene: cerbul, cerbul lop-târ, ursul, mistrețul, lupul, vulpea, râsul, și numeroase păsări printre care cocorul de munte, corbul și fazanul. Cercetările arheologice au identificat prezența oaselor de păsări de talie mare cum ar fi barza, cocorul și pelicanul. Deseori sunt prezente rapitoarele (acvile și vulturi) și în mod permanent galinaceele și anatidele. Pe lângă oasele de la speciile sălbatice au fost descoperite și specii domestice: boul, oaia și capra (Ignat, 1998).

Locuințele grupului cultural Suplacu se grupează în așezări permanente și sezoniere. Așezarea de la Suplacu de Barcu-Corbu este una permanent formată din locuințe de suprafață. Așezările sezoniere sunt cele din peșteri (la Vadu Criului-Devent, Peștera Caprelor) sau din zonele joase, inundabile (Ignat, 1998).

Modificarea dietei - presiune selectivă asupra genelor implicate în metabolism

Impactul pe care l-a avut adoptarea agriculturii asupra comunităților umane a fost major și a afectat mobilitatea, comportamentul, dieta, dinamica populațiilor etc.

Pe de o parte evoluția tehnologică și surplusul de hrană a dus la o explozie demografică prin creșterea fertilității și scăderea timpului dintre nașteri (Wells & Stock, 2007).

În același timp, efectul asupra sănătății de sănătate a fost unul negativ. Trecerea de la o dietă diversă (carne de vânat, fructe, rădăcini, semințe etc.) la o dietă bazată în cea mai mare parte pe carbohidrați (amidon din cerealele cultivate, lactoza din produsele lactate ale animalelor domestice) duce la o serie de rezultate negative pentru sănătate care se reflectă în frecvența cu care se observă deficiențele nutritive și cariile dentare la astfel de populații. În plus, traiul în așezări permanente sau semi-permanente al turii de animale domestice crește prevalența zoonozelor (Pinhasi & Stock, 2011).

Apariția unor modificări ale metabolismului pare a fi rezultatul presiunii selective asociate cu domesticirea animalelor și plantelor. În Neolitic, după trecerea la agricultură, are loc selecția legată de persistența lactazei (Burger et al., 2007) și de numărul de copii ale genei pentru amilază (Perry et al., 2007).

De aceea, și apariția patologiilor metabolice, cum este diabetul în cazul de față, poate fi explicat prin selecția anumitor variante genetice ca răspuns la stresul nutrițional asociat cu trecerea la agricultură.

Materiale și metode

Arheologie

Situl arheologic Suplacu de Barcău – Corău a fost excavat începând cu anul 1973 de D. Ignat, iar în ultimii zece ani de G. Fazeca. Punctul central al săpăturilor arheologice a fost așezarea care aparține grupului Suplacu, datat în perioada Neoliticului Mijlociu. Campania arheologică din 2012 a utilizat metode geofizice, ceea ce a dus la identificarea a 60 de complexe arheologice, dintre care 53 au fost investigate. Printre acestea, a fost identificat un schelet înhumat în poziție chirchită. Pe baza stratigrafiei sitului, acest complex a fost datat la aproximativ 5000 î. Hr.

Antropologie fizică

Pentru analiza osteologică a fost folosit un protocol bazat pe indicațiile descrise în *Standards For Data Collection from Human Skeletal Remains* (Buikstra, Ubelaker 1994) și *Data Collection Codebook* (Steckel et al., 2011).

Determinarea sexului s-a făcut pe baza morfologiei craniului și a pelvisului.

Vârsta a fost estimată pe baza morfologiei simfizei pubiene, a suprafeței auriculare a sacului și a capetelor sternale ale coastelor.

Modificările patologice au fost analizate urmărind descrierile făcute de Ortner, 2003, Aufderhaide și Rodriguez-Martin, 1998, Waldron, 2009 și Pinhasi și Mays, 2008.

Pentru obținerea mai multor detalii privind aspectul unor oase afectate de fenomene patologice au fost realizate radiografiile cu raze X.

ADN vechi- probleme specifice, limite

Există dificultăți întrucât după moartea organismului mecanismele reparatorii nu mai funcționează și ADN se degradează în timp. Acesta se găsește sub forma unor fragmente de

câteva sute de perechi de baze. În plus, apar modificări precum: monocatenene și situsuri apurice datorate hidrolizei, dezaminarea citozinei și tranziția ei în timină, oxidarea care împiedică reacția de PCR și alchilarea ADN (Lamers, Hayter, & Matheson, 2009).

Datorită faptului că ADN vechi se găsește în cantități mici și degradat sunt necesare măsuri de protecție pentru a evita contaminarea cu ADN modern. Toate experimentele s-au desfășurat în condiții standard de sterilitate, într-un laborator dedicat exclusiv acestui scop. Laboratorul este separat de cel în care se lucrează cu ADN modern, care se află la un etaj diferit în cadrul aceleiași clădiri. Toate probele au fost verificate, atât în etapa de extracție cât și în cea de PCR, prin una sau mai multe probe control.

Selecția genelor, proiectarea amorsoarelor

Există numeroase studii care își propun să descopere asociația dintre unele mutații și apariția diabetului zaharat. Există un număr de mutații care sunt asociate consecvent cu un risc crescut de apariție a diabetului. Dintre aceste mutații au fost selectate cele de interes în acest studiu.

Selecția s-a făcut ținând cont de mai multe variabile: vârsta individului la momentul morții, sexul bărbătesc, caracteristicile dietei specifice Neoliticului european. În plus, deoarece structura genetică a populațiilor neolitice europene este diferită de cea a populațiilor actuale, trebuie luate în considerare rezultatele studiilor genetice obținute pentru o cât mai mare varietate de populații moderne.

Având în vedere că vârsta individului a fost estimată la 33-45 de ani, și că individul a trăit cu diabet suficient timp încât să dezvolte complicațiile osoase asociate, vârsta de debut se încadrează în intervalul 20-40 de ani.

Un alt aspect important este dieta. Luând în considerare ceea ce se cunoaște despre dieta tipică a comunităților neolitice (Richards et al., 2003) dar și faptul că individul nu prezenta markeri osoși asociați cu obezitatea, am ales să excludem mutațiile implicate în metabolismul lipidic și obezitatea centrală care ar putea duce la apariția diabetului.

Având în vedere aceste informații, analiza genetică a urmărit câteva SNP asociate cu MODY, rezistența la insulină și diabetul mitocondrial.

Termenul MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) este folosit pentru a descrie un grup de forme de diabet non insulinodependent, heterogen din punct de vedere al cauzelor genetice. Mutațiile implicate în MODY afectează dezvoltarea/diferențierea sau funcționarea celulelor pancreatice în diferite moduri; acestea se reflectă în diferențe în ceea ce privește vârsta de debut, gravitatea hiperglicemiei și riscul apariției complicațiilor (Ellard & Hattersley, 2008).

Mutațiile care duc la pierderea funcției în genele pentru glucokinază (GCK) și factorul nuclear hepatic 1 (HNF1A) sunt cea mai comună cauză a diabetului monogenic și apar la aproximativ 80% din pacienții diagnosticați cu diabet monogenic în Marea Britanie (Ellard, Thomas, Edghill, & Owens, 2007). Mutațiile care afectează gena HNF4A sunt de asemenea o cauză pentru MODY (Molven & Njølstad, 2011).

SNP rs1799884 în gena GCK este unul din SNP relativ comune care au fost asociate cu apariția diabetului de studiu DESIR (Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome) realizat pe 3877 de indivizi caucasieni. Indivizii homozigoți A:A sau heterozigoți A:G prezintă un risc crescut de a dezvolta diabet de tip 2 (Vaxillaire et al., 2007).

SNP rs2144908 în gena HNF4a a fost asociat cu riscul crescut pentru diabet de tip 2 în studii realizate pe populații de evrei ashkenazi (Love-Gregory et al., 2004) și finlandezi (Silander et al., 2004). De asemenea, este una din mutațiile vizate de studiul DESIR (Vaxillaire et al., 2007).

SNP rs1169288 în gena HNF1a a fost asociat cu apariția MODY 3 în studii realizate pe pacienți din Suedia și Finlanda (Giuffrida et al., 2009).

SNP rs3792267 în gena CAPN 10 a fost asociat cu diabetul de mai multe studii realizate pe populații europene din Germania, Finlanda, Danemarca, Marea Britanie, Polonia, Cehia și Franța (Tsuchiya et al., 2006).

O altă mutație pe care am urmărit-o în acest studiu este și cea mai comună mutație în ADN mitocondrial asociat cu diabetul: A3243G în gena care codifică ARNt Leu (MTTL1) (Janssen et al., 2007).

Tabel 1. Sumarul mutațiilor analizate

Gena	SNP	Element codificat	Funcția în celulă	Asociat cu
GCK	rs1799884 G A	Glucokinaza	Fosforilează glucoza la glucoză-6-fosfat	MODY
MTTL1	3243 A G	ARNt Leu mitocondrial/	ARNt pentru sinteza proteinelor	Diabet și surzenie transmise pe linie matern
HNF4A	rs2144908 G A	Factorul nuclear hepatic 4	Factor de transcriere	MODY
HNF1A	rs1169288 T G	Factorul nuclear hepatic 1	Factor de transcriere	MODY
CAPN10	rs3792267 G A	Calpain 10	Protează activ în pancreas	Rezistență la insulină

Tabelul 1 rezumă informațiile despre SNP selectate pentru a fi detectate în analiza cazului de la Suplacu.

Având în vedere vechimea și numărul șitelor arheologice (6000 de ani) secvențializarea genelor în întregime nu este o strategie fezabilă. Cel mai probabil, ADN este degradat și fragmentat, majoritatea fragmentelor având lungimi de câteva sute de perechi de baze. De aceea, am ales să folosesc amorse care să amplifice fragmente de 100-150 de perechi de baze în jurul mutației de interes. Amorsele au fost proiectate cu ajutorul aplicației NCBI primer BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Amorsele folosite se regăsesc în tabelul 2.

Tabel 2. Amorsele folosite pentru amplificarea secvențelor țintă

Gena	SNP	Amorse	Lungimea produsului PCR
GCK	rs1799884	Forward: CACATCCTAGCCTGCTTCCC Reverse: TGGTCACCATGACAACCACA	132

		Forward: GGTGTGGAGGGGGGATTCT	143
		Reverse: TTGCCACCAGTCCCAGTTTAA	
MTTL1	A3243G	Forward: TTATACCCACACCCACCCAAG	143
		Reverse: TACAATGAGGAGTAGGAGGT	
HNF4A	rs2144908	Forward: CCGTGGGGAACAAGGATGTAA	131
		Reverse: AGAGTCAGGAGATCAGGCC	
HNF1A	rs1169288	Forward: CCCTGTGGCAGCCGAG	141
		Reverse: TTCTCCAGCCAGGAGGTAGG	
CAPN10	rs3792267	Forward: ACACCGGATGCCAGAGAGTT	111
		Reverse: CATCCTACCAAGTCAAGGCT	

Analiza izotopic

Datarea cu radiocarbon a fost metoda folosită pentru a confirma vechimea estimată a scheletului de la Suplacu de Barcău.

Analiza izotopilor stabili de carbon și azot din colagenul din oase este folosită în studiile de bioarheologie pentru reconstrucția dietei/nutriției.

Se poate stabili dacă sursa primară de proteine din dietă era de origine animală, vegetală sau o combinație din cele două. Proporția izotopilor ^{15}N la ^{14}N indică nivelul trofic al unui organism. Animalele încorporează preferențial ^{15}N din surse alimentare. Adică, raportul ^{15}N la ^{14}N crește pe niveluri trofice succesive.

Cantitatea de ^{13}C raportată la ^{12}C este o măsură a dependenței alimentare de plante cu metabolism C3 sau C4. Atât plantele C3 cât și plantele C4 sunt mai sărace în ^{13}C decât sursa lor de carbon, CO_2 atmosferic. Datorită diferențelor din fotosinteză, plantele C3 încorporează mai puțin ^{13}C decât plantele C4 (Leatherdale, 2013).

Analiza a fost făcută extern, de către Beta Analytic Inc (Florida, SUA).

Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier este o tehnică prin care se poate obține un spectru de absorbție pentru un domeniu larg de spectre, simultan. FT-IR este folosit pentru a identifica și cuantifica grupările funcționale polare din structura unei probe (White, 1990).

FT-IR este o metodă potrivită pentru a evalua variațiile în compoziția chimică a osului. Măsurătorile cantitative ale compoziției chimice a osului pot oferi informații despre formarea osului și pot indica eventuale patologii.

Diabetul zaharat determină apariția unor anomalii musculo-scheletale: osteopenie/osteoporoză, și dificultăți în vindecarea oaselor lezate (Kim et al., 2001). Diabetul poate afecta formarea și resorbția oaselor prin determinarea multor modificări metabolice ce afectează echilibrul fosfo-calcic și acido-bazic.

Într-un studiu realizat pe șobolani diabetici s-a observat o scădere a conținutului total de colagen în calusul format după fracturi față de grupul control. Cantitatea de colagen a fost estimată prin măsurarea raportului fosfat/carbonat detectat prin FT-IR (Boyar et al., 2003).

Pentru analiza FT-IR s-a folosit pulbere de os obținută mecanic prin frezare. 0,8mg de pulbere de os au fost amestecate cu 150mg de KBr și presate la presa hidraulică la 175 kg/cm^2 . Spectrele FT-IR au fost obținute cu ajutorul aparatului FT/IR JASCO 6000, folosind platforma software Spectra Manager. S-a construit spectrul de absorbție între numere de undă 400 și 4000

cm^{-1} , cu 265 de scan ri și rezoluție de 4 cm^{-1} . Spectrele obținute au fost normalizate și prelucrate cu ajutorul softului Essential FTIR (<http://www.essentialftir.com/>).

Un spectru tipic pentru os este prezentat în figura 2.

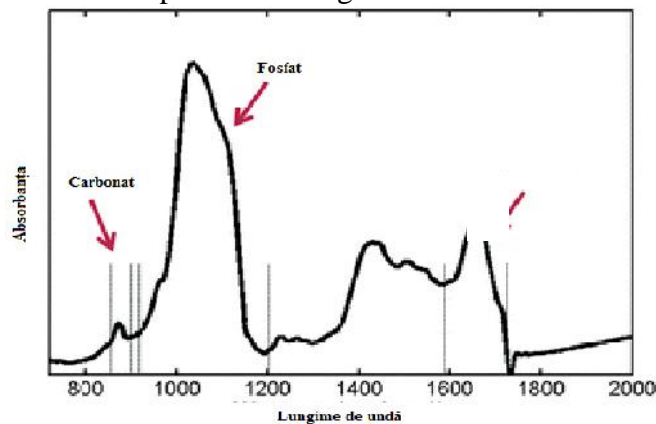


Fig.2. Spectru FT-IR tipic pentru os. (dup Kobrina et al., 2010)

Raportul carbonat la fosfat a fost calculat ca raportul dintre suprafața de sub maximul pentru CO_3^{2-} ($850\text{-}890 \text{ cm}^{-1}$) și PO_4^{3-} ($900\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) (Boyar et al., 2003).

Metode moleculare

Extracția ADN

O caracteristică a lucrului cu ADN vechi este necesitatea de a evita contaminările cu ADN din surse externe. ADN vechi se găsește degradat și în cantități mici. În cazul unei contaminări cu ADN extern, în reacția PCR va fi folosit ca matriță ADN mai puțin degradat. Din această cauză în laboratoarele de ADN vechi trebuie să existe un circuit cu un singur sens: extracția ADN, PCR, prelucrare post-PCR. Asta înseamnă că laboratorul de extracție ADN este izolat spațial de laboratorul de PCR.

Pentru a evita contaminarea între probe succesive, laboratorul este curățat înainte de fiecare utilizare cu o soluție de 5% Clor și iradiat cu UV. Extracția se face într-o hotă închisă cu presiune pozitivă și filtre de aer HEPA. Interiorul hotei se curăță cu soluția de Clor înainte de fiecare extracție, și lămpile UV funcționează minim 4 ore înainte de introducerea probelor.

Accesul în laborator se face individual; echipamentul standard este format din: combinezon de unic folosință, acoperitori de încălțăminte, mănuși din latex și mască cu filtru pentru particule.

Toate tuburile de plastic folosite în procesul de extracție sunt sterilizate prin autoclavare și iradiere cu UV.

Datorită înținuării, în probe există acizi humici din sol. Aceștia, dar și calciul din oase, sunt inhibitori ai reacției PCR. Decalcifierea oaselor este o etapă obligatorie înainte de extracția propriu-zisă.

Cum nu există un protocol de extracție a ADN vechi care să fie eficient în orice situație, fiecare grup de cercetare își stabilește propriul protocol prin adaptarea celor deja existente. Am folosit două metode de extracție: una bazată pe un protocol clasic cu fenol-cloroform și cealaltă

utilizând un kit de purificare a produ ilor de PCR. Sursele de ADN folosit sunt oasele lungi (femur, humerus) i molarii biradiculari.

Protocolul de extracție cu fenol cloroform a fost elaborat pe baza celor folosite de Hervella et al., 2012, Ginther et al., 1992 i Hagelberg & Clegg, 1991:

1. Cur țarea oaselor
 - Sp lare cu soluție clor 5% și H₂O UP/UV.
 - Iradiere cu UV 20 minute
 - Îndep rtarea suprafeței osului.
 - UV, 10 minute.

Osul sau dintele au fost apoi pulverizate cu ajutorul unei freze dentare, pulberea obținută fiind folosit în etapele urm toare.

2. Decalcifierea
 - Soluție de decalcifiere: EDTA 0,5M, SDS 0,5%, TrisHCl 50mM, proteinază K 1 mg/ml, pH=9.

Pulberea de os este incubat cu soluția de decalcifiere timp de 24 de ore, la 56°C.

3. Extracția cu fenol-cloroform.
 - Centrifugare 5 min, 6.000x g.
 - 1 vol. Supernatant + 1 vol. fenol:cloroform 1:1. Centrifugare 15 min, 6.000x g.
 - 1 vol. faza organic (superioar) + 1 vol. fenol:cloroform 1:1. Centrifugare 15 min, 6.000x g.
 - 1 vol. faza organic + 1 vol. cloroform. Centrifugare 15 min, 6.000x g.
 - Precipitare cu etanol: 1 vol. faza organic + 2,5 vol. etanol absolut, 10 min la -4°C. Centrifugare 15 min, 12.400x g.
 - Sp lare cu etanol: Precipitatul + 1 mL etanol 80%. Centrifugare 5 min, 12.400x g.
 - Uscare la 56°C.
 - Precipitatul se resuspend în 1 mL H₂O PCR-grade.
4. Filtrare prin filtre Centricon 30k. Centrifugare 10 minute, 5.000x g.

