



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie București

TEZĂ DE DOCTORAT
- Rezumat -

**Diagnosticul malariei în probe arheologice umane:
o analiză biologică a dovezilor (bio)arheologice**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. Octavian POPESCU

DOCTORAND:
Ioana Cătălina MIHALACHE (PAICA)

2023

CUPRINS

Mulțumiri	3
Lista de abrevieri.....	4
1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
1.1. PALEOPATOLOGIA.....	5
1.1.1. Ce este paleopatologia?	5
1.1.2. Aspecte generale	7
1.1.3. Degradarea / Conservarea moleculelor biologice în oase	8
1.1.4. Analizele moleculare în bioarheologie / paleopatologie	11
1.2. MALARIA.....	15
1.2.1. Descrierea bolii	15
1.2.2. Paraziți / Vectori de transmitere.....	16
1.2.3. Ciclul de viață al <i>Plasmodium</i> spp.	17
1.2.4. Simptome clinice / Morbiditate și mortalitate.....	19
1.2.5. Eforturile de eradicare a malariei	20
1.2.6. Identificarea malariei în Paleopatologie. Ce este relevant în context bioarheologic?	23
1.2.7. Modificări osoase asociate cu malaria	24
1.2.8. Diagnosticul malariei prin analiza ADN-ului vechi.....	24
1.2.9. Diagnosticul malariei prin analiza proteinelor vechi / metode imunologice	25
1.2.10. Hemozoina	26
1.3. MALARIA ÎN ROMÂNIA.....	30
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	33
2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	33
3. MATERIALE ȘI METODE	35
3.1. MATERIALE	35
3.2. ANALIZA ADN-ULUI VECHI	41
3.2.1. Pregătirea probelor	41
3.2.2. Purificarea ADN-ului vechi	41
3.2.3. Identificarea <i>Plasmodium</i> prin analiza ADN-ului vechi	43
3.3. ANALIZA PROTEINELOR VECHI	45
3.3.1. Pregătirea probelor	45
3.3.2. Extracția proteinelor.....	45
3.3.3. Cuantificarea proteinelor.....	46
3.4. EXTRACȚIA SIMULTANĂ A ADN-ULUI ȘI PROTEINELOR.....	48

3.4.1. Pregătirea probelor	48
3.4.2. Extracția simultană a ADN-ului și proteinelor.....	48
3.4.3. Metodă alternativă de extracție a ADN-ului	49
3.4.4. Metode alternative de extracție a proteinelor.....	50
3.4.6. Cuantificarea și analiza ADN-ului	50
3.4.7. Cuantificarea și analiza proteinelor.....	52
3.5. TESTE DE DIAGNOSTIC RAPID	55
3.6. HEMOZOINA	56
3.6.1. Microscopie optică	56
3.6.2. Microscopie electronică cu baleiaj (<i>Scanning Electron Microscopy</i> – SEM) și <i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> (EDS sau EDX).....	56
3.6.3. Microscopie electronică cu transmisie (TEM) și <i>Selected Area Electron Diffraction</i> (SAED).....	57
4. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	58
4.1. ANTROPOLOGIE FIZICĂ.....	58
4.2. ADN VECHI.....	61
4.3. PROTEINE VECHI.....	65
4.4. EXTRACȚIA SIMULTANĂ A ADN-ULUI ȘI PROTEINELOR.....	67
4.4.1. Analiza ADN-ului vechi	67
4.4.2. Cuantificarea și analiza proteinelor.....	70
4.5. TESTE DE DIAGNOSTIC RAPID	76
4.6. HEMOZOINA	79
4.6.1. Microscopie optică	80
4.6.2. Microscopie electronică cu baleiaj (<i>Scanning Electron Microscopy</i> – SEM) și <i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> (EDS sau EDX).....	83
4.6.3. Microscopie electronică cu transmisie (TEM) și <i>Selected Area Electron Diffraction</i> (SAED).....	85
<i>Difracția electronilor (Selected Area Electron Diffraction – SAED)</i>	86
4.7. SUMARUL REZULTATELOR.....	90
5. CONCLUZII	92
6. BIBLIOGRAFIE.....	94

MULȚUMIRI

Pe parcursul anilor necesari finalizării tezei de doctorat am avut ocazia de a lucra cu specialiști talentați și competenți care au contribuit la formarea mea ca cercetător, și cărora le sunt recunoscătoare pentru fiecare oportunitate de a învăța din experiența lor și pentru timpul pe care l-au investit în realizarea acestei teze.

În primul rând, îi mulțumesc domnului Acad. Octavian Popescu, coordonatorului științific al acestei lucrări, pentru ca a acceptat să o coordoneze și pentru răbdarea și înțelegerea de care a dat dovadă pe toată perioada elaborării ei. Îi sunt recunoscătoare domnului profesor pentru că m-a încurajat mereu să perseverez și să îmi urmez ideile.

O mare parte din efortul de cercetare a constat în “urmărirea” hemozoini, pe toate căile disponibile. Le sunt recunoscătoare pentru contribuțiile lor tuturor celor care m-au ajutat la colectarea și interpretarea datelor în acest sens: fără ajutorul esențial al domnului Alexandru Brînzan și al domnului dr. Ion Pencea, această teză nu ar fi fost completă. De asemenea, le mulțumesc doamnei dr. Adriana Vulpoi, domnului dr. Lucian Barbu, domnului dr. Sorin Ștefănuț și doamnei dr. Paula Prunescu, pentru ajutorul acordat în acest demers.

Doamnei dr. Beatrice Kelemen, coordonatorul meu în proiectul GENESIS, îi mulțumesc că mi-a făcut cunoștință cu bioarheologia moleculară și ca a făcut posibilă demararea acestei lucrări.

Colegilor mei din biroul 3.45, dr. Anca Manole, dr. Cristian Banciu, Mihnea Vladimirescu și Gabriel Maria le adresez nenumărate mulțumiri pentru colaborarea deschisă, acceptarea și sprijinul lor permanent.

În final, familia mea merită mulțumiri din inimă. Părinților mei le mulțumesc pentru tot sprijinul și încurajările pe care mi le-au oferit de-a lungul drumului. Alexandru, colegul meu de doctorat, a devenit un bun prieten, iar în acest prieten mi-am descoperit familia. Îi mulțumesc foarte mult că mi-a fost alături.