Protocolul de extracție cu kit QIAQuick PCR Purification Kit (Quiagen) cu coloane cu membran de silica (Yang et al., 1998; Anderung et al., 2008):

1. Cur țarea oaselor se face prin aceeași metodă ca în protocolul de extracție cu fenol-cloroform .

2. Decalcifiere
 - Soluție de decalcifiere EDTA 0,5M, SDS 5%, proteinază K 20 mg/mL.

Pulberea de os este incubat cu soluția de decalcifiere timp de 24 de ore, la 55°C apoi înc 24 de ore la 37°C.

3. Extracția ADN
 - Centrifugare 5 min, 2.000x g.
 - Supernatantul + 5 vol. PB Buffer.

- Amestecul se filtrează printr-o coloană cu silica prin centrifugare 1 minut la 12.400x g. Se aruncă filtratul.
4. Spălare
 - Se încarcă 750µL PE Buffer în coloană și se centrifughează 1 minut la 12.400x g. Se aruncă filtratul și se repetă pasul de spălare.
 - Se aruncă filtratul și se centrifughează 1 min la 12.400x g pentru îndepărtarea completă a etanolului.
 5. Eluare.
 - Se transferă coloana în tub nou de 1,5mL și se adaugă 100µL Elution Buffer. Se incubează la temperatura camerei timp de 5 minute.
 - Centrifugare 1 minut la 12.400x g.

Evaluarea randamentului extracției a fost bazată pe determinarea spectrofotometrică a concentrației ADN.

PCR

În laboratorul de PCR s-au urmărit aceleași condiții de sterilitate ca și în cel de extracție.

Pentru amplificarea fragmentelor de interes s-au folosit amorsele descrise în tabelul 2.

Înainte de utilizarea lor în lab de ADN vechi, amorsele au fost întâi testate pe probe moderne de ADN uman.

Pentru optimizarea PCR cu ADN vechi, am testat o serie de polimeraze: MangoTaq (Bioline), Kapa2G Robust HotStart (Kapa Biosystems), Kapa2G Robust (Kapa Biosystems), Kapa HiFi HotStart (Kapa Biosystems), MyTaq (Bioline), PlatinumTaq (Invitrogen). Mango Taq a dat cele mai bune rezultate, așadar a fost folosită în majoritatea reacțiilor.

Protocolul de bază pentru volum final 25µL.

	Concentrația inițială	Volum inițial	Concentrația finală	Program
Buffer	5x	5µL	1x	
MgCl₂	50mM	1µL	2mM	
dNTP	10mM	0,5µL	0,2mM	95°C – 5'
Forward	10pmoli/µL	1,25µL	0,5pmoli/µL	95°C - 30''
Reverse	10pmoli/µL	1,25µL	0,5pmoli/µL	Ta - 30''
MangoTaq	5U/µL	0,25µL	1,25 U/reacție	72°C – 30''
ADN		1µL		95°C – 5'
H₂O		14,75µL		

Optimizarea protocolului de PCR a fost făcută prin modificări ale concentrației de MgCl₂ (între 2 și 2,5mM), numărului de cicluri (între 30 și 40), cantității de ADN (între 0,5 și 7 µL).

Verificarea existenței ampliconului de dimensiunea așteptată s-a făcut prin electroforeză în gel de agaroz (1,5% agaroz).

În cazul în care există ampliconul așteptat, banda a fost excizată din gel și ADN purificat cu ajutorul kitului FavorPrep™ GEL Purification Kit (Favorgen).

Clonare si secvențializare

Înainte de secvențializare este necesar o etapă de clonare. Astfel se pot selecta pentru secvențializare doar plasmidele care conțin insertul de dimensiunea dorită; iar după obținerea secvențelor se poate face distincția dintre o mutație (care apare în toate clonele) și o eroare datorată degradării postmortem (care apare doar în unele clone).

Pentru clonare a fost folosit kitul CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Bacteriile competente folosite au fost *E.coli* XL1-Blue sau *E. coli* DH5 .

Bacteriile transformate au fost inoculate pe plăci cu mediu LB solid și ampicilină 100 mg/L. Au fost folosite 6 colonii/placă care au fost transferate în 4 mL de mediu LB cu 100 mg/L ampicilină și incubate la 37°C cu agitare continuă timp de 16 ore. Plasmidele au fost izolate cu ajutorul GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Scientific).

Prezența insertului a fost verificată prin digestie cu enzima *Bgl* II și electroforeză .

Interpretarea secvențelor

Pentru fiecare produs PCR de interes au fost secvențializate 6 clone de către Macrogen Inc (Coreea de Sud).

Analiza secvențelor obținute a fost făcută cu ajutorul softului BioEdit.

Rezultate și discuții

Antropologie fizic

Scheletul aparține unui bărbat cu vârsta cuprinsă între 33 și 45 de ani. Scheletul este bine conservat, cu excepția cutiei craniene. Lipsesc 4 dinți datorită proceselor postmortem.

Din 32 de dinți permanenți ruși, individul a pierdut 11 în timpul vieții. În ceea ce privește patologiile dentare, se pot observa 5 abcese și 4 carii. Uzura suprafeței molarilor este moderată până la severă (scoruri între 4 și 8 conform Data Collection Codebook, (Steckel et al., 2011)). În plus, caninul maxilar stâng prezintă o uzură neobișnuită pe latura linguală care sugerează o utilizare specială, non-alimentară . (figura 3) Hipoplazia smalțului nu există sau nu a putut fi observată din cauza numărului mare de dinți pierduți.



Fig.3. Caninul maxilar stâng.

În analiza scheletului au fost urmăriți și o serie de markeri specifici pentru stresul profesional, stresul nutrițional sau patologii nespecifice.

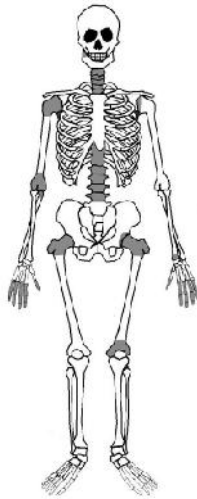


Fig.4. Distribuția proceselor degenerative

Au fost observate modificări degenerative în mai multe articulații (figura 4). În ceea ce privește membrele superioare, cel drept este mai afectat, procesele degenerative fiind prezente pe capul humeral și oasele mâinii. În cazul membrelor inferioare, este afectată centura pelviană: acetabulul și capul femural.

Toate regiunile coloanei vertebrale prezintă osteofite de dimensiuni medii. În plus, ultimele două vertebre lombare sunt sudate între ele și cu prima vertebră sacrală prin formațiuni osoase specifice pentru DISH (Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis). DISH este caracterizat prin osificarea ligamentelor longitudinale ale coloanei vertebrale ce rezultă în fuziunea vertebrelor afectate (Dupras et al., 2010). Poziția coloanei vertebrale este afectată de această fuziune anormală a vertebrelor. (figura 5)

Pe suprafața orbitei drepte se observă aspectul poros caracteristic pentru *cribra orbitalia*.(figura 6)



Fig. 5. DISH

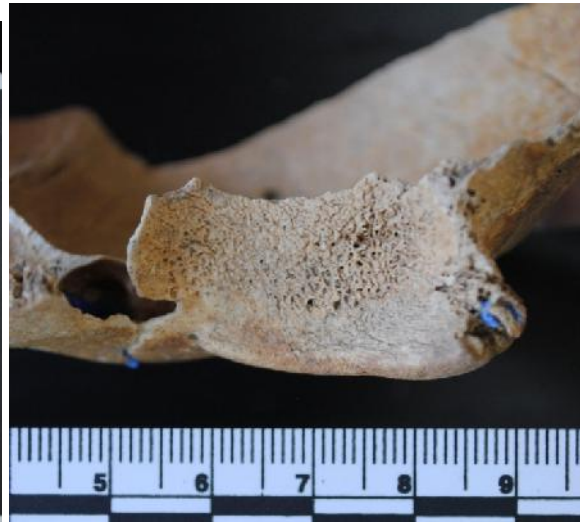


Fig. 6. *Cribra orbitalia*

Pe diafizele tibiilor se observă urme de osteoperiosit .

Patru dintre coaste prezintă fracturi antemortem remodelate. Starea precară de conservare a coastelor nu a permis stabilirea poziției acestora în cadrul cutiei toracice. Deși fracturile sunt bine aliniată, în procesul de vindecare s-a produs calus osos în zona leziunii.

Cele mai notabile modificări patologice prezente pe acest schelet sunt leziunile litice bilaterale pe calcaneale. Leziunile sunt situate pe tuberozitatea calcaneului, în punctul de inserție al tendonului lui Ahile. Calcaneul drept este cel mai afectat; leziunea măsurată 18,5 x 23,6 mm. Formarea exostozei în jurul marginii leziunii sugerează că piciorul a fost folosit după dezvoltarea infecției. Trăsăturile morfologice indică faptul că infecția era activă în momentul morții individului. Modificările observate pe calcaneul stâng indică o infecție similară, dar într-un stadiu mai puțin avansat. Tuberozitatea calcaneului stâng prezintă erodare, cu patru cavități de dimensiuni mici (figura 7).



Fig. 7. Leziuni pe calcaneale

Pentru a evalua gradul de extindere a leziunilor, au fost făcute radiografiile pentru aceste oase. (figura 8.)

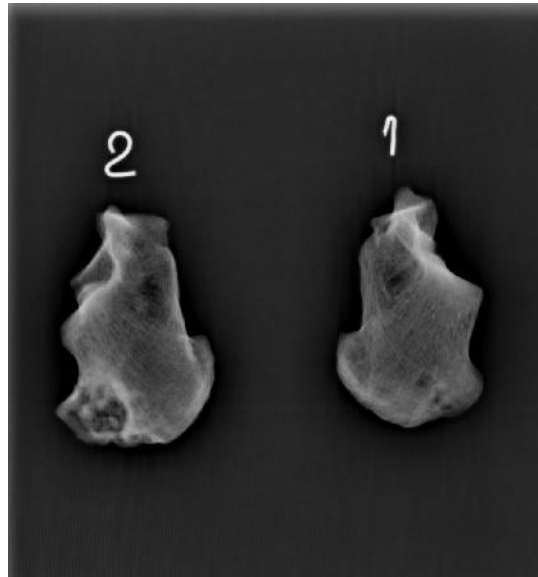


Fig. 8. Radiografiile cu raze X ale oaselor calcaneee.

Diagnosticul diferențial

Individul a suferit o serie de modificări patologice și traume descrise în analiza de mai sus. Pentru a le determina cauza, mai multe variante de diagnostic au fost luate în considerare: osteomielite, tuberculoza, bruceloza și diabetul zaharat.

Punctul de plecare în acest diagnostic au fost leziunile de pe calcaneee. Acestea ar putea fi datorate “piciorului diabetic”, o complicație comună a diabetului netratat.

Alte simptome asociate cu diabetul sunt capsulita adezivă (limitarea mobilității articulației gleno-humerale) și DISH (Dupras et al., 2010).

Asocierea diabetului cu patologiile dentare este de asemenea un motiv în plus pentru susținerea diagnosticului de diabet. Complicațiile diabetului netratat includ gingivita, periodontita, cariile, xerostomia și pierderea dinților (Dupras et al., 2010).

Analiza izotopică

Vârsta scheletului, determinat prin metoda datării cu radiocarbon este 5890 ± 30 ani.

Raportul $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ în colagenul din oasele scheletului de la Suplacu este -20,7. Pentru plantele C3, raportul este -27,1, iar pentru plantele C4, -13,1. De aici rezultă că ponderea plantelor C3 și a celor C4 era echilibrată în dieta acestui individ.

Raportul $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ este +10,1. În lipsa unor rămășițe scheletice din același sit, raportul acesta poate fi interpretat prin comparație cu o populație de vechime asemănătoare (Richards et al., 2003). Raportul $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ este mai mare decât al animalelor ierbivore, ceea ce indică o dietă a acestui individ bogată în proteine animale.

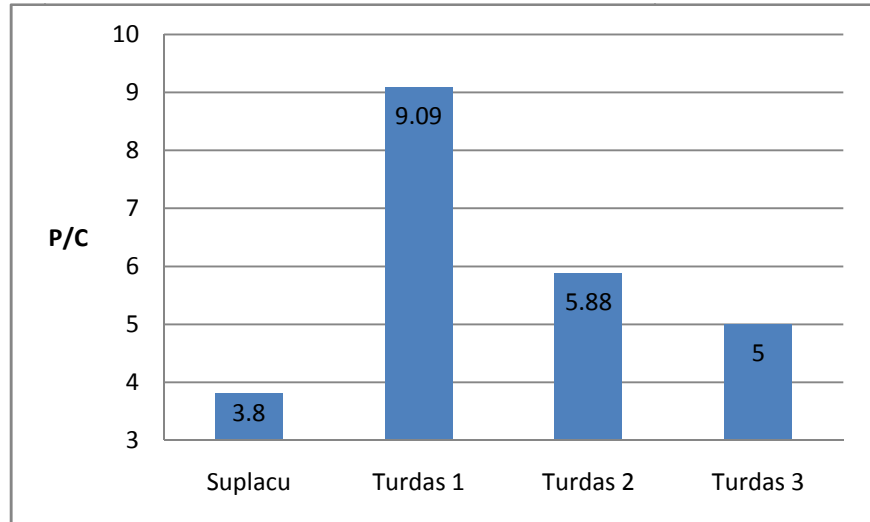
Spectroscopie în infraro u cu transformat Fourier (FT-IR)

Raportul carbonat la fosfat a fost calculat ca raportul dintre suprafața de sub maximul pentru CO_3^{2-} ($850\text{-}890\text{ cm}^{-1}$) și PO_4^{3-} ($900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$).

Am comparat valorile raportului fosfat/carbonat între oase neafectate de patologii pentru Suplacu și 3 indivizi din situl arheologic neolitic de la Turdaș. Datele obținute sunt în tabelul 3 și reprezentate în graficul 1.

Tabel 3. Raportul fosfat / carbonat pentru oase neafectate

Proba	Fosfat/carbonat
Suplacu	3.8
Turda 1	9.09
Turda 2	5.88
Turda 3	5

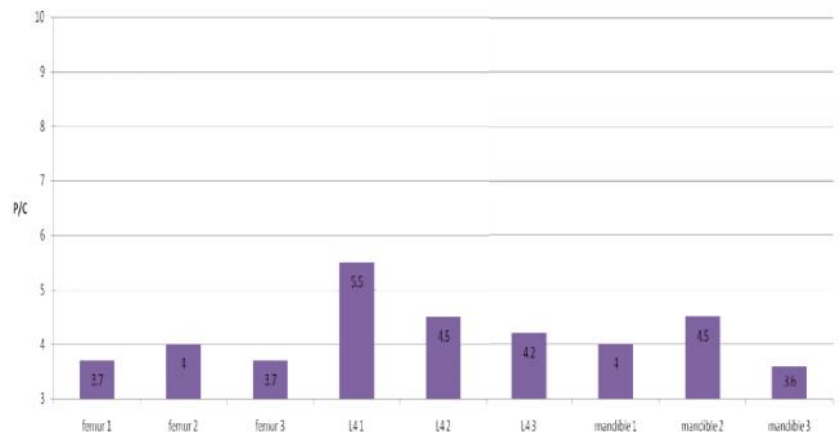


Grafic 1. Comparația raportului fosfat/carbonat între individul de la Suplacu și indivizii aparent sănătoși.

Pentru a evalua variația între diverse zone ale scheletului, am comparat valorile obținute pentru oase neafectate vizibil (femur) și oase cu modificări patologice (vertebra L4, mandibula). Datele obținute sunt în tabelul 4 și reprezentate în graficul 1.

Tabel 4. Raportul fosfat / carbonat pentru diferite zone ale scheletului

Proba	Fosfat/carbonat
femur 1	3.7
femur 2	4
femur 3	3.7
L4 1	5.5
L4 2	4.5
L4 3	4.2
mandibula 1	4
mandibula 2	4.5
mandibula 3	3.6



Grafic 2. Comparația raportului fosfat/carbonat în diferite zone ale scheletului.

Modificarea raportului fosfat/carbonat în scheletul de la Suplacu poate indica o dereglare a echilibrului fosfo-calcic ce poate fi explicat prin mobilizarea fosfatului din oase. Osteopenia observat în radiografii este în concordanță cu acest rezultat.

O dereglare a metabolismului fosforului se poate explica și prin corelația cu o insuficiență renal datorat nefropatiei diabetice (Silva et al., 2013).

ADN

Extracția ADN prin metoda cu coloane cu membrană de silica s-a dovedit a fi mai eficient decât cea cu fenol-cloroform, din punct de vedere al concentrației ADN, dar mai ales prin lipsa contaminării cu fenol și a randamentului reacțiilor PCR.

Amorsele au fost întâi testate în reacții PCR cu ADN modern (3 probe și un control negativ) (figura 9).

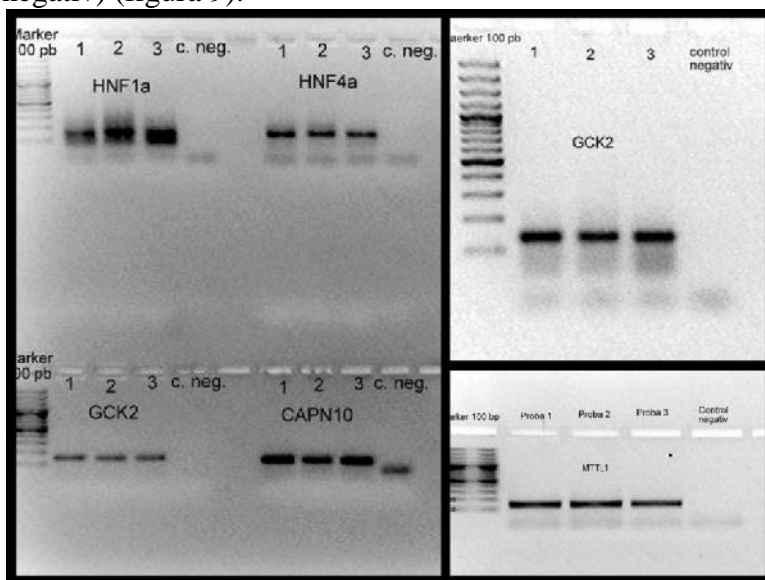


Fig. 9. Testarea amorselor cu ADN modern.

Fragmentele de interes au fost amplificate (figura 10) și clonate.

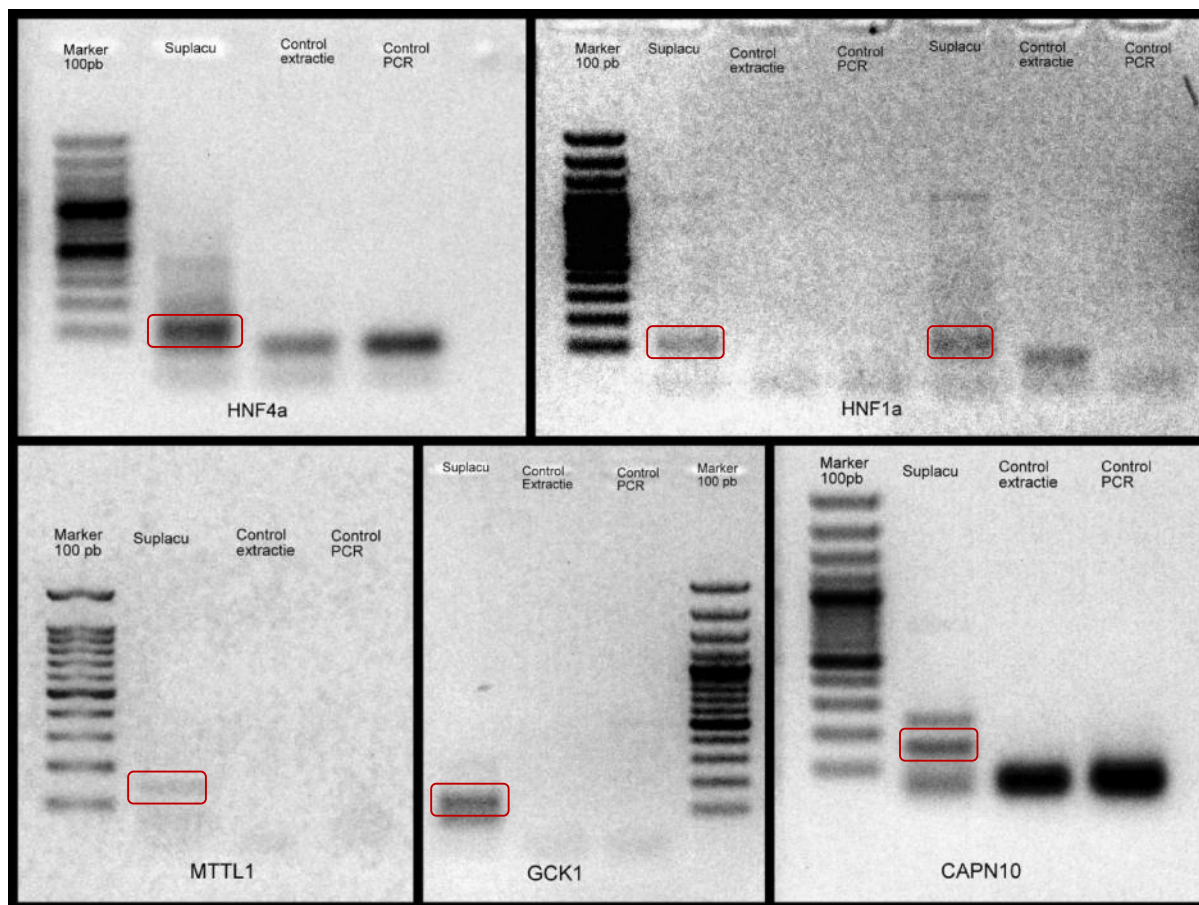


Fig. 10. PCR cu ADN vechi.

Secvențele obținute pentru MTTL1 (în reacții duplicate) și GCK nu indică prezența SNP vizate. Repetarea secvențializării pentru GCK a returnat secvențe care se aliniază parțial cu secvența de referință și conțin deleții. Celelalte secvențe nu au fost informative, fie pentru că nu se aliniază în zona nucleotidului vizat, sau conțineau amplificări nespecifice din ADN bacterian din sol.

Discuții

Modificările patologice observate pe scheletul individului de la Suplacu de Barcău sunt asemănătoare cu cele pe baza cărora a fost diagnosticat cu diabet scheletul de la Dayr al-Barsha, Egipt.

Rezultatele obținute prin FT-IR indică o afecțiune care afectează întreg scheletul (sistemic).

Absența mutațiilor vizate indică, fie faptul că sunt mutații mai rare, care au o frecvență mai redusă în populația contemporană, fie faptul că segmentele selectate pentru analiză nu conțin acele SNP care conduc la apariția diabetului la acest individ.

Concluzii

Analiza scheletului cercetat pe parcursul acestei teze a condus autorii spre un diagnostic prezumptiv de diabet zaharat de tip 2 cu debut la maturitate pe baza analizei antropologice fizice. Teza are ca obiect încercarea de confirmare a diagnosticului prin metode de genetic molecular prin analiza a cinci SNP dintre care unul aparținând genomului mitocondrial și patru genomului nuclear.

Niciuna din mutațiile așteptate nu a fost revelată, fie datorită absenței sale, fie datorită faptului că ADN vechi obținut a fost prea alterat pentru a conduce la amplificarea țintelor.

Studiul va continua cu validarea rezultatelor obținute și extinderea analizei la alte segmente țintă omise până în acest moment.

Pe lângă analiza antropologic fizic, care susține în continuare diagnosticul de diabet de tip 2 cu debut la maturitate, și analizele FT-IR vin să întărească acest diagnostic.

Studiul VI.

Mormântul 10 din Biserica Sf. Nicolae Domnesc de la Curtea de Argeș

(CO i P1 – Adrian Ioniță, Alexandru Simon, Beatrice Kelemen)

Obiectivele studiului preliminar

1. Analizarea regiunii de control a genomului mitocondrial în vederea predicției haplogrupului mitocondrial
2. Verificarea prin metode moleculare a sexului individului
3. Verificarea apartenenței individului la haplogrupul Y Ra1a, cel mai vechi haplogrup Y descoperit la indivizi moderni purtând numele Basarab
4. Verificarea prin metode moleculare a culorii ochilor (principal), p rului (secundar) pentru individul studiat

Extracția de ADN (realizată după protocolul Yang et al, 1998) a permis recuperarea a 100 microlitri ADN total cu o concentrație de 18ng/microlitru.

1. După amplificarea, clonarea și secvențializarea celor 8 fragmente care reconstruiesc regiunea de control a genomului mitocondrial, pentru individul M10 de la Biserica Sf. Nicolae din Curtea de Argeș au fost identificate următoarele mutații care îl diferențiază de rCRS (revised Cambridge Reference Sequence):

16093C 16291T 39T 73G 152C? 185A 263G

Analiza de predicție a haplogrupului mitocondrial a fost efectuată folosind platforma Haplogrep (haplogrep.uibk.ac.at).

Cele mai probabile încadrări sunt, în acest moment:

Haplogrup M5a1a - 73-185-263

Haplogrup H3v2 - 16093-73-263

Apartenența exactă la unul din cele două haplogrupuri va fi verificată după o extracție ulterioară de ADN prin amplificarea, clonarea și secvențializarea mutațiilor de diagnostic din regiunea codificatoare a genomului mitocondrial.

Conform Eupedia haplogrupul M5a1a are o frecvență crescută în populația modernă din subcontinentul Indian, în timp ce haplogrupul H3v2 are frecvență crescută în populația modernă din Germania (țările Germanice).

Secvența obținută pentru acest marker molecular la individul M10 a fost comparată cu singurele date moleculare omoloage publicate pentru o comunitate cumană din punct de vedere cultural, dar vestice din punct de vedere molecular (Bogacsi-Szabo et al, 2005). Între cei 11 indivizi analizați în cadrul acestui studiu, nu a fost semnalată prezența haplogrupului M5a1a, iar indivizii majoritari, încadrați în haplogrupul H, nu au fost încadrați exact într-un subhaplogrup.

Până la identificarea exactă a haplogrupului/haplotipului mitocondrial, orice supoziție privind o potențială ereditate maternă legată de continental Asiatic și eventual migratori din această regiune, nu poate fi verificată.

2. ADN-ul extras a avut o calitate suficient de bună pentru a permite amplificarea unor fragmente relevante din genele ce codifică amelogenina pe cromozomii X și Y în vederea atribuirii prin metode moleculare a sexului. Rezultatul acestei amplificări a condus la concluzia că individul M10 aparține sexului bărbătesc. Deși inventarul individului și analiza de antropologie fizică au preconizat această concluzie, atribuirea moleculară a sexului îndepărtează orice fel de dubii în această privință.

3. Pornind de la studiul publicat de Martinez-Cruz et al, 2012, și datorită cantității limitate de ADN genomic disponibil am verificat apartenența individului la cel mai vechi haplogrup Y descoperit la purtători moderni ai numelui Basarab (și care, prin studii genealogice, pot să aibă următoare ascendență în familia istorică a Basarabilor). Acest haplogrup Y, R1a1, este definit de mutațiile M17 (rs3908 4G→3G) și M56 (rs2032622 A→T), care în urma investigațiilor nu au fost descoperite la individualul M10 din Curtea de Argeș. Astfel, excludem relația dintre individualul studiat și cei trei indivizi moderni purtând numele de Basarab (1 din Ungaria, 2 din județul Ilfov) încadrați în acest haplogrup. Analize ulterioare, după o extracție viitoare de ADN genomic, vor verifica apartenența lui M10 din Curtea de Argeș la celelalte 10 haplogrupuri Y caracterizate pentru indivizii moderni purtând numele Basarab.

4. Analizând 6 mutații punctiforme folosite în criminalistică și medicină legală pentru reconstrucția culorii ochilor și părului (Rs12913832 (HERC2), Rs1800407 (OCA2), Rs12896399 (SLC24A4), Rs16891982 (SLC4A2), Rs1393350 (TYR), Rs12203592 (IRF4)), se relevă faptul că individul M10 din Curtea de Argeș a avut cu o probabilitate de 97,3% ochi închiși la culoare și cu o probabilitate de 99,0% păr de culoare castaniu închis, ceea ce susține descoperirea inițială a unei șuvițe închise la culoare la deschiderea inițială a mormântului, dar și iconografia asociată adesea cu indivizii aparținând familiei Basarabilor.

Concluziile preliminare privind acest individ, bazate pe analiza contextelor arheologic, istoric și biologic este că :

- Aparține familiei Basarabilor, dar nu acele ramuri care conferă indivizilor moderni haplogrupul Y R1a1
- Nu este probabil, nici Vlaicu Vodă, nici Radu Vodă (ambele, nume sub care M10 a fost identificat anterior)
- Nu se pot trage concluzii privind o potențială ereditate cumană (cultural), asiatică (din punct de vedere genetic) nici pe linie maternă, nici pe linie paternă.

Pentru detalierea acestor concluzii sunt necesare analize ulterioare, care sunt limitate în acest moment, de absența unei cantități suficiente de ADN genomic.

Studiul VII. Copilul de la M l i e ti (MMPP)

(CO i P1 –Norbert Szeredai, Claudia Radu, Ioana Rusu, Beatrice Kelemen, Octavian Popescu)

Pentru analiza molecular a individului MMPP a fost extras ADN genomic din 5 coroane dentare deciduale (1 incisiv central, 1 incisiv lateral, 2 canini i 1 molar). La momentul decesului acestea erau incluse în maxilar i mandibul .

Dup cur țarea prin spălări succesive în clor 30%, etanol 96%, apă ultrapură și uscare la UV, probele nu au fost procesate suplimentar (folosirea frezei dentare, t iere etc.)

Pentru extractia de ADN genomic a fost folosit un protocol modificat dup Yang et al, 1998. Modific rile au vizat perioada de digestie cu proteinaz K, care a fost crescut de la 24h la 60h.

În urma extracției a fost obținut o cantitate de 100 microlitri ADN cu o concentrație de 54,80 ng/microlitru (Tabel 1).

Tabel 1. Cantitatea i calitatea ADN-ului genomic extras, în prob i blank

Sample	Concentration (ng/μl)	260/280
MMPP	54.8	1.47
Blank	1.9	1.17

Amorsele proiectate de Gabriel et al, 2002 au fost utilizate pentru amplificarea regiunilor hipervariabile I i II din regiunea de control a genomului mitocondrial (Figura 2a). Un exemplu de amplificare obținută pentru fragmentul HVRIIA este ilustrată mai jos (Figura 2b).

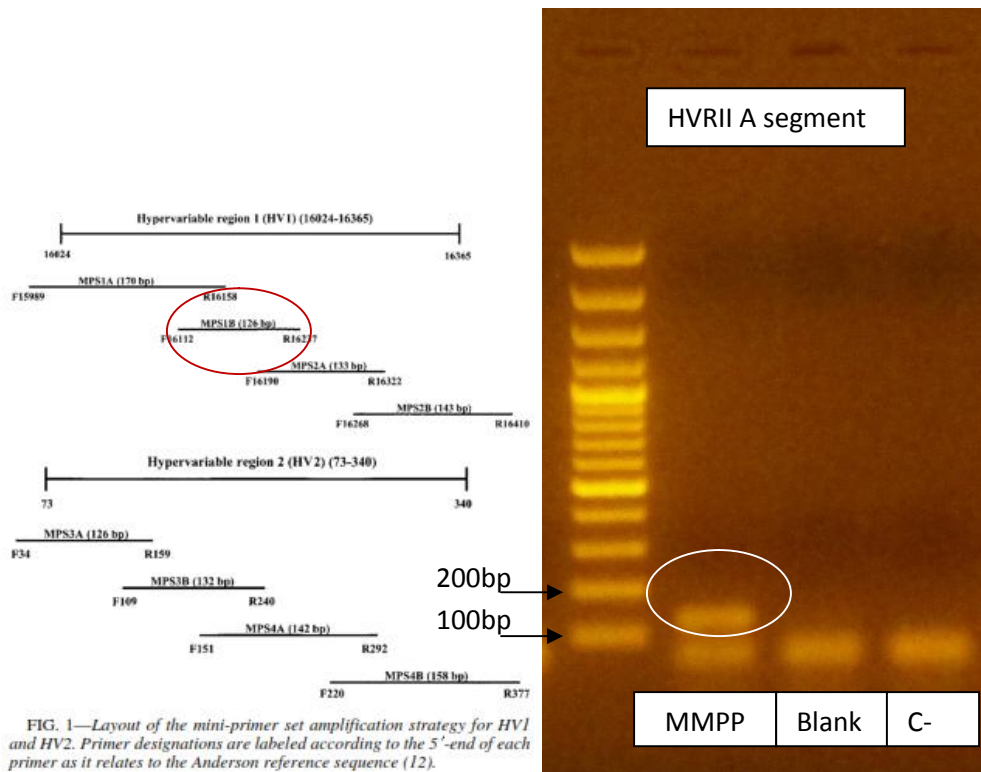


Figura 2. Amorsele Gabriel et al, 2002 i exemplu de rezultat al amplificării pentru fragmentul HVRIIA.

Toate cele opt fragmente au fost amplificate cu succes (în condiții de maxim monitorizare a contaminării: blancurile de extracție și controalele negative de amplificare nu au avut ampliconi), clonate și secvențializate.

Analiza secvențelor a permis identificarea mutațiilor punctiforme relative la rCRS (revised Cambridge Reference Sequence), care permit predicția haplogrupului mitocondrial (Figure 3).

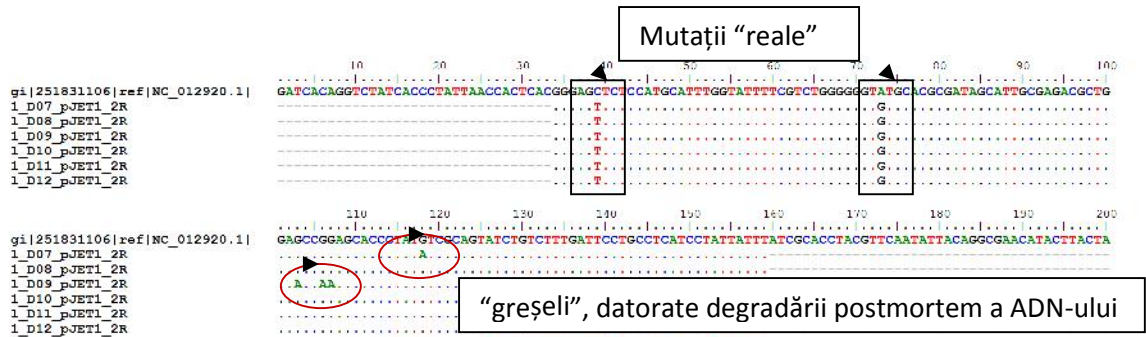


Figure 3. Example of multiple alignment of HVRII clones versus rCRS

Mutațiile acestui individ, raportate la rCRS sunt:

HVRI 16069, 16193, 16278

HVRII 39, 73, 150, 152, 235

Pe baza acestora, utilizând platforma Haplogrep (<http://haplogrep.uibk.ac.at/>), MMPP poate fi încadrat cu un grad mare de siguranță în haplogrupul mitocondrial J2b1a (Figura 4).

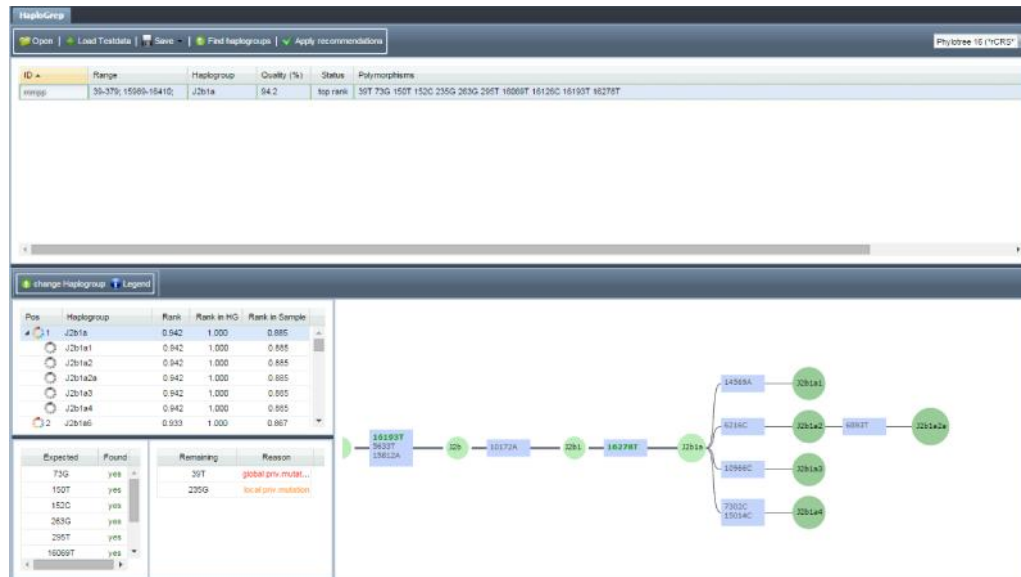


Figura 4. Predicția haplogruului în platform Haplogrep.