1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1. PALEOPATOLOGIA

Prima definiție a paleopatologiei, formulată în anul 1913 de Sir Marc Armand Ruffer, rămâne adecvată și în prezent: „**știința bolilor care pot fi demonstrate pe baza rămășițelor umane și animale**” (citat de Dutour, 2013). Paleopatologia s-a dezvoltat ca sub-domeniu al bioarheologiei și a constat inițial în descrierea anomaliilor descoperite prin observarea resturilor scheletice. În timp, studiile de paleopatologie s-au diversificat din punct de vedere metodologic și au permis o abordare cu adevărat multidisciplinară care implică arheologia, antropologia biologică, biochimia, imagistica și genetica.

De regulă, pentru ca o condiție patologică să fie diagnosticată în paleopatologie ea trebuie să producă modificări care afectează oasele și/sau dinții (Waldron, 2021). Uneori, se pot păstra țesuturi moi în urma mumificării naturale (într-un mediu uscat sau anaerob) sau artificiale (Fernández, 2012) dar majoritatea rămășițelor umane studiate în bioarheologie sunt complet scheletizate, datorită vechimii.

Rămășițele umane oferă dovezi directe ale stilului de viață și ale experiențelor trăite de oamenii respectivi. O mulțime de informații cu privire la existența zilnică a oamenilor și comunităților (care altfel ar fi inaccesibile, nefiind înregistrate în izvoare scrise) pot fi descoperite atunci când scheletele lor sunt analizate. După ce rămășițele umane sunt descoperite în săpături arheologice, starea lor ulterioară este influențată (pozitiv sau negativ) de modul în care sunt manipulate (excavate, transportate și depozitate, analizate). De aici decurg anumite probleme/considerente etice: toate scheletele umane ar trebui tratate cu demnitate și respect, dar datorită importanței lor pentru cunoașterea trecutului ar trebui, de asemenea, să fie disponibile cercetărilor. Având în vedere aceste aspecte, este de dorit să existe un echilibru între procedurile invazive de analiză și preocuparea pentru conservarea cât mai bună a rămășițelor umane. Aceasta este o problemă de care trebuie să fim conștienți în toate cercetările asupra scheletelor umane, fiind un subiect care continuă să fie discutat (vezi Larsen și Walker, 2004; Licata și Monza, 2017; Lambert și Walker, 2019; Buikstra și colab., 2022).

Analiza ADN-ului vechi a devenit o componentă esențială a studiilor de bioarheologie deoarece permite abordarea unor teme diverse legate de trecutul istoric și evolutiv. Primele secvențe de ADN vechi au fost obținute în urmă cu peste 30 de ani, iar de atunci metodele de studiu sunt în continuă dezvoltare, atât din punct de vedere metodologic, cât și teoretic. Astfel,

au fost confirmate prin intermediul ADN-ului vechi infecții cu *Mycobacterium tuberculosis* (Salo și colab., 1994), *Mycobacterium leprae* (Rafi și colab., 1994), *Yersinia pestis* (Drancourt și colab., 1998; Raoult și colab., 2000), *Plasmodium falciparum* (Taylor și colab., 1997), *Treponema pallidum* (Kolman și colab., 1999). Aceste studii au deschis calea pentru un diagnostic mai riguros în paleopatologie, chiar și în cazul markerilor scheletali imprecizi.

Proteinele vechi pot fi identificate prin metode imunologice. Metodele imunologice folosite pentru detectarea proteinelor în paleopatologie au fost sintetizate de Tran și colab. (2011). În țesuturile intacte, antigenele pot fi vizualizate prin imunohistochimie, iar proteinele extrase din diverse surse sunt cel mai frecvent analizate prin imunocromatografie sau ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Alte molecule, precum lipidele, se găsesc în cantități mai mici în os, și sunt rareori subiectul studiilor de bioarheologie. O excepție notabilă este identificarea organismelor din genul *Mycobacterium* pe baza lipidelor specifice din peretele celular (acizii micolici) (Mark și colab., 2010; Tran și colab., 2011; Donoghue, 2016; Spigelman și Rubini, 2016; Buzic și Giuffra, 2020).

1.2. MALARIA

Malaria este o boală infecțioasă cauzată de paraziți din genul *Plasmodium* și transmisă de țânțari din genul *Anopheles* (Meibalan și Marti, 2017). Patru specii de *Plasmodium* sunt paraziți specifici și cauzează malaria la oameni: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, și *Plasmodium malariae*. Studiile de filogenie moleculară au arătat că paraziții *Plasmodium* au evoluat pe parcursul a milioane de ani împreună cu oamenii și s-au răspândit *out of Africa* odată cu gazdele lor (Conway și colab., 2000; Loy și colab., 2017). Populația de *Plasmodium* s-a extins rapid începând cu 6000 de ani în urmă, datorită unei serii de schimbări în stilul de viață al oamenilor odată cu apariția societăților agricole și a așezărilor stabile de dimensiuni suficiente pentru a permite transmiterea prin țânțari (Joy și colab., 2003; Hume și colab., 2003; Siddle și Quintana-Murci, 2014).

Studiul malariei în populațiile istorice și metodele utilizate pentru diagnosticarea / identificarea malariei în paleopatologie au fost revizuite în mod cuprinzător în recenzii de literatură (Setzer, 2014; Bianucci și colab., 2015; Nerlich, 2016; 2018; Boualam și colab., 2021; Schats, 2023).

Malaria nu poate fi identificată exclusiv prin examinarea macroscopică a scheletelor umane deoarece nu conduce la modificări morfologice specifice ale oaselor, spre deosebire de alte boli infecțioase. Principalul mecanism prin care malaria poate afecta scheletul este anemia hemolitică cauzată de distrugerea masivă și simultană a hematiilor (Ghosh și Ghosh, 2007; Sinden, 2016). Cele mai frecvente leziuni ale scheletului asociate cu anemia și, prin urmare, considerate indicatori ai malariei, sunt *cribra orbitalia* (aparitia unor porozități pe peretele superior al orbitelor) și *cribra cranii* (hiperostoza porotică pe suprafața externă a oaselor cutiei craniene, în special pe oasele parietale) (Waldron, 2021; Setzer, 2014). Alte leziuni asociate cu prezența malariei sunt *cribra femora* (porozități pe colul femural) și *cribra humeralis* (porozități pe colul humerusului) (Smith-Guzmán, 2015).

În majoritatea studiilor de paleopatologie moleculară există două abordări consacrate pentru diagnosticarea malariei. Prima abordare se concentrează asupra recuperării ADN specific pentru *Plasmodium* și a analizei sale prin tehnici convenționale PCR sau NGS (*Next Generation Sequencing*). A doua abordare este identificarea imunologică a malariei, cel mai frecvent prin teste de diagnostic rapid.