J2b1a este un haplogrup mitocondrial relativ recent, având o vechime de aproximativ 10000 de ani, este relativ rar și se găsește aproape exclusiv în populația modern europeană, sau în populații cu origine europeană. Este distribuit mai ales în vestul Europei, de-a lungul coastei nordice a Mării Mediterane, în Spania și Portugalia. Frecvențe populatōionale mai mici au fost raportate în literatură pentru Irlanda, Maroc, Grecia, Rusia și Moldova. Pala et al (2012) au analizat 27 de indivizi aparținând acestui

haplogrup și au ajuns la concluzia ca distribuția actuală a acestuia a fost puternic modelată de o recolonizare post glacial a Europei din refugii din Orientul Apropiat.

Patologiile identificate pentru acest individ izolat (potențial talasemie sau malarie) și distribuția actuală a haplogrupului J2b1a preponderant în zone cu frecvențe crescute ale ambelor patologii, cresc gradul de interes pentru acest studiu. Prezentăm mai jos o hartă cu incidența malariei în perioada 1900-2002 (Figura 5).

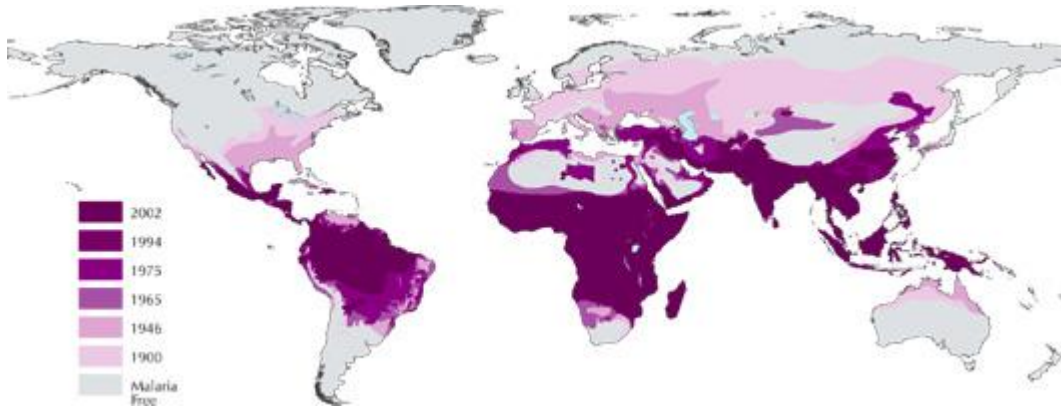


Figura 5. Harta incidenței malariei în perioada 1900-2002 (https://www.koshland-science-museum.org/sites/all/exhibits/exhib_infectious/malaria_vector_control_05.jsp).

MMPP are în comun, cu un singur individ modern încadrat în acest haplogrup, mutația din poziția 235 a genomului mitocondrial (Pala et al, 2012) – Număr de Acces GeneBank JQ797936, probabil identificat ca aparținând unui evreu cu ereditate europeană). Acest aspect, ne încurajează să atribuim individului MMPP haplotipul J2b1a2a, extrem de rar, caracterizat pentru doar două probe moderne de către Pala et al (2012): JQ797936 (numit anterior) și JF93891 (un individ din Portugalia) (Figura 6).

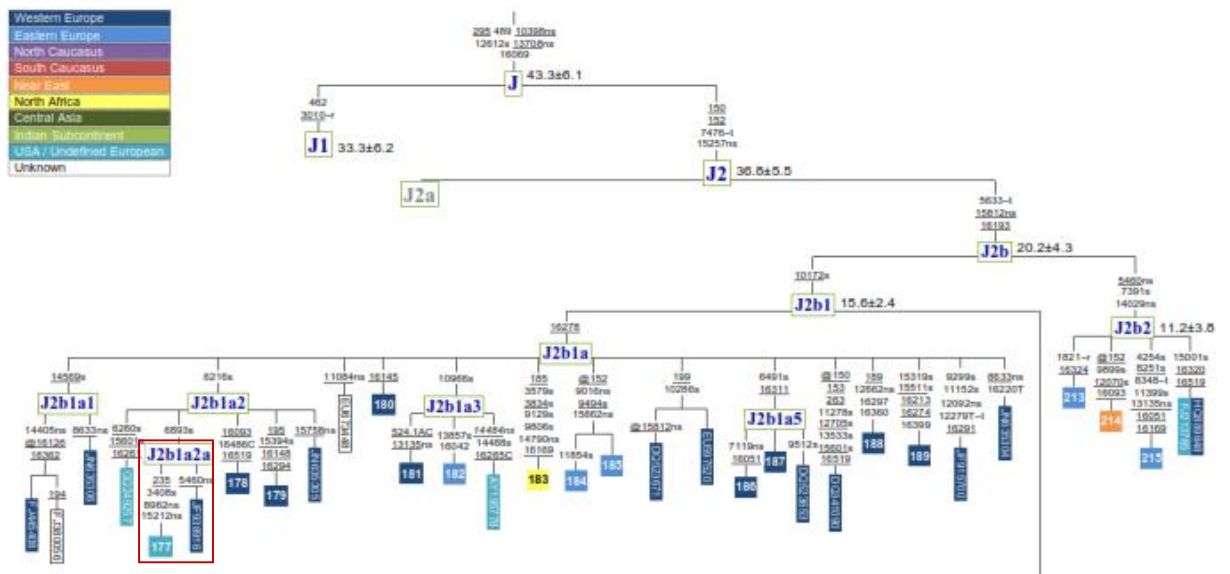


Figura 6. Arbore MP pentru haplogrupul J2 publicat de Pala et al (2012). Sunt marcați cei doi indivizi similari genetic cu MMPP.

Trei probe vechi, prezentând haplogrupul J2b1a aparțin grupului Schoningen (4100-3950 BC), culturii Salzmunde (3400-3100 BC) și culturii Unetice (2200-1550 BC) și au fost descoperite în Germania (Brandt et al, 2013). Acestea sunt mai diferite de haplotipul lui MMPP comparativ cu cele două probe moderne menționate mai sus.

Toate aceste aspecte, indică faptul că individul MMPP a fost un imigrant, probabil dintr-o zonă peri-mediteraneană. Momentul imigrării nu poate fi dedus pe baza datelor existente în acest moment.

Raport de analiz arheozoologic asupra materialului osteologic de la Sibiu (neolitic)
Lajos Kiraly
(text parțial)

Materialul arheozoologic analizat apar inând neoliticului însumeaz 1562 de resturi osoase. Dintre acestea, bovinele sunt cele mai reprezentative cu un procentaj de 16,77% (Tabel 1), dup numărul resturilor de oase identificate (NISP – *Number of Identifiable Specimens*). Ponderea atât de mare a taurinelor, ne arat faptul că această specie era crescută nu doar pentru carne, ci și pentru tracțiune și produse secundare (lapte, piele). Menționăm că a fost identificat și un humerus care ar putea prezenta un caz patologic (diafiza osului are o curbura mai accentuată).

În categoria cornutelor mici, ovicaprinele sunt reprezentate prin 75 fragmente osteologice și doar prin 5 fragmente osoase, caprinele. De la capre au fost identificate doar fragmente de carne. În cadrul lotului analizat, suinele ocup locul 3 ca importanță alimentară în lotul speciilor domestice evaluate. Cele mai multe resturi osoase provin de la mandibule și dinți izolați (Tabelul 2).

Au fost identificate 31 de fragmente apar inând cabalinelor, majoritatea resturilor (Tabelul 2) fiind dinți izolați (12 fragmente) și metatars (5 fragmente, unele sunt întregi).

Canidele ocup ultimul loc ca reprezentare în cadrul animalelor domestice evidențiate în lotul analizat, însumând un număr de 26 de resturi osoase (Tabelul 1), care apar în la cel puțin a doi indivizi, unul matur și unul tânăr/juvenil.

Dat fiind numărul prea mic de oase identificate, speciile sălbatice sunt mai slab reprezentate decât cele domestice. Dintre speciile sălbatice, specia cea mai bine reprezentată este cerbul (Tabelul 3) care se evidențiază prin 21 fragmente osteologice, dintre care cele mai multe sunt coarne (19 fragmente), un fragment metatars distal și o falangă proximală. Majoritatea coarnelor de cerb au urme de prelucrare, unele dintre acestea sunt probabil rebuturi rezultate în urma procesării.

Au fost analizate 8 fragmente osoase apar inând speciei *Lepus europaeus* (iepure) apar inând unui singur individ, iar 3 fragmente (un craniu, un fragment de os coxal și un femur) au fost atribuite unei specii de roztoare.

Cele mai puțin resturi apar în corpul priorului, cu un singur fragment de corn, bourul cu un molar și un fragment de craniu (?), care prezintă urme ale unor intervenții antropice și mistrețul de la care au fost identificați 2 canini inferioari.

În ceea ce privește pisicile și palmidele, acestea însumează 50 de resturi osoase (Tabelul 4), din care 7 fragmente provin de la gâina domestică, iar alte 43 de la găscă. Raportul dintre cele două fiind de 0,44 % (Tabelul 1), respectiv 2,75 %. Cu toate acestea din punct de vedere al procentajelor specia *Anser sp.* predomină, aceasta se datorează faptului că cele 43 de resturi osoase provin de la un schelet aproape complet.

Unele fragmente osoase prezintă urme de tăieturi (filetare) în anumite părți ale osului, de exemplu: la nivelul articulațiilor tăieturile sunt mai evidente fiind probabil rezultatul acțiunii de dezarticulare a scheletului; la nivelul apofizelor spinoase ale vertebrelor și la nivelul diafizelor, tăieturile sunt mai fine și sunt probabil rezultatul acțiunii de descarnare a osului. Menționăm că pe câteva fragmente osteologice apar și urme de procesare termică (arsură).

De asemenea, trebuie amintit faptul că în cadrul eantionului arheofaunistic, au fost găsite și oase moderne; acestea au o culoare deschisă și lucioasă, cu o structură mult mai fină decât ar fi trebuit să aibă în mod normal, dacă luăm în considerare timpul petrecut în sol. Aceste oase nu au fost luate în considerare la calcularea procentajelor.

Raportul analizei antropologice pentru materialul osteologic uman de la Capidava prelevat în cadrul campaniei din 2014

Claudia Radu, Szeredai Norbert

Protocolul de lucru al Laboratorului de Antropologie Fizic utilizează următoarele metode:

- Pentru determinarea sexului se observă morfologia craniului (creasta nucal, mastoida, marginea supraorbitală, glabella și mentonul), respectiv a pelvisului (concașitatea subpubică, unghiul subpubic, ramul ischiopubic, arcul ventral, arcul compozit, incizura sciatică și sulcusul preauricular). Analiza acestora este realizată conform metodelor descrise de Buikstra, Ubelaker (1994), Steckel et al. (2011), White, Black, Folkens (2012), Phenice (1969), Bruzek (2002).
- Pentru determinarea vârstei la adulți se analizează morfologia capetelor sternale (I can, Loth, Wright 1984), simfizei pubice (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011, Meindl et al. 1985), sinostoza suturilor craniene (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011) și uzura dentară (White et al. 2012). Pentru determinarea vârstei la non-adulți se observă erupția dentară (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011), se măsoară lungimea oaselor (Schaefer et al. 2009) și se observă sinostoza epifizelor (Schaefer et al. 2009).
- Statura este calculată după formulele lui Pearson (1899), Trotter, Gleser (1958), Bach (1965) și Breitinger (1937).
- Patologia este analizată conform descrierilor din Ortner (2003), Steckel et al. (2011), Buikstra, Ubelaker (1994), Aufderheide, Rodriguez-Martin (1998), Roberts, Manchester (2005) și Waldron (2009). În cadrul analizei preliminare, pentru toate scheletele se notează prezența artrozei articulațiilor, leziunilor periostitice, leziunilor specifice pentru *cribra orbitalia* și *cribra cranii*, nodulilor lui Schmorl, a distrugerii platoului vertebral și a aspectelor specifice rahitismului și scorbutului. Pentru artroza articulațiilor sunt observate următoarele elemente: articulația temporo-mandibulară, cavitatea glenoidă, humerusul proximal și distal, radiusul proximal și distal, ulna proximal și distal, oasele mâinii, fosa acetabulară, femurul proximal și distal, tibia proximal și distal, fibula proximal și distal, oasele piciorului și vertebrele (segmentele cervical, toracic și lombar). Pentru identificarea leziunilor periostitice se observă următoarele oase: clavicula, humerusul, radiusul, ulna, femurul, tibia și fibula (bilateral).
- Dentiția și patologia dentară se analizează conform standardelor din Buikstra, Ubelaker (1994) și Steckel et al. (2011).
- Traumele și fracturile se analizează după metodele descrise în Lovell (1997) și Buikstra, Ubelaker (1994).

Cu toate că materialul osteologic a prelevat din 8 morminte, unele dintre acestea au conținut oase de la mai mulți indivizi (4 cazuri). În aceste situații, al doilea individ a fost notat cu litera B. În cazul indivizilor non-adulți, vârsta a fost determinată pe baza erupției dentare și a lungimii oaselor. Deoarece în majoritatea cazurilor au existat diferențe mari între cele două rezultate, am optat pentru vârsta determinată pe baza erupției dentare. Acest lucru este motivat de studiile clinice și bioarheologice care au scos în evidență faptul că, comparativ cu dezvoltarea dentiției, creșterea și dezvoltarea scheletului este mult mai afectată de eventualele boli sau curențe nutriționale la care este expus copilul (Lewis 2007). Pentru indivizii sub 17 ani, sexul nu a fost determinat.

Mormântul 11

Cu toate că scheletul este relativ bine reprezentat, starea de conservare a oaselor este slabă, în cele mai multe cazuri compactul fiind distrus din sol. Am determinat vârsta la momentul morții pe baza erupției dentare, rezultatul fiind 7-8 ani. Pe baza lungimii oaselor, vârsta a fost de 5 ani. Scheletul prezintă un număr de 29 de dinți, dintre care 11 sunt deciduali erupți, 10 sunt permanenți erupți iar 8 sunt permanenți neerupți. Pe molarul 2 decidual de pe partea dreaptă a maxilarului există o carie interproximală. Pe dinții de pe corpul mandibular se poate observa tartru slab. Periodontita este de asemenea moderată pe dinții maxilari. Atât pe incisivii maxilari și mandibulari cât și pe caninii maxilari se pot observa linii hipoplazice moderate. De asemenea, pe toată dentiția deciduală se observă uzur avansată, cu expunerea dentinei. Din 10 oase lungi prezente, pe niciunul nu s-au observat leziuni periostitice. Nu am identificat porozitate specifică pentru cribra orbitalia și hiperostoza porotică. Dintre aspectele care pot indica prezența scorbutului sau a rahitismului, acest individ nu a prezentat niciunul. De obicei, la indivizii atât de mici este greu să se observe prezența artrozei articulațiilor. În cazul individului M11, s-au observat foarte clar schimbări degenerative pe ambii condilii mandibulari, parte a articulației temporo-mandibulare.

Mormântul 12

Scheletul este moderat reprezentat, fiind prezente elemente din calota craniană și oase lungi; scheletul axial este cel mai slab reprezentat. Conservarea acestora însă este bună. Din câte ne-a spus stratul dinți, prin urmare vârsta a putut fi determinată doar pe baza lungimii oaselor. Pe baza acestora din urmă putem spune că acest individ a murit la naștere, având o vârstă perinatală (38 de săptămâni prenatale). Din 10 oase lungi prezente, niciunul nu prezintă leziuni periostitice. Nu s-au putut observa orbitele, deci nu am putut determina prezența cribrei orbitalia. Pe elementele calotei craniene nu există leziuni specifice pentru hiperostoza porotică. De asemenea, nu s-au identificat aspecte patologice indicatoare pentru scorbut sau rahitism.

Mormântul 13

Individul M13A

Scheletul de non-adult este moderat reprezentat și conservat. Vârsta aproximată pe baza erupției dentare este între 18 și 24 de luni; pe baza lungimii oaselor rezultatul este inferior, între 6 și 12 luni. Se prezintă 10 dinți deciduali erupți, 5 deciduali neerupți și 4 permanenți neerupți. Nu s-a notat prezența tartrului, periostitei și a hipoplaziei smalțului. Din 11 oase lungi prezente, pe unul singur (tibia dreaptă) s-au observat leziuni periostitice slabe. Orbitele nu s-au putut observa. Pe suprafața endocraniană a occipitalului și a parietalelor există distrugere de os, numită în literatură „hair-on-end lesions” (Lewis 2004) (Fig. 1 și 2). De asemenea, pe suprafața exterioră a calotei craniene există porozitate accentuată. Alte aspecte patologice indicatoare pentru scorbut sau rahitism nu s-au observat.

Individul M13B

Scheletul este foarte slab reprezentat: fragmente de arcuri vertebrale, coaste, porțiunea proximală a radiusului drept, scapula dreaptă, fragment din clavicula dreaptă. Pe baza lungimii scapulei, vârsta la momentul morții a fost aproximată între 6 și 18 luni. Nu se păstrează dinți.

Mormântul 14

Scheletul este relativ bine reprezentat și conservat. Vârsta la momentul morții a fost determinată pe baza erupției dentare ca fiind între 6 și 9 luni. Pe baza lungimii oaselor, rezultatul este de 3-6 luni. Se păstrează 11 dinți deciduali neerupți. Pe acestia nu am observat aspecte patologice. Din 14 oase lungi prezintă, niciunul nu prezintă leziuni periostitice. Pe tavanul orbital nu există porozitate. S-a observat franjurarea capetelor costo-condrale, însă nu a fost afectat nici cortexul coastelor (Fig. 3). Atât deasupra cât și sub spina scapulară există porozitate (Fig. 4). Parietalele și occipitalul prezintă de asemenea leziuni distructive pe suprafața endocraniană, ca și în cazul individului M13A (Fig. 5).

Mormântul 15

Individul M15A

Scheletul este bine reprezentat, mai puțin oasele lungi ale mâinilor. Pe baza erupției dentare, vârsta la momentul morții a fost aproximată între 5-6 ani; lungimea oaselor a dat un rezultat inferior, între 4 și 4.5 ani. Se păstrează 17 dinți deciduali, 3 permanenți erupți și 13 permanenți neerupți. Nu s-a observat prezența tartrului sau a hipoplaziei enamelului. Se observă periodontită atât maxilară cât și mandibulară. Uzura dinților deciduali este accentuată, cu expunerea dentinei. Din 8 oase lungi, 3 prezintă leziuni periostitice: femurul drept, tibia dreaptă și tibia stângă. Orbitalele nu s-au păstrat. Pe suprafața calotei craniene nu există porozitate. Pe dintele axisului există un osicul, poziționat chiar în apexul dintelui (Fig. 6). Pe ambele femure, crista aspera este pronunțată iar în zona anterioară a metafizei proximale se poate observa o fațetă produsă prin articularea cu fosa acetabulară (Fig. 7). Pe femurul drept, pe metafiza distală, există de asemenea o cavitate poziționată pe locul de inserție al *biceps femoris*.