Prima diagnosticare cu succes a malariei pe baza ADN-ului vechi a fost obținută de Taylor și colab. în 1997. Ei au reușit să identifice o singură secvență de ADN specifică pentru *Plasmodium* provenită dintr-o probă cu vechimea de 60 de ani. Recuperarea și analiza fragmentelor scurte de ADN specifice (folosind diferite amorse, țintind diferite gene) continuă să fie folosite ca metode de diagnostic pentru malarie. Mai recent, secvențele specifice de la *Plasmodium* au fost extrase și descrise folosind tehnici HTS (*High-Throughput Sequencing*).

Fornaciari și colab., 2010a; Fornaciari și colab., 2010b au utilizat teste de diagnostic rapid la analiza rămășițelor scheletice ale patru membri ai familiei Medici pentru a confirma diagnosticul de malarie din rapoartele de autopsie. Similar, au fost analizate folosind teste rapide proteine extrase din specimene osoase din Egiptul antic (Al-Khafif, 2018). În ciuda faptului că aplicarea testelor imunologice la probele de proteine vechi degradate s-a dovedit a fi predispusă la apariția rezultatelor fals pozitive, aplicarea acestor teste rapide rămâne o metodă de *screening* pentru cazurile în care infecția cu *Plasmodium* este probabilă.

Un marker alternativ care poate fi folosit pentru identificarea cazurilor de malarie este hemozoina. Hemozoina este produsă de organismele din genul *Plasmodium*, dar și de alte organisme hematofage: *Schistosoma mansoni* (helminți paraziți) și *Rhodnius prolixus* (insecte hematofage) în urma digestiei hemoglobinei. Formarea hemozoinei este principala cale de detoxifiere a hemului la aceste organisme (De Villiers și colab., 2012). În faza intraeritocitară a ciclului de viață *Plasmodium* utilizează între 60-80% din hemoglobina din eritrocite

(Krugliak și colab., 2002; Sun și colab., 2016). Aminoacizii rezultați din degradarea lanțurilor proteice ale hemoglobinei sunt utilizați de parazit. Digestia hemoglobinei eliberează și hemul. Parazitul nu are capacitatea de a excreta hemul liber și nu posedă o hem-oxigenază pentru a recupera fierul și a detoxifica hemul (Olivier și colab., 2014). Prin urmare, detoxifierea sa se realizează prin bio-cristalizare sub formă de hemozoina.

Faptul că hemozoina este un produs foarte stabil care se acumulează în organismul uman înseamnă că ar putea fi un marker potrivit pentru detecția în rămășițe din context arheologic. Cu toate acestea, au fost raportate foarte puține încercări de a detecta hemozoina în rămășițe umane arheologice. Prezența cristalelor de hemozină a fost descrisă folosind spectrometria de masă MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight*), ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) și microscopia electronică SEM (Cox, 2018), printr-o metodă inițiată de dr. Jamie Inwood de la Universitatea Yale (<https://news.yale.edu/2015/03/17/creating-malaria-test-ancient-human-remains>). Până în prezent, aceste rezultate nu au fost publicate în reviste de specialitate.

1.1. MALARIA ÎN ROMÂNIA

Malaria a fost prezentă istoric în cea mai mare parte Europei, de la Marea Mediterană până la țărmul sudic al Mării Baltice și din sudul Marii Britanii până în Rusia europeană (Huldén, Huldén and Heliövaara, 2005) înainte de eradicarea ei în a doua jumătate a secolului al XX-lea.

Pe teritoriul României, malaria a fost prezentă și a făcut numeroase victime înainte de începerea campaniilor de eradicare și control a malariei. Primele date privind incidența malariei pe teritoriul României au fost înregistrate începând cu sfârșitul secolului al XIX-lea (Ciucă, 1966 cf. Neghina și colab., 2011). În perioada de dinainte celui de-al doilea Război Mondial, sunt înregistrate aprox. 300.000 de cazuri de malarie anual pentru o populație de aprox. 19.000.000 locuitori, cu o creștere accelerată în timpul războiului, datorită lipsei tratamentelor anti-malarie. Speciile raportate sunt cele care apar în zona temperată: *P. vivax*, *P. falciparum* și *P. malariae* (Ciuca, 1956). Studiile lui George Zotta despre habitatul țânțarilor *Anopheles* au arătat că aproximativ 30% din teritoriul României, inclusiv toată Dobrogea, prezenta condiții favorabile pentru malaria endemică (Neghina și colab., 2011). Comisia Malariei a fost formată de Ministerul Sănătății în anul 1947 cu scopul de a organiza lupta împotriva malariei. În urma

aplicării programului de eradicare, începând cu 1962 nu au mai fost cazuri înregistrate indigene de malarie, astfel încât boala a fost declarată eradicată în România în 1963.

Momentul apariției malariei pe teritoriul de azi al României nu ne este cunoscut, și nici răspândirea speciilor și vectorilor implicați, dar este evident că populațiile istorice au fost expuse acestei boli. Completarea informațiilor istorice cu date de paleopatologie poate clarifica, la nivel local, cunoștințele despre istoria malariei în Europa. În acest context, această lucrare a fost concepută pentru a testa ipoteza că malaria a existat în perioada medievală în Dobrogea și poate fi diagnosticată pe baza dovezilor arheologice. Această ipoteză este abordată din perspectiva bioarheologică, prin analiza directă a rămășițelor umane.

2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Scopul general al tezei este studiul malariei în context bioarheologic, prin analiza rămășițelor umane provenite din două situri arheologice din S-E României (Mireasa și Capidava, jud. Constanța). Concret, am pornit de la ipoteza că malaria a afectat populațiile prezente în Dobrogea în perioada medievală și premodernă. Pentru a testa această ipoteză am analizat material scheletic uman provenit de la 38 de indivizi, urmărind mai multe obiective de cercetare:

- Datarea probelor cu radiocarbon și stabilirea perioadei de folosire a necropolelor.
- Observarea markerilor scheletici indicatori pentru anemie.
- Identificarea imunologică a unor proteine specifice genului *Plasmodium* în probele analizate.
- Identificarea unor markeri ADN specifici pentru genul *Plasmodium*.
- Detecția pigmentului specific pentru *Plasmodium* (hemozoina).