Individul M15B

Scheletul este slab reprezentat (falange, epifize, fibula, coasta). Vârsta la momentul morții aproximată pe baza lungimii fibulei este între 0 și 1.5 luni postpartum.

Mormântul 16

Scheletul este bine reprezentat și conservat. Vârsta la momentul morții aproximată pe baza erupției dentare este între 3 și 4 ani; pe baza lungimii oaselor rezultatul este între 2 și 2.5 ani. Se păstrează 19 dinți deciduali. Nu s-au observat aspecte patologice pe acestia în afară de uzur

puternic pe incisivii centrali. Din 11 oase lungi analizate, pe niciunul nu am identificat leziuni periostitice. Orbitalele nu s-au putut analiza. Pe craniu nu se observă porozitate. Capetele sternale ale coastelor sunt „franjurate”, cortexul este distrus și afectate de porozitate (Fig. 8). Pe cortexul corpului costal, se observă os nou depus, cu aspect neregulat și neorganizat. De asemenea și pe metafiza femorală se poate observa același tip de franjurare și prezența porozității. Lipsesc oasele piciorului stâng. Sutura metopică este deschisă, cu prelungire până la sutura coronară. Am identificat un fragment de arc vertebral aparținând unui copil cu o vârstă și mai mică.

Mormântul 17

Individul M17

Scheletul bine reprezentat și conservat aparține singurului adult săpat în această campanie. Vârsta la momentul morții a fost determinată pe baza morfologiei capetelor sternale, simfizei pubice și suprafeței auriculare, rezultatul fiind între 24 și 34 de ani. Pentru determinarea sexului, am analizat atât elementele craniene cât și cele ale pelvisului. Elementele craniene au o morfologie masculină, dar cele pelviene sunt mai feminine. Rezultatul este „posibil masculin”. Se pot strezui un număr de 32 de dinți permanenți. Pe molarul 1 maxilar de pe partea stângă există o carie interproximală și un abces dentar (Fig. 9). Pe mandibulă există tartru puternic. Periodontita poate fi observată pe maxilar. Hipoplazia smalțului este puternică pe toată dentiția, atât maxilar cât și mandibular (Fig. 10 și 11). Uzura este moderată. Din 32 de elemente de articulare analizate, 5 prezintă modificări degenerative (humerus proximal dreapta, radius distal dreapta, oasele mâinii drepte, vertebrele cervicale, radius distal stânga). La ambele picioare, falangele 2 și 3 de la al patrulea deget sunt unite. Pe axis există o fațetă de articulare a dintelui cu atlasul (Fig. 12). Din 13 oase lungi analizate pentru periostită, doar femurul de pe partea stângă prezintă astfel de leziuni. Pe craniu există porozitate. Orbitalele nu au putut fi analizate. Statura variază în funcție de formulele aplicate: pentru formula lui Pearson (1899) pentru femur, rezultatul este 155,28 cm; pentru formula lui Breitinget (1937) pentru femur, rezultatul este 161,91 cm.

Individul M17B

În timpul săpăturii, deasupra individului adult M17 s-au găsit, disparate, oase de la un subadult. Scheletul acestuia este reprezentat doar de 4 coaste, fragmente de vertebre, scapula și humerusul de pe partea stângă și o fibulă. Pe baza lungimii oaselor, vârsta acestui individ la momentul morții este perinatală, 38-40 de săptămâni prenatale.

Mormântul 19

Materialul osteologic notat cu M19 era amestecat. Există cu siguranță cel puțin doi indivizi, dar faptul că aceștia au aceeași vârstă a îngreunat asocierea oaselor cu fiecare individ. Am făcut acest lucru pe baza morfologiei și aspectului oaselor.

Individul M19A

Scheletul este bine reprezentat și conservat. Vârsta la momentul morții, determinată atât pe baza erupției dentare cât și a lungimii oaselor, este perinatală, 38-40 de săptămâni prenatale. Se pot streza 19 dinți deciduali neerupți. Nu s-a identificat nicio patologie dentară. Din 12 oase lungi prezente, pe niciunul nu există leziuni periostitice. Tavanul orbital nu prezintă schimbări patologice. Pe craniu (occipital și temporal) și pe scapula stângă se observă porozitate slabă. Metafizele oaselor lungi sunt slab franjurate, cu porozitate. De asemenea, diafiza tibiei de pe partea stângă pare a avea o curbura neobișnuită. Sutura metopică este deschisă și prelungită până la sutura coronară.

Individul M19B

Scheletul este reprezentat doar de coaste, diafizele humerale și femurul stâng. Pe baza lungimii oaselor, vârsta la momentul morții este perinatală, 38-40 de săptămâni prenatale. Nu se pot streza dinți. Cele trei diafize păstrate nu prezintă leziuni periostitice sau aspecte patologice indicatoare pentru scorbut și rahitism.

Alte oase

Printre oasele lui M16, am găsit un fragment de proces vertebral de la un copil (probabil nou-născut).

Printre oasele lui M17, pe lângă oasele lui M17B, mai există o falangă de la un alt copil.

Imagini

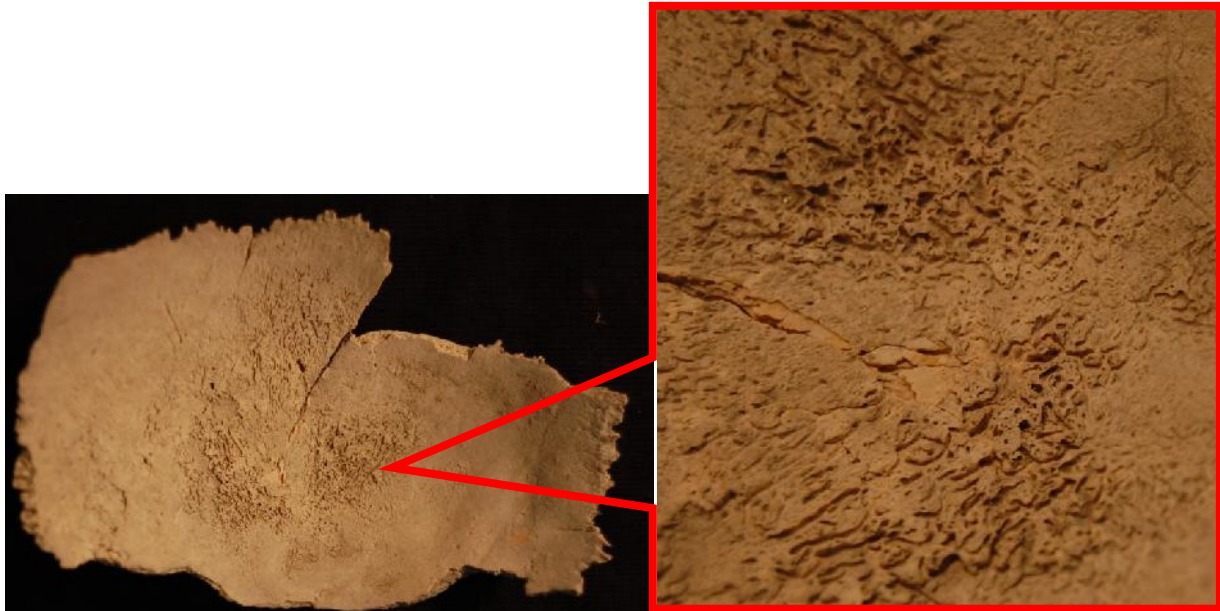


Fig. 1. Individul M13A. „Hair-on-end lesions” pe suprafața endocraniană.

Fig. 2. Individul M13A. Detaliu cu leziunile endocraniene.



Fig. 3. Individul M14. Franjurare capetelor sternale.



Fig. 4. Individul M14. Scapula dreapt cu porozitate sub spina scapular (cu detaliu).



Fig. 5. Individul M14. Leziuni endocraniene (cu detaliu).

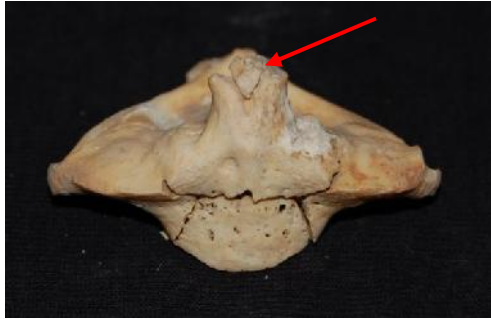


Fig. 6. Individul M15A. Axis.



Fig. 7. Individul M15A. Porțiunea proximală a femurului stâng. Se observă fațeta din zona trochanterului mare.



Fig. 8. Individul M16. Franjurarea capetelor sternale și os nou depus în zona leziunii (cu detaliu).

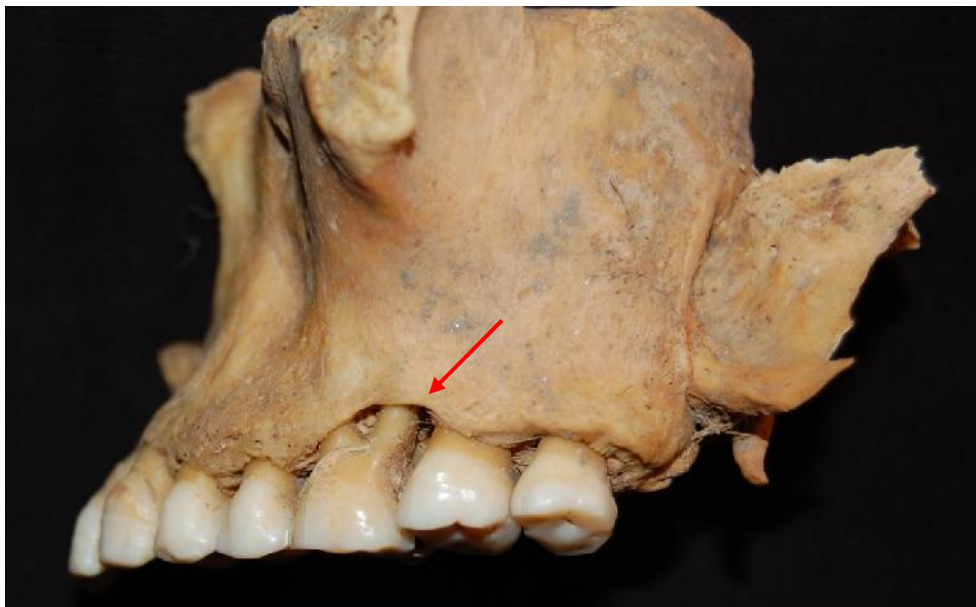


Fig. 9. Individul M17. Abces dentar (s geat) pe maxilar în zona primului molar.

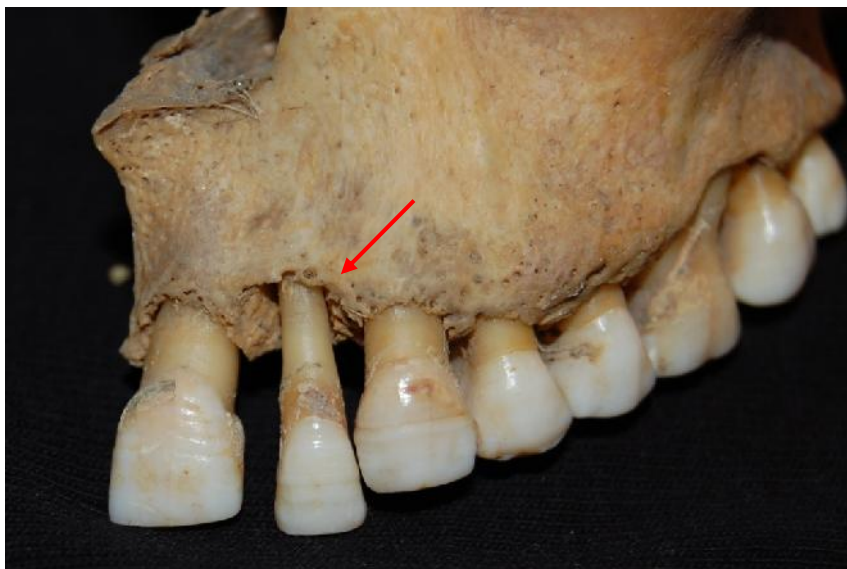


Fig. 10. Individul M17. Jum tatea stâng a maxilarului. Se observă periodontita avansată (s geat) și liniile hipoplazice pe smalțul dinților (detaliu mai jos).

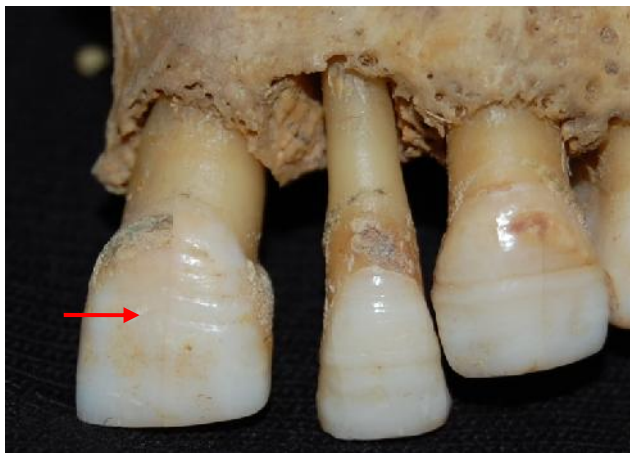


Fig. 11. (detaliu)



Fig. 12. Individul M17. Fațetă pe porțiunea posterioară a dintelui axisului.

Raportul analizei antropologice preliminare pentru materialul osteologic de la Cristian

Claudia Radu, Szeredai Norbert

Protocolul de lucru al Laboratorului de Antropologie Fizic utilizează următoarele metode:

- Pentru determinarea sexului se observă morfologia craniului (creasta nucală, mastoide, marginea supraorbitală, glabella și mentonul), respectiv a pelvisului (concașitatea subpubică, unghiul subpubic, ramul ischiopubic, arcul ventral, arcul compozit, incizura sciatică și sulcusul preauricular). Analiza acestora este realizată conform metodelor descrise de Buikstra, Ubelaker (1994), Steckel et al. (2011), White, Black, Folkens (2012), Phenice (1969), Bruzek (2002).
- Pentru determinarea vârstei la adulți se analizează morfologia capetelor sternale (I can, Loth, Wright 1984), simfizei pubice (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011, Meindl et al. 1985), sinostoza suturilor craniene (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011) și uzura dentară (White et al. 2012). Pentru determinarea vârstei la non-adulți se observă erupția dentară (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011), se măsoară lungimea oaselor (Schaefer et al. 2009) și se observă sinostoza epifizelor (Schaefer et al. 2009).
- Statura este calculată după formulele lui Pearson (1899), Trotter, Gleser (1958), Bach (1965) și Breitinger (1937).
- Patologia este analizată conform descrierilor din Ortner (2003), Steckel et al. (2011), Buikstra, Ubelaker (1994), Aufderheide, Rodriguez-Martin (1998) și Waldron (2009). În cadrul analizei preliminare pentru toate scheletele se notează prezența artrozei articulațiilor, leziunilor periostitice, leziunilor specifice pentru *cribra orbitalia* și *cribra cranii*, nodulilor lui Schmorl, a distrugerii platoului vertebral și a afecțiunilor specifice rahitismului și scorbutului. Pentru artroza articulațiilor sunt observate următoarele elemente: articulația temporo-mandibulară, cavitatea glenoidă, humerusul proximal și distal, radiusul proximal și distal, ulna proximal și distal, oasele mâinii, fosa acetabulară, femurul proximal și distal, tibia proximal și distal, fibula proximal și distal, oasele piciorului și vertebrele (segmentele cervical, toracic și lombar). Pentru identificarea leziunilor periostitice se observă următoarele oase: clavicula, humerusul, radiusul, ulna, femurul, tibia și fibula (bilateral).
- Dentiția și patologia dentară se analizează conform standardelor din Buikstra, Ubelaker (1994) și Steckel et al. (2011).
- Traumele și fracturile se analizează după metodele descrise în Lovell (1997) și Buikstra, Ubelaker (1994).

Materialul osteologic aparține unui număr de 6 indivizi. În unele cazuri s-a utilizat silicon dentar de culoare portocalie pentru lipirea fragmentelor osoase. Statura nu a putut fi calculată pentru niciun individ.

Mormântul 1

S-a analizat materialul osteologic de la doi indivizi, primiți în cutii separate (complexul 019), numiți M1 defunctul 1 și M1 „un defunct”, acesta din urmă fiind numit de noi M1B.

Scheletul individului M1 este slab reprezentat și conservat. Spălarea oaselor și dizolvarea pământului cu apă a rezultat în numeroase fragmente osoase dar foarte puține dintre acestea au putut fi reconstituite. Pentru a evita pierderea informației, materialul a fost analizat și înainte de spălarea, când încă era ținut în bulgării de pământ. Astfel am putut determina sexul individului, care este masculin (rezultat dat de morfologia elementelor craniene) (Fig.1). De asemenea, am notat faptul că lângă mandibulă, spre exemplu, am identificat diafiza unui humerus (Fig. 2). Pe suprafața orbitelor și a calotei craniene există porozitate specifică pentru *cribra orbitalia* și hiperostoza porotică (Fig. 3 și 4).

S-a păstrat un număr de 25 de dinți împreună cu fragmente din mandibulă și maxilar. Tartrul este slab spre moderat. Pe coroana caninului mandibular se observă un defect al smalțului, o linie hipoplazică extinsă (2.15 mm în grosime) (Fig. 5). Pe caninii maxilari și pe incisivii mandibulari nu există astfel de defecte. Uzura molarilor este slab spre moderată. Pe fragmentele osoase păstrate nu există leziuni periostitice.

Individul M1B este și mai slab păstrat, fiind reprezentat de fragmente craniene, din coxal și de oase lungi (Fig. 6). Pe lângă acestea, mai există 33 de dinți, dintre care 9 sunt deciduali, 12 sunt permanenți erupți, iar 12 sunt permanenți neerupți. Tartrul este moderat atât maxilar cât și mandibular. Nu am observat linii hipoplazice pe incisivi și canini. Uzura molarilor deciduali este puternică. Pe baza erupției dentare, am determinat vârsta la momentul morții între 7 și 8 ani. Pe fragmentele craniene nu se observă hiperostoza porotică.

Mormântul 2

Oasele umane ce compun materialul osteologic din acest mormânt aparțin cel puțin la doi indivizi. Primul individ este cel principal (pe baza gradului de reprezentare a oaselor) este probabil un bărbat (Fig. 10), cu o vârstă la momentul morții între 20 și 25 de ani. Scheletul prezintă un grad de reprezentare moderat iar oasele se păstrează într-o stare relativ bună (50-75%). De asemenea, s-au păstrat 4 dinți și fragmente din corpul mandibular și cel maxilar. Se observă tartru și periodontită slabă. Nu s-a putut nota prezența liniilor hipoplazice. Uzura dentară pe molari este moderată, specifică vârstei individului. Din 11 articulații prezente, niciuna nu prezintă schimbări degenerative (artroza articulațiilor). Din 12 oase lungi prezente, fragmentare sau întregi, doar pe unul (tibia dreaptă) s-au notat leziuni periostitice. Cu toate că orbitele nu s-au păstrat pentru a se observa prezența *cribrae orbitalia*, pe craniu există porozitate slabă, specifică pentru hiperostoza porotică.

De asemenea, pe craniu am mai observat o serie de aspecte. În primul rând, pe parietalul stâng, aproape de sutura sagitală, există o traumă produsă cu un obiect contondent și realizată antemortem (Fig. 7 și 9). Diametrul traumei este de 8.40 mm, cu o adâncime de 1.95 mm. Lângă această traumă se observă și o fractură, lungă de 72.2 mm (Fig. 8). Este posibil ca aceasta din

urm s fie o fractur radial cauzat de trauma inițială. Atât trauma circular cât i fractura sunt vindecate, de-a lungul fracturii existâng i calus de dimensiuni moderate. În al doilea rând, calota cranian este îngro at anormal în unele locuri, ceea ce poate sugera boala lui Paget sau hiperostoz frontal intern . Totu i, aceste aspecte identificate pe calota individului din mormântul 2 trebuie cercetate în continuare.

Cel de-al doilea individ, denumit de noi M2B, este slab reprezentat (oase lungi de la mân i picioare, fragment de maxilar, oase de la picior). Scheletul aparține unui adult dar sexul r mâne indeterminat. O singur articulație se păstrează, dar această nu prezintă schimbări degenerative. Din 5 oase lungi p strate fragmentar, pe niciunul nu se observ leziuni periostitice. S-au p strat 2 dinți în alveolă, parte din corpul maxilarului, ceea ce ne-a permis s spunem cu siguranță că acest maxilar nu aparține individului M2. Nu s-au observat aspecte patologice, cu excepția tartrului slab. Pe diafiza proximal a femurului drept, posterior, lâng tuberozitatea gluteal , exist o traum care taie locul de inserție al mușchilor *adductor magnus* i *gluteus maximus* (Fig. 11). Trauma m soar 15 mm i a fost realizat cu un obiect t ios. Cronologia ei este antemortem, fiind bine vindecat , f r urme de infecție.

Pe lâng oasele indivizilor M2 i M2B, exist i oase de animale.

Mormântul 3 (complex 024, un adult i un copil)

Scheletul este reprezentat în special de fragmente de oase lungi, atât superioare cât i inferioare. Dinții lipsesc. Vârsta la momentul morții a fost determinată pe baza morfologiei suprafeței auriculare, care ne indic o vârst între 35 i 39 de ani. Sexul nu a putut fi determinat datorit lipsei elementelor de diagnostic. Prezența artrozei articulațiilor nu a fost notată pe cele 5 zone de articulare prezente. Din 9 diafize de oase lungi prezente pentru observație (unele doar în stare fragmentar), doar pe femurul drept s-au observat leziuni periostitice slabe. Pe lâng oasele umane mai exist i dou fragmente de oase de animale.

Cel de-al doilea individ din mormântul 3 (M3 copil) este un non-adult. Acesta este reprezentat de dinți, fragmente din craniu și fragmente foarte mici de diafize. În ceea ce privește dinții, aceștia aparțin atât dentiției deciduale (5 dinți) cât și celei permanente, neerupte (9 dinți). Dezvoltarea dinților indică o vârst la momentul morții de 2-3 ani. Pe incisivii deciduali maxilari de pe partea stâng se observ un defect al smalțului.

Imagini



Fig. 1. Craniul individului din M1 înainte de sp lare.



Fig. 2. Craniul individului M1 înainte de sp lare. Lâng mandibul se observ diafiza unui humerus (în secțiune).



Fig. 3. Hiperostoz porotic pe craniul individului M1.

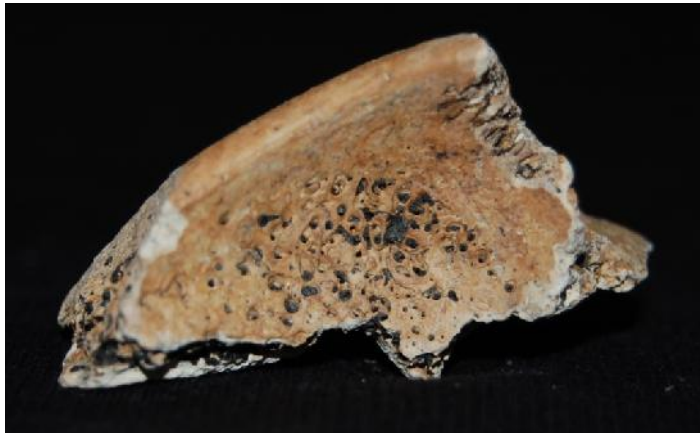


Fig. 4. *Cribră orbitalia* (individul M1).



Fig. 5. Defect al smalțului pe caninul mandibular drept al individului M1.



Fig. 6. Craniul individului M1B înainte de sp lare.



Fig. 7. Individul M2. Parietalul stâng. Trauma circular este încercuit cu ro u. Linia ro ie indic direcția fracturii (nu o suprapune, aceasta este în stânga linii roșii).

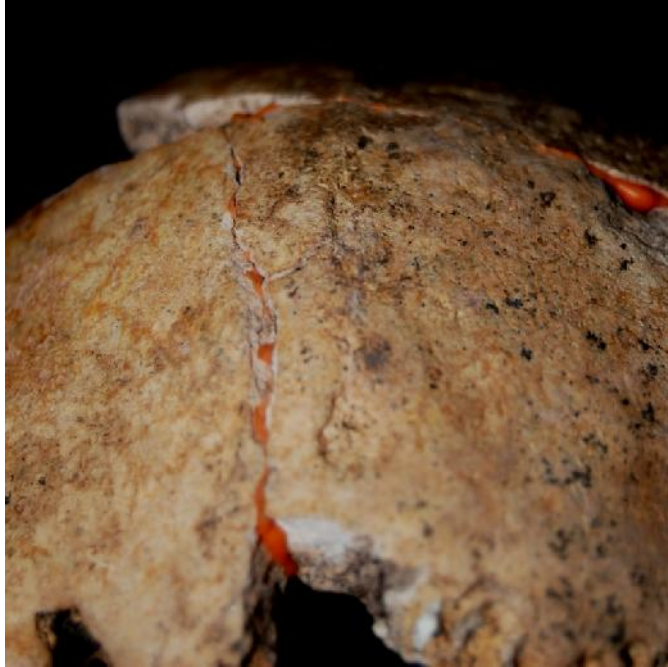


Fig. 8. Detaliu cu fractura radial de pe parietalul stâng al individului M2.

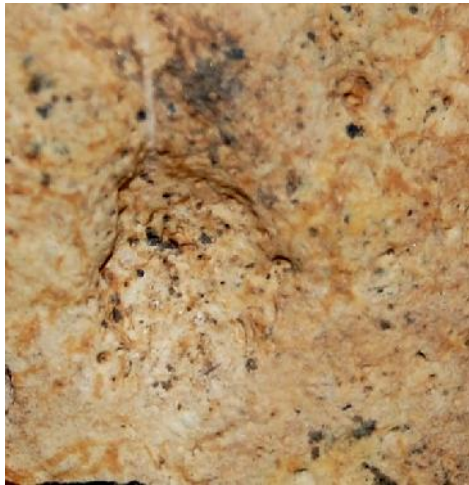


Fig. 9. Detaliu cu trauma circular identificat pe parietalul stâng al individului M2.



Fig. 10. Occipitalul individului M2. Se observă creasta nucală foarte pronunțată.



Fig. 11. Suprafața posterioară a femurului stâng al individului M2B.



Fig. 12. Detaliu cu trauma de pe femurul individului M2B (în stânga liniei ro ii).

Raport antropologic M l i e ti 2014

Szeredai Norbert, Claudia Radu

Materialul osteologic a fost analizat folosindu-se urm toarele metode:

- Pentru estimarea st rilor de reprezentare i de conservare s-au aplicat standardele descrise de Buikstra i Ubelaker (1994) i Steckel et al. (2011).
- Pentru determinarea vârstei s-au aplicat metodele specifice pentru non-adulți, și anume observarea erupției dentare (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011) i m surarea lungimii oaselor (Schaefer et al. 2009).
- Patologia a fost analizat conform descrierilor din Ortner (2003), Steckel et al. (2011), Buikstra, Ubelaker (1994), Aufderheide, Rodriguez-Martin (1998) i Waldron (2009).
- Dentiția și patologia dentar au fost analizate pe baza standardelor din Buikstra, Ubelaker (1994) i Steckel et al. (2011).
- M sur torile s-au realizat conform standardelor din Buikstra, Ubelaker (1994).

În urma analizei s-a determinat faptul c scheletul aparține unui copil cu o vârst perinatal (0-2 luni), rezultat dat de observarea erupției dentare și de lungimea oaselor (femur, illium). Starea de conservare a scheletului este medie, puțin peste 50%. Starea de reprezentare este bun (Fig. 2). S-au identificat 10 dinți deciduali neerupți (Sc^1 , Dc^1 , $?i^2$, $?i^1$, $?m^1$, $?m^2$, Dm_2 , Sm_2 , $?m_1$, $?i_1^1$). Oasele lungi au fost analizate pentru identificarea unor leziuni periostitice, dar la non-adulți acestea sunt dificil de diferențiat de țesutul fibros care reflectă creșterea și dezvoltarea normal a osului (Lewis 2004, 2007). Totuși, în cazul acestui copil, morfologia și distribuția țesutului fibros observat pe majoritatea oaselor sugerează prezența unei boli infecțioase.

Oasele afectate sunt urm toarele:

- coaste
- femur (stânga i dreapta)
- humerus (stânga i dreapta)
- ulna (stânga i dreapta)
- radius
- tibia
- scapula
- illium
- clavicula (stânga i dreapta)
- temporal (stânga i dreapta)

¹ Aici am folosit modelul standard pentru notarea dinților (White et al. 2012). Astfel, spre exemplu, LM_1 reprezint primul (1) molar (M) permanent (majuscule) mandibular (₁) de pe partea stâng (S). Rdm^2 reprezint al doilea (2) molar (m) decidual (litere minuscule i d) maxilar (²) de pe partea dreapt (D). Când am folosit semnul ?, nu s-a putut stabili partea de pe care este dintele.

- mandibula
- frontal (endocranian)
- occipital (baza craniului)
- orbite
- un metatarsian
- vertebre

Pe aproape toate oasele prezente se observă os nou format cu aspect periostitic, a cărui formare a fost cauzată probabil de o inflamare subperiostală. Pentru diagnosticul diferențial al acestor leziuni sunt foarte importante următoarele aspecte:

1. vârsta foarte mică (0-2 luni) a copilului;
2. aproape toate oasele scheletului sunt afectate;
3. printre oasele afectate se regăsesc și mandibula, scapulele și claviculele;
4. patologia se manifestă prin formare de os nou și nu prin distrugere osoasă, cu toate că cele două procese pot fi întâlnite în cadrul aceleiași boli;
5. țesutul patologic este localizat în special pe diafiza oaselor și nu pe metafiza acestora.

Vârsta foarte mică și gradul de afectare a scheletului (aproape toate oasele) ne indică faptul că procesul infecțios a fost inițiat încă din perioada intrauterină. Prin urmare, organismul copilului s-a îmbolnăvit prin interacțiunea cu organismul mamei, care este foarte probabil să fi suferit de aceeași boală/condiție patologică. Faptul că toate oasele prezintă aceste schimbări ne indică de asemenea o afecțiune sistemică și nu localizată. Modelul după care este afectat scheletul acestui copil ne-a făcut să luăm în considerare pentru diagnosticul diferențial următoarele afecțiuni: scorbut (sau lipsa vitaminei C), anemie genetică (thalassemia major), sifilis endemic, malarie congenitală și hiperostoza corticală infantilă.

Pentru argumentarea diagnosticului diferențial în continuare, vom realiza analiza SEM a oaselor.



Fig. 1. Clavicula stângă. Detaliu cu țesutul periostitic, comparativ cu țesutul sănătos (stânga sus, de culoare deschisă).

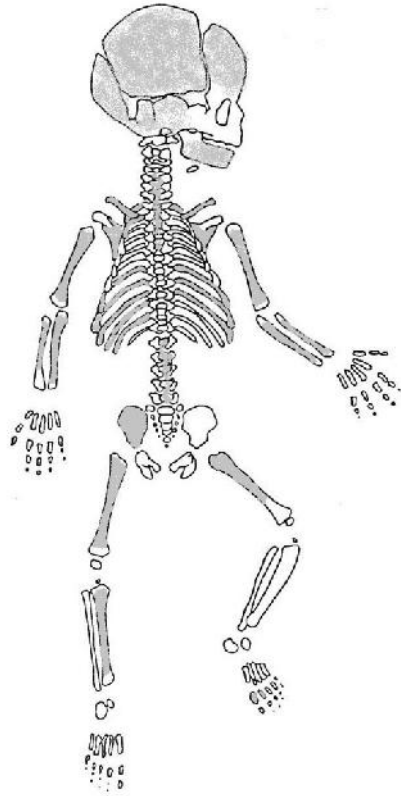


Fig. 2. Starea de reprezentare a scheletului (cu gri sunt colorate oasele prezente iar cu alb cele absente).

Raport antropologic – Mice ti 2014

Claudia Radu, Szeredai Norbert

Materialul osteologic primit pentru analiză constă în scheletele a trei indivizi provenind din situl arheologic de la Mice ti. Pentru analiza acestora s-au folosit următoarele metode:

- Pentru determinarea sexului s-au observat morfologia craniului (creasta nucală, mastoide, marginea supraorbitală, glabella și mentonul), respectiv a pelvisului (concașitatea subpubică, unghiul subpubic, ramul ischiopubic, arcu ventral, arcu compozit, incizura sciatică și sulcusul preauricular). Analiza acestora a fost realizată conform metodelor descrise de Buikstra, Ubelaker (1994), Steckel et al. (2011), White, Black, Folkens (2012), Phenice (1969), Bruzek (2002).
- Pentru determinarea vârstei la adulți s-au observat capetele sternale (I can, Loth, Wright 1984), simfiza pubică și suprafața auriculară (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011, Meindl et al. 1985), sinostoza suturilor craniene (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011) și uzura dentară (White et al. 2012). Pentru determinarea vârstei la subadulți s-a observat erupția dentară (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011), s-a măsurat lungimea oaselor (Schaefer et al. 2009) și s-a observat sinostoza epifizelor (Schaefer et al. 2009).
- Statura a fost calculată după formulele lui Pearson (1899), Trotter, Gleser (1958), Bach (1965) și Breitinger (1937).
- Patologia a fost analizată conform descrierilor din Ortner (2003), Steckel et al. (2011), Buikstra, Ubelaker (1994), Aufderheide, Rodriguez-Martin (1998) și Waldron (2009). În cadrul analizei preliminare pentru toate scheletele s-a notat prezența artrozei articulațiilor, leziunilor periostitice, leziunilor specifice pentru *cribra orbitalia* și *cribra cranii*, nodulilor lui Schmorl, a distrugerii platoului vertebral și a afecțiunilor specifice rahitismului și scorbutului. Pentru artroza articulațiilor au fost observate următoarele elemente: articulația temporo-mandibulară, cavitatea glenoidă, humerusul proximal și distal, radiusul proximal și distal, ulna proximal și distal, oasele mâinii, fosa acetabulară, femurul proximal și distal, tibia proximal și distal, fibula proximal și distal, oasele piciorului și vertebrele (segmentele cervical, toracic și lombar). Pentru identificarea leziunilor periostitice au fost observate următoarele oase: clavicula, humerusul, radiusul, ulna, femurul, tibia și fibula (bilateral).
- Dentiția și patologia dentară au fost analizate conform standardelor din Buikstra, Ubelaker (1994) și Steckel et al. (2011).
- Traumele și fracturile au fost analizate după metodele descrise în Lovell (1997) și Buikstra, Ubelaker (1994).

Oasele sunt puternic afectate din sol atât datorită activității plantelor dar și datorită specificului solului, care reține printr-o rețea de oase. O serie de elemente osoase au fost lipite pentru reconstituirea osului folosindu-se silicon dentar de culoare portocalie. În cadrul analizelor antropologice precedente s-a folosit pentru reconstituirea oaselor un material pentru lipit transparent. Din păcate, degradarea post-mortem a scheletelor a limitat într-o mare măsură observarea unor aspecte patologice.

Scheletul individului nr. 9

Atât starea de reprezentare cât și cea de conservare a scheletului sunt medii. Sexul a fost determinat pe baza morfologiei craniului (mastoid , marginea supraorbital , eminența mentală) iar rezultatul este „posibil masculin”. Vârsta a fost aproximată pornind de la observarea morfologiei capetelor sternale, suprafeței auriculare și a uzurii dentare, rezultatul fiind o vârstă cuprinsă între 26 și 45 de ani la momentul morții. Scheletul păstrează un număr de 15 dinți permanenți din 22 poziții dentare observabile. Nu s-a notat pierderea dinților antemortem sau abcese dentare. O carie interproximală există pe primul molar mandibular stâng (SM₁). S-a observat tartru dentar moderat, atât mandibular cât și maxilar, și periodontită slabă. Pe caninii maxilari și mandibulari există linii hipoplazice. Uzura molarilor este moderată spre severă. Din 15 articulații observabile, nici una nu prezintă schimbări specifice artrozei. Am identificat leziuni periostitice pe două oase, tibia și fibula stângă, cu manifestare moderată. De asemenea, pe calotă există porozitate specifică pentru hiperostoza porotică. Orbitalele nu au putut fi analizate pentru observarea *cribrei orbitalia*. Din punct de vedere vertebral, doar o singură vertebră s-a mai păstrat astfel că nu am putut stabili prezența artrozei vertebrale sau a nodulilor lui Schmorl. Nu s-au identificat traume sau fracturi. Statura nu a putut fi calculată deoarece oasele lungi ale celor mai surători sunt necesare nu s-au păstrat întregi. Pe lângă oasele umane, mai există o masea de animal.