3. MATERIALE ȘI METODE

3.1. MATERIALE

Probele analizate sunt reprezentate de resturi scheletice umane provenind din două situri arheologice din S-E României (Mireasa, județul Constanța și Capidava, județul Constanța). În total au fost analizate 38 de seturi de rămășițe scheletice: 34 din situl de la Mireasa (33 din necropola medievală, unul din tumulul de Epoca Bronzului) și încă patru din situl de la Capidava. Situl Mireasa a fost identificat în timpul realizării parcului eolian Siliștea, în anul 2012. În urma documentării arheologice au fost identificate 162 de morminte, din care 14 datate în epoca bronzului și 148 datate estimativ în perioada medievală. Resturile scheletice provenite din necropola asociată cetății Capidava au fost descoperite în urma săpăturilor arheologice sistematice efectuate în perioada 2010 – 2014 (sit Sectorul X extramuros). Acestea au fost datate pe baza inventarului funerar în perioada sec. X-XI (Pinter și colab., 2011). În plus, un complex funerar din fiecare perioadă de timp presupusă (epoca bronzului și medievală pentru Mireasa; secolul al X-lea pentru Capidava) a fost datat cu radiocarbon folosind serviciul de datare Beta Analytic, Inc. Tabelul 3.1. conține o sinteză a specimenelor incluse în analize.

Tabel 3.1. Sumarul surselor de țesuturi incluse în analize

Cod identificare	Sit	Datare	Elemente anatomice
M37	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M40	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 femur
M43	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 femur
M44	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți; 1 femur
M47	Mireasa	secolul al XVII-lea	4 dinți, 1 femur
M49	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M54	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 humerus
M56	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M62	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M65	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M67	Mireasa	1635–1670 cal. AD*	4 dinți
M69	Mireasa	secolul al XVII-lea	4 dinți; 1 femur
M71	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M72	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 femur
M77	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 femur
M88	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M92	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 humerus
M95	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M96	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M97	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M100	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 femur
M107	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M111	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M112	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M116	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M118	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M126	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M131	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M133	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M134	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți, 1 femur
M142	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M144	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
M152	Mireasa	secolul al XVII-lea	2 dinți
Cap M1	Capidava	secolul al X-lea	4 dinți
Cap M4	Capidava	880–990 cal. AD*	4 dinți
Cap M8	Capidava	secolul al X-lea	4 dinți
Cap M17	Capidava	secolul al X-lea	4 dinți

*datare cu radiocarbon (Beta Analytic Inc.).

3.2. ANALIZA ADN-ULUI VECHI

Prin această metodă a fost purificat ADN vechi de la toți cei 33 de indivizi din situl Mireasa, secolul al XVII-lea (vezi tabel 3.1.). Pentru purificarea ADN-ului vechi a fost folosită pulbere obținută din țesutul dentar. Aceasta a fost obținută din pulpa dentară, accesată prin capătul rădăcinilor, cu ajutorul unui burghiu atașat de un micromotor electric, la viteză mică, pentru a evita degradarea materialului biologic prin încălzire. Purificarea ADN-ului vechi a fost efectuată folosind un protocol de recuperare a fragmentelor foarte scurte, degradate, de ADN vechi (Dabney și colab., 2013).

Pentru a testa prezența ADN-ului de *Plasmodium falciparum* în extractele de ADN vechi, amplificarea PCR a fost efectuată folosind amorse proiectate să amplifice un fragment parțial (196 pb) al genei *AMA1* (*Apical Membrane Antigen 1*), așa cum au fost utilizați cu succes de Lalremruata și colab. (2013). Pentru a monitoriza posibilele contaminări, a fost introdusă o probă control PCR (fără ADN) la fiecare 3 probe de ADN vechi amplificat.

Prezența produșilor de PCR a fost verificată prin electroforeză în gel de agaroză 2%. Benzile de dimensiunea așteptată au fost purificate din gel folosind *FavorPrep GEL/ PCR Purification Kit* (Favorgen). Fragmentele de ADN obținute din gelurile de agaroză au fost inserate în plasmide pJet1.2 folosind kitul de clonare *CloneJet PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific). Plasmidele au fost folosite pentru transformarea prin metoda KCM (Chung și Miller, 1988) a celulelor competente de *E. coli* tulpina DH5α. Plasmidele conținând produșii de amplificare AMA1 au fost izolate folosind kitul *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit* (Jena Bioscience). Fiecare produs PCR obținut a fost clonat și secvențializat în serii de câte 6 clone.

Plasmidele obținute au fost trimise la Macrogen Europe (<https://www.macrogen-europe.com/>) pentru secvențializare prin metoda Sanger folosind amorsa standard pJET1.2R. Fișierele de secvențe au fost analizate folosind *BioEdit* (Hall, 1999) și comparate cu secvența de referință *AMA1* (Gene ID: 810891, GenBank). Secvențele au fost, de asemenea, aliniat cu baza de date de nucleotide non-redundante GenBank folosind algoritmul blastn (NCBI BLAST 2.7.0+).

3.3. ANALIZA PROTEINELOR VECHI

Au fost purificate proteinele din pulpa dentară de la 30 de indivizi din situl Mireasa. Probele au costat în pulbere obținută din țesutul dentar. Aceasta a fost obținută din pulpa

dentară, accesată prin capătul rădăcinilor, cu ajutorul unui burghiu atașat de un micromotor electric, la viteză mică, folosind o freză dentară sterilizată, diferită pentru fiecare probă.

Metoda de purificare a proteinelor a fost concepută pentru acest studiu, pe baza unei metode de extracție a proteinelor din probele de pulpă dentară (Tran și colab., 2011), care a fost adaptată pentru a permite recuperarea atât a acizilor nucleici, cât și a proteinelor din aceeași probă de pulbere dentară. Deoarece pentru cele 30 de probe analiza ADN-ului vechi era deja efectuată, în această fază am folosit întreaga cantitate de probă pentru purificarea proteinelor.

Concentrația proteinelor obținute a fost determinată prin 2 metode: spectrofotometric (absorbanța la 280 nm sau A_{280}) și colorimetric (metoda Bradford).

3.4. EXTRAȚIA SIMULTANĂ A ADN-ULUI ȘI PROTEINELOR

În acest studiu au fost incluse patru seturi de rămășițe umane din necropola medievală de la Capidava (probele M1, M4, M8 și M17), unul din tumulul de la Mireasa datat în Epoca Bronzului (M6) și trei din necropola premodernă de la Mireasa (M47, M67 și M69). Au fost selectate probe din diferite epoci cu scopul de a testa limita de vechime pentru care se pot recupera biomoleculele (ADN și proteine) prin metoda propusă, dar și pentru a observa dacă starea de conservare determinată vizual influențează randamentul extracției. Probele au fost reprezentate de pulbere dentară obținută din dinți, preferabil multiradiculari.

Extracția simultană a fost realizată prin modificarea unui protocol de extracție a proteinelor descris de Tran și colab. (2011). Degradarea ADN-ului se poate evita și astfel, ambele tipuri de biomolecule pot fi recuperate din aceeași sursă, reducând astfel cantitatea de elemente anatomice distruse în urma analizelor moleculare.

Pentru a confirma funcționarea noii metode de extracție, ADN-ul din probe (dinți) aparținând acelorași seturi de rămășițe a fost extras independent, folosind coloane pe bază de silica conform protocolului descris de către Yang și colab. (1998). Acest protocol a fost adaptat pentru a se potrivi condițiilor și dotărilor disponibile în laboratorul de ADN vechi și era protocolul folosit în mod curent în acel moment. Am verificat dacă noua metodă poate fi aplicată pentru a accesa informații codificate în ADN prin amplificarea regiunilor hipervariabile ale genomului mitocondrial (HVR), unul dintre markerii moleculari cei mai utilizați în genetica populațiilor. Secvențele HVR-I ale genomului mitocondrial au fost obținute prin amplificarea a patru segmente suprapuse care acoperă această regiune în totalitate și care variază de la 126 de perechi de baze (pb) la 170 pb (Gabriel și colab., 2001). Toate fragmentele amplificate au fost clonate (*CloneJet PCR Cloning Kit*, Thermo Scientific) și minimum cinci

clone conținând insertul au fost secvențializate (MacroGen), folosind amorsa standard pJET1.2R. Secvențele rezultate au fost aliniate utilizând software-ul BioEdit și comparate cu secvența de referință a ADNmt conform *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS), GenBank: NC_012920.1.

După validarea metodei pentru extragerea ADN-ului vechi, amorsele AMA1 au fost folosite pentru identificarea ADN-ului de *Plasmodium* în aceleași probe, folosind protocolul descris în capitolul **3.2.3. Identificarea Plasmodium prin analiza ADN-ului vechi.**

În mod asemănător, pentru evalua eficienței metodei simultane am folosit două metode alternative de purificare a proteinelor. Prima este o metodă descrisă anterior de Schmidt-Schultz și Schultz (2004) pentru extracția proteinelor din țesut osos provenit din surse arheologice. A doua metodă alternativă este o soluție de extracție a proteinelor din celule animale (*ProteoJET*TM, Fermentas). Aceasta a fost folosită conform instrucțiunilor producătorului pentru extracția proteinelor din probe de țesut.

Pentru a determina rapid cantitatea de proteine obținute am măsurat A₂₈₀ pentru proteinele obținute prin toate cele trei metode descrise anterior. De asemenea, metoda Bradford (Bradford, 1976) a fost utilizată pentru estimarea mai precisă a concentrației de proteine. Ulterior, proteinele obținute prin toate cele trei metode au fost separate în funcție de masa lor moleculară prin SDS-PAGE într-un sistem discontinuu (Biometra Minigel – Analytik Jena).

3.5. TESTE DE DIAGNOSTIC RAPID

Toate cele 38 de probe pentru care s-au obținut proteine totale prin oricare dintre metodele descrise anterior au fost testate pentru prezența proteinelor specifice *Plasmodium* cu ajutorul a două teste de diagnostic rapid: BinaxNOW Malaria (Alere Inc.) și testul SeeNow Malaria (Camp Medica).

3.6. HEMOZOINA

Hemozoina este un produs al metabolismului paraziților hematofagi (inclusiv *Plasmodium*) care rezultă în urma digestiei hemoglobinei și care este un biomarker al acestor infecții. Faptul că hemozoina este un produs foarte stabil care se acumulează în organism înseamnă că ar putea fi un marker potrivit pentru detecția în rămășițe din context arheologic. Pentru a detecta prezența hemozoinii au fost selectate oase lungi intacte, preferabil osul femur. Diafiza oaselor lungi a fost deschisă și depunerile de culoare închisă au fost identificate vizual.

Acolo unde au fost disponibile, depunerile au fost răzuite de pe țesutul osos folosind o spatulă de plastic și depozitate pentru investigații ulterioare.

3.6.1. Microscopie optică

Aspectul nativ al depunerilor colectate din cavitatea măduvei osoase a oaselor lungi a fost observat cu ajutorul unei lupe binoculare (stereomicroscop) Zeiss Stemi 2000-C, pentru o confirmare rapidă a aspectului specific (depuneri negre pe țesutul osos spongios).

Fragmente mici din aceste depozite au fost montate pe lame de microscop din sticlă și inspectate prin microscopie optică standard și prin microscopie cu lumină polarizată folosind un microscop Zeiss Axio Imager M2.

3.6.2. Microscopie electronică cu baleiaj (*Scanning Electron Microscopy* – SEM) și *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* (EDS sau EDX)

Pentru a investiga aspectul morfologic al depunerilor de hemozoină, precum și compoziția elementală a probelor, probele prelevate din depozitele din cavitatea măduvei osoase au fost depuse direct, fără prelucrări suplimentare, pe suporti de aluminiu și metalizate prin pulverizare cu un strat de aur de 10 nm.

1. Analiza SEM a fost efectuată cu ajutorul unui microscop electronic de înaltă rezoluție Hitachi SU8230.
2. Analiza SEM-EDX a fost efectuată folosind un microscop electronic scanning FEI Quanta 3D FEG echipat cu un detector EDX Apollo-X SDD.
- 3.

3.6.3. Microscopie electronică cu transmisie (TEM) și *Selected Area Electron Diffraction* (SAED)

Au fost utilizate tehnici de microscopie electronică cu transmisie (TEM) și de difracție a electronilor pe suprafața selectată (SAED) pentru a determina morfologia și structura depozitelor de hemozoină. Pentru a investiga probele prelevate din depozitele din cavitatea măduvei osoase a fost utilizat un microscop Jeol JEM-1400.

Probele au fost colectate prin răzuirea depozitelor negre din țesutul osos înconjurător. Ulterior, probele primare au fost măcinate cu ajutorul unui mojar cu pistil până la obținerea unei pulberi fine și omogene.