Scheletul individului nr. 1

Stările de conservare și reprezentare sunt medii. Pe baza morfologiei elementelor de pe craniu (creasta nucală , mastoid , marginea supraorbitală , eminența mentală) și de pe pelvis (arc compozit, incizura sciatică) s-a stabilit că individul este de sex feminin. Vârsta a fost determinată pe baza uzurii dentare, morfologiei suprafeței auriculare și maturizării scheletului (în special liniile de sudare a epifizelor), rezultatul fiind o vârstă cuprinsă între 25 și 34 de ani. S-au păstrat 22 de dinți și 30 de poziții dentare. Ca și în cazul scheletului nr. 9, nu s-au observat pierderea antemortem a dinților sau abcese dentare. Există o carie dentară, interproximală, pe primul molar mandibular stâng (SM₁). Tartrul este puternic pe mandibulă dar slab pe maxilar, diferență care poate fi dată de procesele postmortem. Hipoplazia smalțului dentar a fost observată doar pe caninii mandibulari. Uzura molarilor este moderată. Din 20 de articulații analizate, patru (humerus proximal, radius distal, radius proximal și femur distal, toate de pe partea stângă) prezintă schimbări patologice specifice pentru artroză, cu manifestare moderată. Am identificat leziuni periostitice moderate pe două oase lungi (femur și tibie de pe partea stângă) din 7 observabile. *Cribra orbitalia* și hiperostoza porotică nu au putut fi observate din cauza degradării osoase. Vertebrele sunt de asemenea puternic distruse din sol. S-a observat pe o singură vertebră lombară prezența unui nodul al lui Schmorl. Nu s-au identificat traume sau fracturi. Statura a fost calculată pe baza lungimii femurului drept (432 mm) folosindu-se formulele lui Pearson (1899), Trotter și Gleser (1958) și Bach (1965). Rezultatele sunt 156,86 cm, 161,60 cm, respectiv 163,41 cm.

Scheletul individului nr. 9 (7)

Ca și în cazul celorlalte doi indivizi, stările de reprezentare și conservare sunt medii. Sexul a fost determinat pe baza morfologiei elementelor craniene (mastoid , eminența mentală, creasta nucal și marginea supraorbital), rezultatul fiind feminin. Vârsta a fost aproximată pe baza morfologiei capetelor sternale, suprafeței auriculare, sinostozei suturilor și a uzurii dentare, rezultatul fiind o vârstă cuprinsă între 24 și 45,2 ani. S-au pierdut 28 de dinți și 32 poziții dentare. Individul a pierdut un dinte antemortem și există 3 carii dentare, una interproximală pe molarul 2 mandibular stânga și două pe molarul 3 mandibular dreapta (una ocluzală și una interproximală). Tartrul dentar este mediu atât pe mandibulă cât și pe maxilar. Pe caninii mandibulari am observat linii hipoplazice. Uzura molarilor este medie. Din 21 de articulații analizate, 8 prezintă schimbări artrozice (pe partea stângă : fibula proximală , femur distal, acetabulul, ulna proximală, radius distal, humerus distal; pe partea dreaptă : acetabulul; și pe vertebrele lombare). În toate cazurile, schimbările degenerative sunt moderate. Nu s-au observat leziuni periostitice dar pe craniu există porozitate specifică pentru hiperostoza porotică . Nu am identificat traume sau fracturi. Statura a fost calculată pe baza lungimii tibiei și eminență (357 mm) folosindu-se formulele compuse de Pearson (1899) și Trotter și Gleser (1958). Rezultatele sunt 157,87 cm, respectiv 165,06 cm. Pe lângă oasele umane mai există un os de animal. De asemenea în materialul din umplutura mormântului, am mai identificat 9 fragmente de oase și dinți de animal și 3 fragmente de oase umane (claviculă dreapta medială, humerus dreapta proximală, humerus stâng distal). Acestea din urmă nu aparțin individului principal din mormântul 9 (7).

Tabel 1. Distribuția datelor osteologice și patologice pentru fiecare schelet.

Nr. mormânt	Sex	Vârstă	Statură ¹	Carii dentare	HSD ²	Artroză ³	Cribră orbitală	Hiperostoza porotică	Periostită ⁴
1	F	25-34	156,86	1	X	4 (20)	-	-	2 (7)
9	M	26-45	-	1	X	0 (15)	-	X	2 (6)
9 (7)	F	24-45,2	157,87	3	X	8 (21)	-	X	0 (8)

¹Aici am folosit rezultatele obținute din aplicarea formulelor lui Pearson (1899). Rezultatele sunt în cm.

²HSD= hipoplazia smalțului dentar.

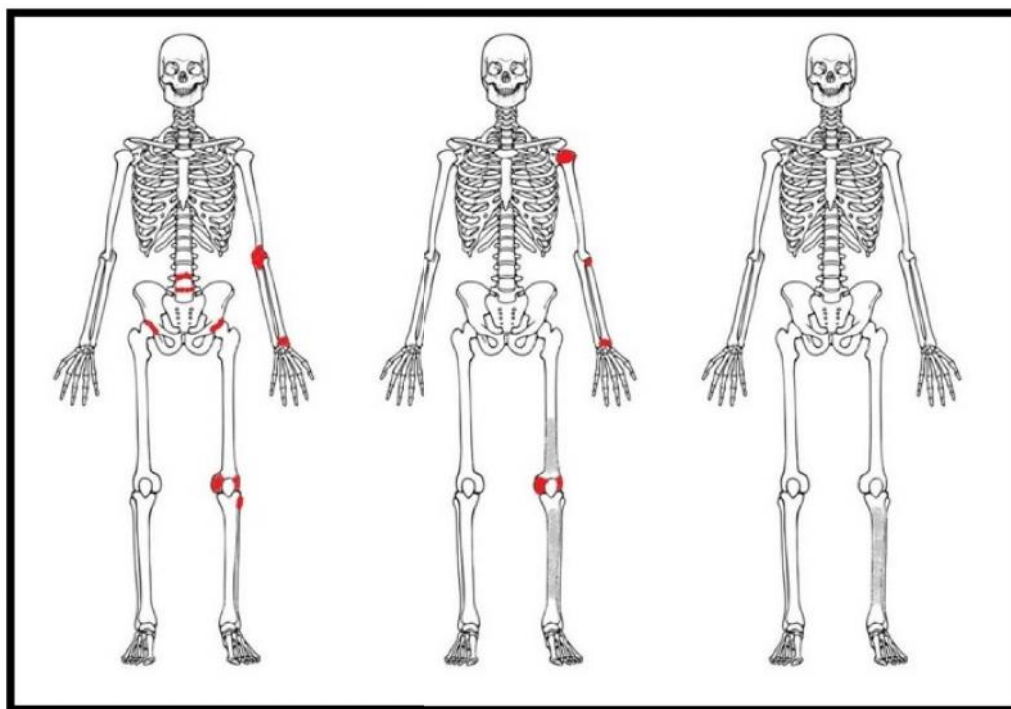
³Numerele reprezintă articulațiile afectate iar în paranteză este dat numărul total al articulațiilor observabile.

⁴Numerele reprezintă oasele lungi afectate iar în paranteză este dat numărul total al oaselor lungi observabile.

Discuții

În acest stadiu al cercetării, datele osteologice și patologice pot fi interpretate la nivel preliminar. Prezența liniilor hipoplazice în cazul tuturor indivizilor este relevant pentru stresul nutritiv susținut în perioada copilăriei când smalțul dentar se formează . Aceste linii reprezintă perioade de stagnare a mineralizării smalțului cauzată de deficiențe nutritive severe. Hiperostoza porotică este un aspect patologic care se manifestă în copilărie și are etiologia în anemia genetică sau anemia megaloblastică (lipsa vitaminei B12). Statura este de asemenea un indicator pentru aportul nutritiv din perioada de creștere și dezvoltare a corpului, dar în lipsa unui element antion reprezentativ nu putem stabili dacă staturile acestor indivizi sunt sub media specifică pentru

populația de care aparțin. Prin urmare, putem doar să sugerăm că este foarte posibil ca în timpul creșterii și dezvoltării acestor indivizi să fi existat perioade de stres nutritiv dat de malnutriție, foamete sau boli.



1	F	25-34
9 56	M	26-45
9 (7)	F	24-45,2

fig. 1. Distribuția artrozei articulațiilor (cu roșu) și leziunilor periostitice (cu gri) pentru M9 (7), M1 și M9 (de la stânga la dreapta).

Leziunile periostitice sunt indiciatori non-specifice pentru infecție. Distribuția lor limitată poate sugera ca și etiologie o traumă sau o infecție localizată (ulcer al pielii). O distribuție mai extinsă, mai multe oase ale scheletului, este un indicator pentru o infecție sistemică. În cazul individului din mormântul M9, limitarea distribuției leziunilor pe tibia și fibula stângă poate sugera o inflamare a membranei interosoase. În ambele cazuri (M1 și M9), osul afectat de leziune este remodelat spre os compact, ceea ce indică vindecarea infecției.

Modelul de distribuție al artrozei articulațiilor nu este relevant dat fiind lotul mic analizat. Totuși, dacă luăm în considerare sexul indivizilor, este interesant faptul că individul de sex masculin nu are nicio articulație (dintre cele prezente, n=15) afectată de schimbări degenerative, comparativ cu cele două femei care au câte 4, respectiv 9 articulații afectate de artroză moderată.

Raportul analizei antropologice pentru materialul osteologic de la Toboliu

Claudia Radu

Protocolul de lucru al Laboratorului de Antropologie Fizic utilizează următoarele metode:

- Pentru determinarea sexului se observă morfologia craniului (creasta nuchală, mastoide, marginea supraorbitală, glabella și mentonul), respectiv a pelvisului (concașitatea subpubică, unghiul subpubic, ramul ischiopubic, arcul ventral, arcul compozit, incizura sciatică și sulcusul preauricular). Analiza acestora este realizată conform metodelor descrise de Buikstra, Ubelaker (1994), Steckel et al. (2011), White, Black, Folkens (2012), Phenice (1969), Bruzek (2002).
- Pentru determinarea vârstei la adulți se analizează morfologia capetelor sternale (Ișcan, Loth, Wright 1984), simfizei pubice și a suprafeței auriculare (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011, Meindl et al. 1985), sinostoza suturilor craniene (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011) și uzura dentară (White et al. 2012). Pentru determinarea vârstei la non-adulți se observă erupția dentară (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011), se măsoară lungimea oaselor (Schaefer et al. 2009) și se observă sinostoza epifizelor (Schaefer et al. 2009).
- Statura este calculată după formulele lui Pearson (1899), Trotter, Gleser (1958), Bach (1965) și Breitinger (1937).
- Patologia este analizată conform descrierilor din Ortner (2003), Steckel et al. (2011), Buikstra, Ubelaker (1994), Aufderheide, Rodriguez-Martin (1998) și Waldron (2009). În cadrul analizei preliminare pentru toate scheletele se notează prezența artrozei articulațiilor, leziunilor periostitice, leziunilor specifice pentru *cribra orbitalia* și *cribra cranii*, nodulilor lui Schmorl, a distrugerii platoului vertebral și a afecțiunilor specifice rahitismului și scorbutului. Pentru artroza articulațiilor sunt observate următoarele elemente: articulația temporo-mandibulară, cavitatea glenoidă, humerusul proximal și distal, radiusul proximal și distal, ulna proximal și distal, oasele mâinii, fosa acetabulară, femurul proximal și distal, tibia proximal și distal, fibula proximal și distal, oasele piciorului și vertebrele (segmentele cervical, toracic și lombar). Pentru identificarea leziunilor periostitice se observă următoarele oase: clavicula, humerusul, radiusul, ulna, femurul, tibia și fibula (bilateral).
- Dentiția și patologia dentară se analizează conform standardelor din Buikstra, Ubelaker (1994) și Steckel et al. (2011).
- Traumele și fracturile se analizează după metodele descrise în Lovell (1997) și Buikstra, Ubelaker (1994).

Am analizat materialul osteologic din 8 morminte (mormintele 2, 3, 4, 6, 8 și contextele 5, 6 și 7). În fiecare mormânt am identificat doar câte un individ. Oasele au fost spălate și, în unele cazuri reconstituite folosindu-se silicon dentar. Așa cum rezultă din descrierea metodelor, pentru fiecare individ s-au stabilit gradul de reprezentare și conservare, s-au determinat sexul și vârsta, s-a analizat patologia osoasă și dentară și s-au efectuat diferite măsurători.

Mormântul nr. 8

Scheletul este foarte bine păstrat și conservat. Vârsta a fost determinată pe baza morfologiei capetelor sternale, simfizei pubice și suprafeței auriculare. Rezultatul este o vârstă la momentul morții între 30 și 42 de ani. Sexul a fost determinat pe baza morfologiei elementelor craniene (creasta nuchală, mastoid, margine supraorbitală, glabella și eminența mentală) și elementelor pelvisului (ram ischiopubic, arc ventral, arc compozit, incizura sciatică), rezultatul fiind Masculin. Statura din timpul vieții a fost calculată pe baza lungimii femurului drept (410 mm) și folosindu-se formula lui Breiter (1937), rezultatul fiind 161,75 cm.

Se păstrează 22 de dinți. Maxilarul este rupt în zona molarilor, prin urmare am notat prezența a minim 28 de poziții; pe partea dreaptă a maxilarului cu siguranță nu a avut erupție molarul 3. Faptul că mandibula și maxilarul s-au păstrat într-o stare bună ne-a permis să observăm mai multe patologii dentare. Individul a pierdut în timpul vieții 4 dinți. Există 3 carii dentare, una interproximală pe primul molar mandibular de pe partea stângă, una interproximală pe molarul 2 mandibular de pe partea dreaptă și una interproximală pe al doilea premolar maxilar de pe partea dreaptă. De asemenea, se pot observa 3 abcese dentare foarte puternice. Tartrul este moderat iar periodontita este extinsă. Pe smalțul incisivilor și caninilor atât maxilari cât și mandibulari se observă linii hipoplazice pronunțate. Uzura molarilor este puternică. Și pe incisivi și canini există uzură puternică. Pe molarii mandibulari de pe partea stângă există un defect pe suprafața labială a acestora, aproximativ la linia de întâlnire dintre smalțul coroanei și cimentul dentar (radicular). De asemenea, există 4 dinți (al doilea premolar mandibular de pe partea stângă, incisivul lateral maxilar de pe partea stângă, caninul maxilar de pe partea dreaptă și premolarul 1 sau 2 maxilar de pe partea dreaptă) cu o uzură foarte puternică, nu mai există deloc coroana dentară iar rădăcina este de asemenea distrusă. Este posibil ca acest lucru să fie o consecință a faptului că acești dinți sunt de fapt deciduali; dacă acestui individ îi lipseau congenital mugurii pentru dinții permanenți, este posibil să nu-i fi pierdut pe cei deciduali, ceea ce a dus la folosirea lor foarte îndelungată și prin urmare uzura lor excesivă.

Una din cele mai evidente patologii observabile pe schelet este artroza avansată. Se păstrează pentru observație 39 de elemente de articulație. Dintre acestea, 14 sunt afectate de artroză puternică, cu deformarea conturului elementului și cu osteofite de mari dimensiuni, 27 sunt afectate de artroză moderată iar 6 nu prezintă schimbări degenerative. Cele mai afectate sunt articulația temporo-mandibulară, fosa acetabulară dreaptă și femurul proximal drept, vertebrele cervicale și cavitatea glenoidă de pe partea stângă. Vertebrele cervicale nr. 2 și 3 sunt unite, posibil datorită unei fracturi prin comprimare (*compression fracture*).

Din 14 oase lungi prezente pentru observație, pe niciunul nu se observă leziuni periostice. De asemenea, porozitatea specifică pentru cribră orbitală și hiperostoz porotică nu este prezentă. Pe suprafața endocraniană există granulații arahnoidice. Pe omoplatul drept se observă parțial o traumă circulară (diametru de 16.11 mm) produsă antemortem. Cu toate acestea nu există urme de infecție, vindecarea traumei nu a acoperit cavitatea produsă.

În ceea ce privește markerii musculoscheletali, aceștia au fost observați pe mai multe elemente osoase. Pe ambele ulne, pe olecranon, locul de inserție al mușchiului *triceps brachii* prezintă exostoze (osificări); pe ulna stângă, în porțiunea distală a diafizei, pe locul de inserție al membranei interosoase sau a mușchiului *pronator quadratus* se observă de asemenea exostoze osoase. Pe femure este foarte pronunțat locul de inserție al mușchilor *plantaris* și *adductor magnus*; de asemenea, pe femurul stâng, între trochanterul mare și gâtul femural, pe locul de inserție al *obturator externus*, există exostoze osoase de mari dimensiuni (*bony spurs*). Pe tuberozitatea calcaneelor se observă exostoze osoase. Pe ambele tibii, epifizele distale, anterior, există fațete de „îngenunchere” (*squatting facets*). Pe coxalul drept, acetabulul este înconjurat de exostoze osoase, cu mult os nou format, pe locul de inserție al ligamentelor capsulare. Coxalul stâng nu prezintă aceste modificări. Pe manubriu (parte a sternului), pe suprafața posterioară, se observă porozitate accentuată cu distrugerea și remodelarea cortexului.

Mormântul nr. 2

Scheletul este slab reprezentat și conservat. Pe baza lungimii oaselor, vârsta a fost stabilită între 32 și 34 de săptămâni prenatale. Nu se pot distinge dinți. Din 4 oase lungi analizate, niciunul nu prezintă leziuni periostitice. Nu s-au observat aspecte patologice indicatoare pentru scorbut sau rahitism sau alte boale metabolice.

Mormântul nr. 3

Scheletul este moderat reprezentat și conservat. Vârsta la momentul morții a fost determinată pe baza lungimii oaselor ca fiind între 34 și 36 de săptămâni prenatale. Nu se păstrează dinți. Din 10 oase lungi, pe niciunul nu se observă leziuni periostitice. Nu există porozitate specifică pentru hiperostoza porotică. În afară de porozitate slabă prezentă pe mandibulă, nu există alte aspecte patologice indicatoare pentru boli metabolice.

Mormântul nr. 4

Scheletul este bine reprezentat și conservat. Vârsta la momentul morții a fost determinată pe baza erupției dentare și a lungimii oaselor. Rezultatul este o vârstă între 1.5 și 2 ani. Se păstrează 18 dinți deciduali și 4 dinți permanenți neerupți. În afară de hipoplazie slabă prezentă doar pe canii mandibulari, nu s-au notat alte patologii dentare. Din 12 oase lungi prezente pentru observație, pe 6 oase se observă leziuni periostitice avansate (pe femurul, tibia și fibula de pe partea dreaptă și tibia și fibula de pe partea stângă). De asemenea, femurele și tibiile sunt curbate medial. Nu se observă hiperostoza porotică. Pe ulne, proximal, sub tuberozitatea ulnară există o zonă cu os nou format.

Mormântul nr. 6

Scheletul este slab reprezentat și conservat. Vârsta a fost determinată pe baza lungimii oaselor și a erupției dentare, rezultatul fiind, ca și în cazul copilului din mormântul nr. 4, între 1.5 și

2 ani. Se p streaz 15 dinți deciduali și 1 dinte permanent neerupt. Nu se observă patologie dentar . Din 6 oase lungi prezente pentru observație, pe două (cele două tibii) există leziuni periostitice slabe. Pe suprafața ventrală a unor coaste se observă porozitate slabă. Nu am notat prezența *cribrei orbitalia* i a hiperostozei porotice.