Pentru pregătirea probelor TEM au fost utilizate două tehnici de rutină:

1. Pulberea cu granulație fină a fost transferată direct pe grile TEM acoperite cu un strat de formvar.

2. Pulberea a fost separată prin centrifugare. În primul rând, o suspensie apoasă de pulbere a fost tratată cu ultrasunete și centrifugată la 3.000 rpm timp de 1 minut pentru a dispersa și a elimina fracțiunile de dimensiuni mai mari ale probei. Supernatantul a fost apoi centrifugat la 15.000 rpm timp de 10 minute. O parte din sedimentul obținut după cea de-a doua centrifugare a fost încărcată pe o grilă TEM.

Probele procesate prin ambele metode au fost vizualizate atât în modul imagine, cât și în cel de difracție. Imaginile și spectrele de difracție corespunzătoare au fost salvate ca imagini care au fost analizate și comparate în Adobe Photoshop CC 2019.

Pentru o determinare mai exactă a prezenței hemozoini, spectrele SAED obținute au fost indexate pe baza datelor disponibile (Klonis și colab., 2010). În acest scop, camera TEM a microscopului Jeol JEM-1400 a fost calibrată cu ajutorul unei folii standard de aur policristalin.

4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1. ANTROPOLOGIE FIZICĂ

Pentru a stabili perioada de folosire a necropolelor, respectiv vechimea complexelor funerare, câte o probă/ un complex funerar din fiecare necropolă au fost datate cu radiocarbon (Beta Analytic, Inc.). Astfel, complexul M4 Capidava a fost datat în perioada 880-990 cal. AD, la fel cum a fost estimat anterior prin analiza inventarului funerar (Pinter și colab., 2011). În schimb, complexul M67 Mireasa a fost datat la 1635-1670 cal. AD, mai recent decât se presupunea inițial în urma analizei arheologice.

În urma analizei osteologice, au fost înregistrate modificările osoase cel mai frecvent asociate cu anemia: *cribra orbitalia* și *cribra cranii*. Leziuni de tip *cribra orbitalia* au fost observate la 85% dintre craniile analizate, în timp ce leziunile de tip *cribra cranii* au fost observate la 70% dintre craniile analizate. Modificările osoase nu sunt suficiente pentru a fi siguri de prezența malariei, dar a fost demonstrată o asociere între anemia hemolitică cauzată de malarie și *cribra orbitalia* și *cribra cranii* (Smith-Guzmán, 2015). Aceasta, împreună cu

faptul că Dobrogea a fost una din zonele propice pentru malaria endemică în România, susțin ipoteza inițială ca aceste populații ar putea fi afectate de malarie.

4.2. ADN VECHI

Amplificarea cu ajutorul amorselor AMA1 a produs benzi clare, de dimensiuni așteptate, pentru 10 din cele 33 de probe. În urma analizei secvențelor (identificarea insertului și a amorselor, alinierea cu secvența AMA1 (NCBI Gene ID: 810891)) am constatat că plasmidele conțineau secvențe inserate cu dimensiuni cuprinse între 122 și 202 pb. De asemenea, am constatat prezența amorselor folosite, dar printre ampliconi nu a fost fragmentul AMA1 de 196 bp așteptat. În schimb, în urma interogării bazei de date de nucleotide GenBank, folosind algoritmul blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ampliconii s-au aliniat cu secvențe nespecifice, amplificate din contaminanți (în principal bacterii din sol).

O parte din secvențe au constat în mozaicuri de molecule ADN care nu pot fi identificate cu certitudine (alinieri cu bazele de date pe mai puțin de 40% din lungimea secvenței sau alinieri cu mai multe organisme diferite, neînrudite). Majoritatea secvențelor care pot fi identificate (96%) provin de la bacterii din sol. O alta sursă de ADN identificată a fost reprezentată de insecte (*Coleoptera*), provenite probabil din procesele de descompunere.

Deoarece controalele negative PCR au fost întotdeauna curate (fără amplificare), contaminarea cu material genetic exogen pare improbabilă. Apariția acestor secvențe în amestecul de ADN vechi total recuperat pare a fi în concordanță cu încărcătura bacteriană descrisă din oase și dinți provenite de la rămășițe umane descompuse în sol (Margaryan și colab., 2018; Kazarina și colab., 2019). Așadar, aceste rezultate ar putea fi avea legătură mai degrabă cu supraviețuirea biomoleculelor din materialul osteologic.

4.3. PROTEINE VECHI

În urma analizei rezultatelor obținute se observă că A_{280} supraestimează concentrația de proteine, comparativ cu metoda Bradford. Raportul mediu observat este de 2,61 ori. O explicație plauzibilă ar putea fi co-purificarea altor substanțe care sunt extrase odată cu proteinele și care prezintă absorbantă la 280nm (peptide, acizi nucleici etc.), dar care nu sunt detectate prin testul Bradford. Având în vedere amestecul complex de proteine, este dificil de stabilit concentrația exactă, ambele metode fiind aproximări raportate la standardul BSA (o proteina pură, diferită de amestecul obținut din pulpa dentară).

4.4. EXTRAȚIA SIMULTANĂ A ADN-ULUI ȘI PROTEINELOR

Principalul scop pentru care a fost dezvoltată metoda de extracție simultană prezentată este de a recupera simultan ADN și proteine dintr-o singură probă arheologică, reducând astfel distrugerea materialului arheologic, maximizând în același timp informațiile obținute. Detaliile metodei și rezultatele obținute au fost publicate în lucrarea *Dual DNA-protein extraction from human archeological remains* (Rusu și colab., 2019).

Au fost obținute secvențe complete HVR pentru toate probele de ADN purificate cu ajutorul coloanelor de silica (prin metoda alternativă). Secvențele HVR obținute prin metoda de extracție simultană au fost apoi comparate cu acestea. Modelul de polimorfism molecular observat în secvențe analoge a fost identic pentru aproape toate probele. Singura excepție este fragmentul HVR-IA al individului M6 de la Mireasa, cel mai vechi specimen inclus în acest studiu. Fiind datat din Epoca Bronzului, este foarte posibil ca acest lucru să se explice prin conservarea slabă a acizilor nucleici.

În urma încercărilor repetate de a identifica ADN specific paraziților *Plasmodium* au fost obținute amplificări pentru două dintre probe. După clonare (minim 5 clone/ amplicon) și secvențiere au apărut aceleași rezultate descrise în capitolul 4.2.: fie amplificări din material contaminant din sol, fie au fost obținute secvențe care nu pot fi identificate.

Am calculat randamentul tuturor metodelor de extracție a proteinelor (mg proteine / g țesut) pe baza concentrațiilor determinate prin metoda Bradford. Graficul din figura 4.5. conține o comparație a cantității de proteine obținute prin toate cele trei metode de extracție.

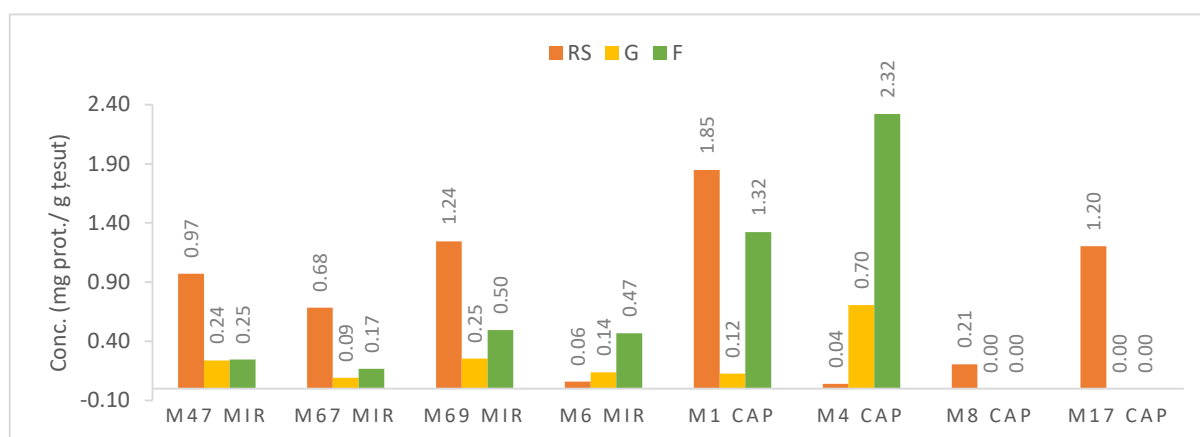


Fig. 4.5. Comparația randamentului celor 3 metode alternative de extracție a proteinelor (RS – extracție simultană; G – Schimdt-Schultz; F – ProteoJET).

În general, cel mai mare randament a fost observat atunci când proteinele au fost izolate prin metoda de extracție simultană propusă. Pentru două dintre probe, M4 Capidava și M6 Mireasa, randamentul a fost mai mare atunci când a fost utilizat ProteoJET. Pentru alte două probe, M8 Capidava și M17 Capidava, au putut fi extrase proteine numai prin metoda simultană.

Toate probele conțin proteine foarte degradate, iar separarea în SDS-PAGE este imposibilă. Deși toate probele extrase prin toate cele 3 metode conțin același *pattern* de proteine degradate care apar ca un *smear* fără benzi specifice, se pot observa în figura 4.7. diferențe între cele 3 metode alternative: extracția simultană formează un *smear* în toată gama de dimensiuni, în timp ce metodele alternative tind să recupereze predominant fie dimensiunile mari (Schmidt-Schultz și Schultz, 2004) fie cele mici (kit ProteoJET).

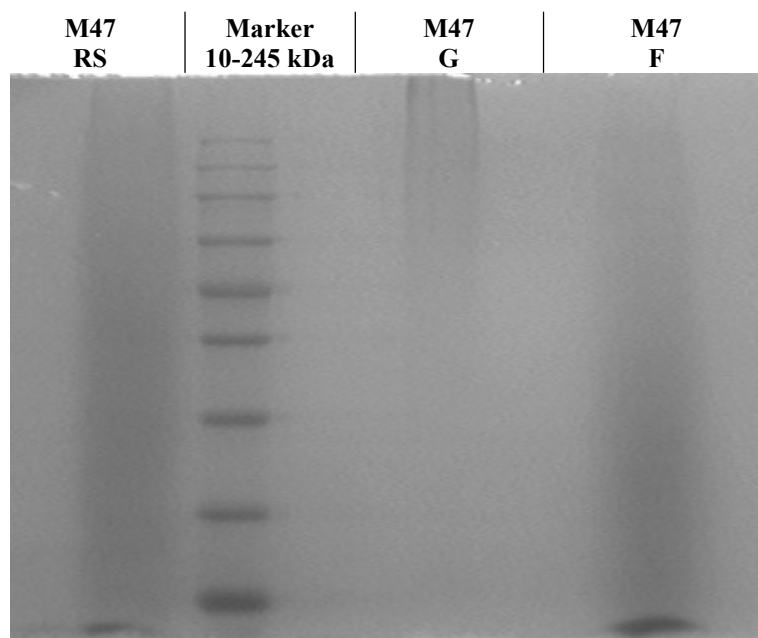


Fig. 4.7. SDS-PAGE: M47 Mireasa (RS – extracție simultană, G – Schmidt-Schultz, F – ProteoJET)

4.5. TESTE DE DIAGNOSTIC RAPID

Toate cele 38 de probe au fost testate pentru a detecta prezența proteinelor specifice pentru genul *Plasmodium*. Pentru fiecare probă au fost repetate minimum trei teste de diagnostic rapid. Din cele 38 de probe, 20 (53%) au dat cel puțin un rezultat pozitiv la testele de diagnostic rapid. Testul BinaxNOW Malaria a fost utilizat pentru 14 probe (dintre care 5 pozitive), în timp ce testul SeeNow Malaria a fost utilizat pentru 26 probe (dintre care 16

pozitive). Două dintre probe au fost testate folosind ambele teste și au prezentat rezultate congruente: o probă (M88) a fost pozitivă, în timp ce cealaltă (M112) a fost negativă.

4.6. HEMOZOINA

Au fost descoperite depuneri negre (fig. 4.11.), considerate prezumtiv hemozoină, în oasele lungi ale unor indivizi selectați pentru acest tip de investigație (vezi tabelul 3.1.). Aceste depozite negre au fost colectate și analizate în continuare pentru a testa dacă tehnicile de microscopie sunt adecvate pentru identificarea hemozoinei.