Contextul 5

Scheletul este moderat reprezentat și conservat. Pe baza erupției dentare, vârsta la momentul morții a fost stabilită între 6 și 9 luni. Pe baza lungimii oaselor, vârsta determinată este mai mică, între 1.5 i 3 luni, ceea ce indic o întârziere a dezvoltării scheletului postcranian. Acest lucru este cauzat în general de deficiențe nutritive sau de prezența unei boli. Se păstrează 19 dinți deciduali neerupți. Din 13 oase lungi prezente pentru observație, doar pe unul (tibia dreaptă) s-a observat periostit slab . Orbitale nu sunt prezente. Pe palatin, mandibul , sfenoid i temporal exist porozitate slab .

Contextul 6

Scheletul este foarte slab reprezentat i conservat: se p streaz fragmente de craniu, coaste, oase de la mână i oase de la picior. Lipsesc elementele osoase sau dentare pe baza c rora se poate determina vârsta; totuși putem spune că scheletul aparține unui subadult.

Contextul 7

Scheletul este bine reprezentat i conservat. Am determinat vârsta pe baza erupției dentare, rezultatul fiind între 9 i 12 luni. Pe baza lungimii oaselor, ca i în cazul individului din Cxt 5, vârsta este mai mic , între 3 i 6 luni. S-au p strat 3 dinți deciduali erupți, 15 deciduali neerupți și 2 permanenți neerupți. Pe aceștia nu s-a notat prezența vreunei patologii. Din 14 oase lungi prezente pentru observație, pe 6 există leziuni periostitice: humerus, femur și tibie de pe ambele p rți. Metafiza ambelor oase radius este puțin deformată medial, cu franjurare slab . Pe palatin i mandibul de asemenea se observ porozitate slab . De asemenea, pe craniu se vede foarte bine activitatea unor insecte.

Raportul analizei antropologice pentru materialul osteologic de la Turda

Claudia Radu, Szeredai Norbert

Protocolul de lucru al Laboratorului de Antropologie Fizic utilizează următoarele metode:

- Pentru determinarea sexului se observă morfologia craniului (creasta nucală, mastoide, marginea supraorbitală, glabella și mentonul), respectiv a pelvisului (concaitatea subpubică, unghiul subpubic, ramul ischiopubic, arcul ventral, arcul compozit, incizura sciatică și sulcusul preauricular). Analiza acestora este realizată conform metodelor descrise de Buikstra, Ubelaker (1994), Steckel et al. (2011), White, Black, Folkens (2012), Phenice (1969), Bruzek (2002).
- Pentru determinarea vârstei la adulți se analizează morfologia capetelor sternale (I can, Loth, Wright 1984), simfizei pubice (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011, Meindl et al. 1985), sinostoza suturilor craniene (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011) și uzura dentară (White et al. 2012). Pentru determinarea vârstei la non-adulți se observă erupția dentară (Buikstra, Ubelaker 1994, Steckel et al. 2011), se măsoară lungimea oaselor (Schaefer et al. 2009) și se observă sinostoza epifizelor (Schaefer et al. 2009).
- Statura este calculată după formulele lui Pearson (1899), Trotter, Gleser (1958), Bach (1965) și Breitinger (1937).
- Patologia este analizată conform descrierilor din Ortner (2003), Steckel et al. (2011), Buikstra, Ubelaker (1994), Aufderheide, Rodriguez-Martin (1998) și Waldron (2009). În cadrul analizei preliminare pentru toate scheletele se notează prezența artrozei articulațiilor, leziunilor periostitice, leziunilor specifice pentru *cribra orbitalia* și *cribra cranii*, nodulilor lui Schmorl, a distrugerii platoului vertebral și a afecțiunilor specifice rahitismului și scorbutului. Pentru artroza articulațiilor sunt observate următoarele elemente: articulația temporo-mandibulară, cavitatea glenoidă, humerusul proximal și distal, radiusul proximal și distal, ulna proximal și distal, oasele mâinii, fosa acetabulară, femurul proximal și distal, tibia proximal și distal, fibula proximal și distal, oasele piciorului și vertebrele (segmentele cervical, toracic și lombar). Pentru identificarea leziunilor periostitice se observă următoarele oase: clavicula, humerusul, radiusul, ulna, femurul, tibia și fibula (bilateral).
- Dentiția și patologia dentară se analizează conform standardelor din Buikstra, Ubelaker (1994) și Steckel et al. (2011).
- Traumele și fracturile se analizează după metodele descrise în Lovell (1997) și Buikstra, Ubelaker (1994).

Materialul analizat este puternic afectat de factori tafonomici care au dus la o stare de reprezentare și conservare foarte slabă a scheletelor. Metodele descrise mai sus au fost aplicate într-o măsură mai mică sau mai mare în funcție de gradul de reprezentare și conservare al fiecărui schelet. În unele cazuri s-a utilizat silicon dentar de culoare portocalie pentru lipirea fragmentelor osoase. Materialul osteologic cuprinde un număr de 5 indivizi. Atât reprezentarea

redus a scheletelor cât și numărul lor mic ne împiedică să interpretăm din punct de vedere biocultural datele osteologice obținute.

Scheletul C2054

Vârsta a fost determinată prin observarea suprafeței auriculare și a uzurii dentare, rezultatul fiind o vârstă cuprinsă între 25 și 35 de ani la momentul morții. Pe baza morfologiei elementelor pelvisului (concavitatea subpubică, ramul ischiopubic, unghiul subpubic, arcul compozit și incizura sciatică), sexul scheletului a fost determinat ca fiind posibil masculin. Scheletul prezintă un număr de 13 dinți. Lipsa mandibulei și a maxilarului ne-a împiedicat să observăm prezența abceselor sau a periodontitei. Dinții păstrați nu prezintă carii dentare, dar există tartru slab. De asemenea, pe incisivi și pe canini nu s-au observat linii hipoplazice. Uzura molarilor prezenți este puternică. Schimbări degenerative specifice osteoartrozei au fost notate pe două zone de articulare (acetabulul drept și falangele de la mâna stângă) din 12 articulații prezente pentru observare. Pe niciun os lung nu au fost observate leziuni periostitice (din 13 oase prezente pentru observație întregi sau fragmentare). *Cribra orbitalia* și hiperostoza porotică nu au putut fi notate datorită lipsei oaselor craniului.

Un număr mic de oase au putut fi analizate pentru identificarea markerilor musculoscheletali. Pe tibia dreaptă mușchiul *tibialis anterior* are o inserție pronunțată. Pe ambele femure *crista aspera* este foarte bine reliefată iar locul de inserție al *gluteus maximus* este remodelat (Fig. 1). Humerusul stâng prezintă o curbura neobișnuită în jumătatea proximală a diafizei, ceea ce ar putea indica un defect de dezvoltare inițiat în perioada de creștere a osului sau probabil o fractură vindecată cu mult timp în urmă (Fig. 2). De asemenea, pe tibia dreaptă, pe suprafața anterioară a epifizei distale, se observă o "fațetă de ghemuire/îngenunchere" (*squatting facet*) (Fig.3).

Scheletul C201A

Scheletul aparține unui adult (rezultat dat de observarea generală a oaselor). Sexul nu poate fi determinat. S-au păstrat oase de la mână, tibie, humerus și femur, toate în stare foarte fragmentară. Acest lucru a limitat puternic observațiile pe care le-am putut realiza. Nu s-a păstrat nici o articulație. Dintre diafizele de oase lungi prezente (tibia dreaptă, humerus stâng, femur stâng), pe cea femorală există striații indicatoare pentru o periostită remodelată, non-specifică. Pe lângă oasele umane, am mai identificat două fragmente de oase de animal.

Scheletul C1100B

Pe lângă materialul osteologic există o pungă cu ceramică și crămizi. Fragmentele osoase sunt foarte mici (<1 cm), ceea ce face imposibilă identificarea unor aspecte patologice pe acestea. Se păstrează de asemenea și 8 dinți, dintre care 3 sunt deciduali (1 canin, 2 molari) și 5 permanenți neerupți (1 incisiv maxilar, 2 canini, 2 molari). Pe baza erupției dentare, se poate estima vârsta la momentul morții ca fiind între 3 și 4 ani.

Scheletul C144 M2

Se p streaz doar fragmente foarte mici de os (ca i în cazul scheletului din C1100B) i amprente de oase pe calupuri de p mânt. Exist de asemenea și 12 dinți, dintre care 7 sunt deciduali (3 canini și 4 molari) și 5 sunt permanenți neerupți (2 canini, 1 incisiv maxilar, 2 molari). Pe baza erupției dentare, vârsta la momentul morții este aceeași ca și în cazul scheletului din C1100B, și anume 3-4 ani.

Scheletul C1442

Se p streaz mai multe fragmente dintre care se disting capetele femurale, fragmente de diafiz , fragmente craniene i falange de la mân . Înainte de a sp la oasele, am observat în bulg rii de p mânt care conțineau oasele că acestea erau deja amestecate, sugerând c înc din trecut scheletul nu se mai afla în ordine anatomic (Fig. 4). Pe baza observ rii scheletului în general, putem spune c individul este un adult, dar sexul nu poate fi determinat. Nu se p streaz dinți. Pe fragmentele osoase p strate nu se observ nicio patologie.

Context	Vârsta	Sex	Observații
C2054	25-35 ani	Pos. M	Artroz slab pe dou zone de articulare, markeri musculoscheletali, <i>squatting facet</i>
C201A	Adult	IND	
C1100B	3-4 ani	IND	
C144 M2	3-4 ani	IND	
C1442	Adult	IND	

Imagini



Fig. 1. Individul C2054. Fragment din diafiza femurului drept.



Fig. 2. Individul C2054. Humerusul stâng.



Fig. 3. Individul C2054. Fațetă „de îngenunchere”.



Fig. 4. Individul C1442. Imagine cu bulg rul de p mânt în interiorul c ruia se observ diafizele unor oase lungi.

List publicații 2014

Nr. Crt.	Titlu articol	An aparitie	Revista	Autori	Status
1	Bone Diagenesis and FTIR Indices: a Correlation	2014	Studia Universitatis Babes-Bolyai Biologia	- Tatar Andra-Sorina - Ponta Oana - Kelemen Beatrice Simona	Publicat
2	Techniques Used for the Diagnostic of Ancient Tuberculosis in Human Remains	2014	Studia Universitatis Babes-Bolyai Biologia	- Chiriac Cecilia - Tatar Andra-Sorina - Radu Claudia - Lupan Iulia - Kelemen Beatrice Simona	Publicat
3	The Evolution of Gender Detection Protocols in Bioarchaeological Studies	2014	Studia Universitatis Babes-Bolyai Biologia	- Mircea Cristina - Kelemen Beatrice Simona	Publicat
4	Molecular Diagnosis of Pathologies in Ancient Human Remains. A Case Study: the Bioarchaeological Study of a Neolithic Skeleton Displaying Symptoms of Diabetes	2014	Studia Universitatis Babes-Bolyai Biologie	- Mihalache Ioana - Radu Claudia - Kelemen Beatrice Simona	Publicat
5	A brief overview of the mitochondrial DNA as molecular marker in bioarchaeology	2014	Studia Universitatis Babes-Bolyai Biologia	- Rusu Ioana - Kelemen Beatrice Simona	Publicat
6	The Evolution and Genetic Basis of Human Pigmentation	2014	Studia Universitatis Babes-Bolyai Biologia	- Kocsis Eniko - Kelemen Beatrice Simona	Publicat
7	Anthropological analysis of a skeletal sample belonging to the Sarmatian population inhabiting the territory at the east of the Pannonian basin	2014	Journal of Ancient History and Archaeology	- Radu Claudia - Szeredai Norbert	Publicat
8	Analysis of Kinship Using Mitochondrial DNA: A Case Study from a 10th Century Medieval Population in Capidava (Constan a, Romania)	2014	Annuaire Roumain d'Anthropologie	- Rusu Ioana - Radu Claudia - Oltean Andreea - Dobrinescu Catalin - Kelemen Beatrice Simona	Publicat
9	Recent Research at the Basilica Extra Muros in Histria at 100 Years Since the Initiation of	2014	Materiale i Cercet ri Arheologice Serie Nou	- Rusu-Bolindet Viorica - Badescu Alexandru - Lazarescu Vlad Andrei - Dima Mihai	Publicat

	Archaeological Research on the Site			- Radu Claudia - Szeredai Norbert - Kelemen Beatrice Simona	
10	Anthropological data regarding three adult individuals from a middle bronze age archaeological context	2014	Annales Universitatis Apulensis. Series Historica	- Radu Claudia - Szeredai Norbert	Acceptat

List particip ri conferințe - 2014

Nr. Crt.	Titlu	An	Tip	Publicatie
1	Modern and ancient mitochondrial DNA genetic landscape of maternal heredity in Eastern Europe from Paleolithic onwards	2014	Prezentare Orala	Proceedings WiBioSE Conference, Arandjelovac and Belgrade, Serbia, February 02-08, 2014
2	Molecular Diagnosis of a Tuberculosis Case from the Late-Roman-Period	2014	Prezentare Orala	Proceedings WiBioSE Conference, Arandjelovac and Belgrade, Serbia, February 02-08, 2014
3	Testing for type 2 diabetes in an ancient human skeleton using molecular methods	2014	Prezentare Orala	Proceedings WiBioSE Conference, Arandjelovac and Belgrade, Serbia, February 02-08, 2014
4	MITOCHONDRIAL HAPLOGROUP DIVERSITY IN A 10th CENTURY AD MEDIEVAL POPULATION FROM MIREASA, CONSTAȚA, ROMÂNIA	2014	Prezentare Orala	Proceedings WiBioSE Conference, Arandjelovac and Belgrade, Serbia, February 02-08, 2014
5	Mitochondrial haplogroup diversity in a 10th century ad medieval population from Capidava, Constanta, Romania	2014	Prezentare Orala	Proceedings WiBioSE Conference, Arandjelovac and Belgrade, Serbia, February 02-08, 2014
6	A correlation between physical analytical methods and the rate of DNA extraction from ancient human remains	2014	Poster	Proceedings WiBioSE Conference, Arandjelovac and Belgrade, Serbia, February 02-08, 2014
7	Preliminary mitochondrial DNA analysis of a 10th century medieval population from Capidava, Constanta, Romania	2014	Poster	Young Natural History Scientists' Meeting
8	Determining the sex of ancient human remains using new primers to amplify X and Y amelogenin alleles	2014	Poster	Young Natural History Scientists' Meeting

9	Neolithic diabetes? Tentative interdisciplinary diagnosis.	2014	Poster	Young Natural History Scientists' Meeting
10	Eye and hair color prediction from ancient human remains	2014	Prezentare Orala	Young Natural History Scientists' Meeting
11	How representative is a skeletal assemblage? A discussion about paleodemography and the treatment of the dead	2014	Prezentare Orala	Archaeoethanatology: An interdisciplinary approach to death in Prehistory
12	Applying a biocultural approach in the reconstruction of the formation of a funerary assemblage from a Bronze Age barrow from Constanta county, Romania	2014	Prezentare Orala	Homines, Funera, Astra. Time and cause of death from Prehistory to Middle Ages
13	Mortality and morbidity profiles for a non-adult sample from the early medieval necropolis of Mireasa (Constanta county, Romania)	2014	Prezentare Orala	Homines, Funera, Astra. Time and cause of death from Prehistory to Middle Ages
14	Reassembling the life of a neonate found in the balnea of a Roman fort from Romania	2014	Prezentare Orala	3rd International Congress Biomedical Sciences in Archaeology
15	APPLYING A BIOCULTURAL APPROACH IN THE ANALYSIS OF THE LATE MEDIEVAL/EARLY MODERN POPULATION FROM GHEORGHENI (ROMANIA)	2014	Prezentare Orala	Conference on Cultural Heritage and New Technologies
16	Subadult funerary treatment in the Dacian culture. An extended analysis of the necropolis from Hunedoara-the Castle's Garden Plateau (Romania)	2014	Prezentare Orala	European Association of Archaeologists 20th Annual Meeting
17	Exploring Life Quality Levels for a 10th-Century Population from Dobruja, Romania	2014	Prezentare Orala	International Medieval Congress Leeds
18	Social and epidemiological hypotheses regarding the individuals buried in the 4th-th centuries necropolis from Boldesti-Gradiste, Romania	2014	Prezentare Orala	International Scientific Communication Session "Archaeology of the First Millenium AD"
19	Identificarea relatiei dintre individ si sistemul social pentru populatiile arheologice	2014	Prezentare Orala	Simpozionul "Zilele Francisc I. Rainer" 2014. Antropologie si Societate
20	ANALYSIS OF KINSHIP USING MITOCHONDRIAL DNA: A	2014	Prezentare Orala	Simpozionul "Zilele Francisc I. Rainer" 2014. Antropologie si Societate

	CASE STUDY FROM A 10TH CENTURY MEDIEVAL POPULATION IN CAPIDAVA (CONSTAN A, ROMÂNIA)			
21	A MOLECULAR APPROACH TO INVESTIGATE TUBERCULOSIS CASES IN A GOTHIC POPULATION FROM GHER SENI NECROPOLIS, BUZ U COUNTY	2014	Poster	THE 32ND ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF RSCB
22	Zooarchaeological analysis of an animal sample from 10th century Capidava. Inferences regarding human-animal interaction	2014	Prezentare Orala	Simpozion Arheovest 2014
23	Mormantul IO de la biserica „Sf. Nicolae” de la Curtea de Arges. Despre geneza Tarii Romanesti	2014	Prezentare Orala	Al IX-lea simpozion de heraldica, Chisinau, Republica Moldova
24	THE SHAFT-HOLE AXE FROM YUNATSITE (BULGARIA) AND THE CHRONOLOGY OF THE SHAFT-HOLE AXES OF P.AnURENI AND BALSA, TYPES IN THE CARPATHIAN-BALKAN AREA	2014	Prezentare Orala	Bronze Age Chronology in the Carpathian Basin
25	European admixture analysis inferred by Early Bronze Age human bones amtDNA sequencing	2014	Poster	International Zoological Congress of “Grigore Antipa” Museum
26	Analyses of a Funerary Context and the Evaluation of DNA Recovery from EBA Human Bones by Different Isolation Methods	2014	Poster	European Association of Archaeologists 20th Annual Meeting
27	Was Sigismund of Luxemburg a "wiser man" at the end of his reign? Ottoman and Eastern case studies	2014	Prezentare Orala	International Medieval Congress Leeds
28	The Hungarian Kingdom, Transylvania, and the Cuman Steppe between the battle of Kalka, 1223 and the Great Tartar Invasion 1241-1242	2014	Prezentare Orala	International Medieval Congress Leeds