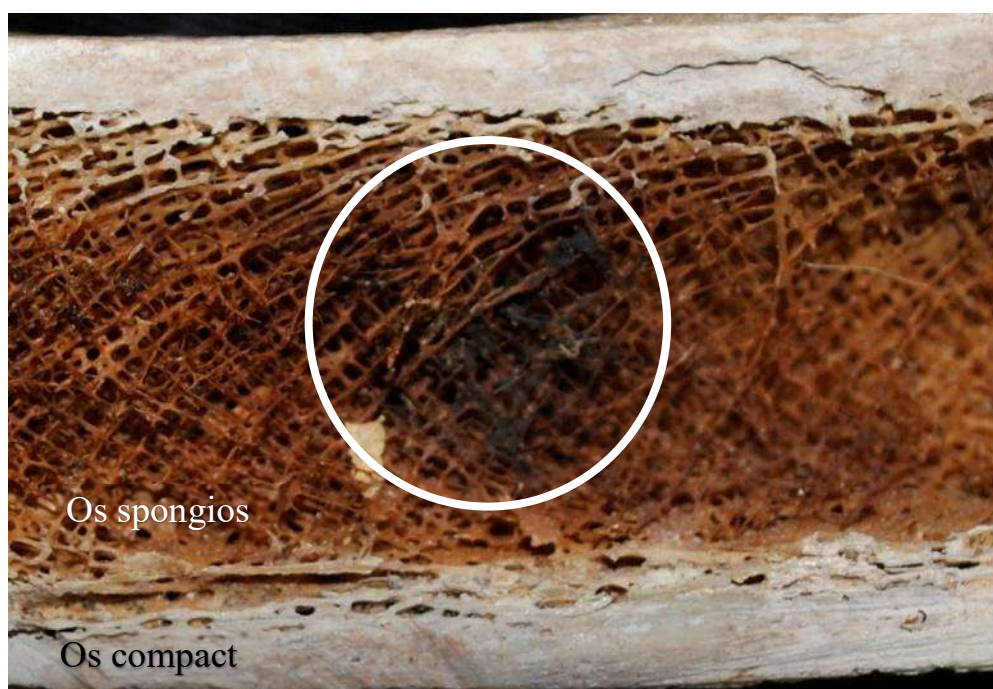


Fig. 4.11. Presupuse depuneri de hemozoină (în interiorul cercului alb) vizibile pe osul spongios al unui femur (M69)

4.6.1. Microscopie optică

Aspectul nativ al depunerilor a fost observat la stereomicroscop. Acestea sunt formate din conglomerate de forme neregulate strâns asociate cu țesutul osos înconjurător.

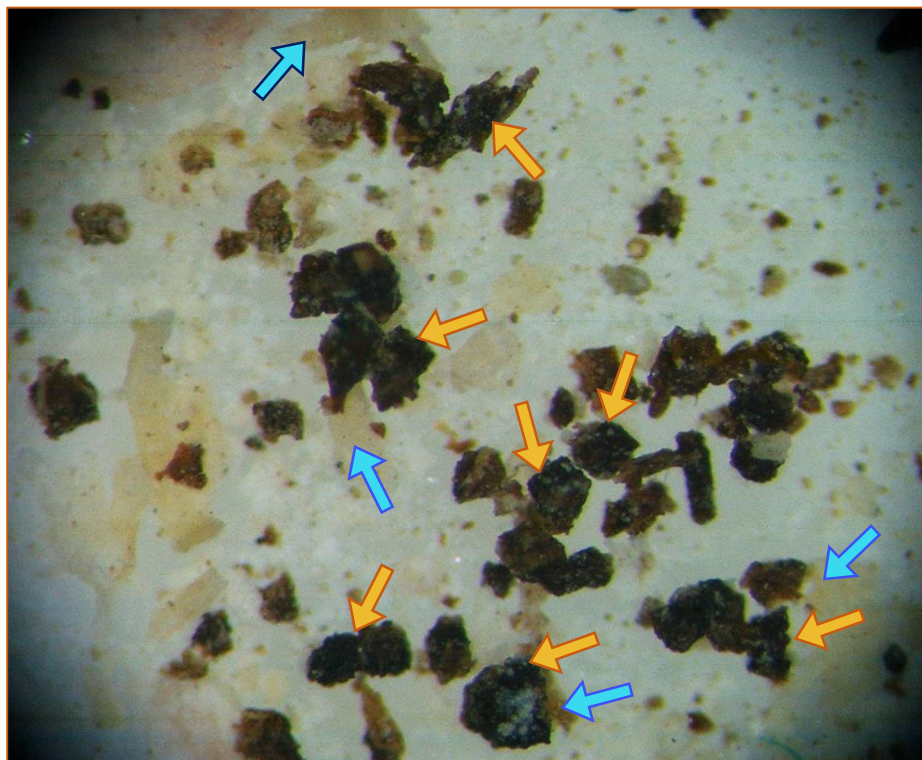
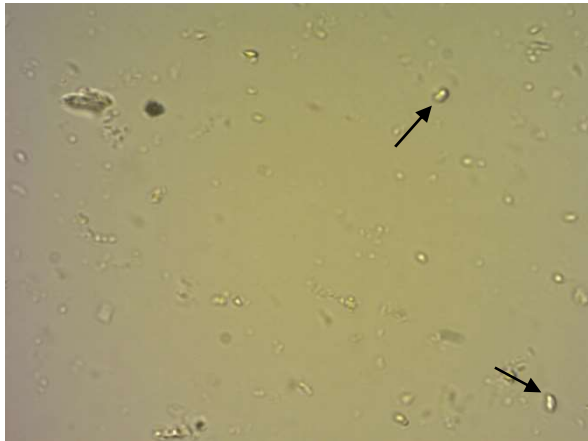


Fig. 4.12. Aspectul nativ al depunerilor de hemozoină (negre, marcate cu săgeți portocalii) asociate cu țesut osos (alb/galben, marcat cu săgeți albastre) (mărire 50X)

Depunerile prezintă o birefrință caracteristică la microscopia în lumină polarizată (Lautenschlager și colab., 2019), așa cum se poate observa în figura 4.13.. Microscopia în lumină polarizată pune eficient în evidență prezența pigmentului, de aceea este folosită în identificarea acestor paraziți în probe de sânge proaspăt încă din anii 1980 (Cho și colab., 2012; Pirnstill și Côté, 2015).

Lumină albă



Lumină polarizată

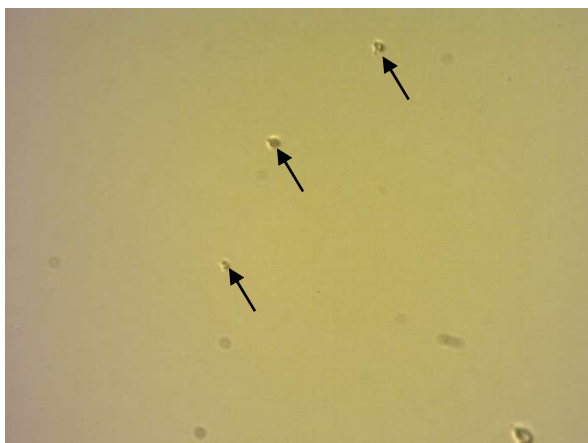
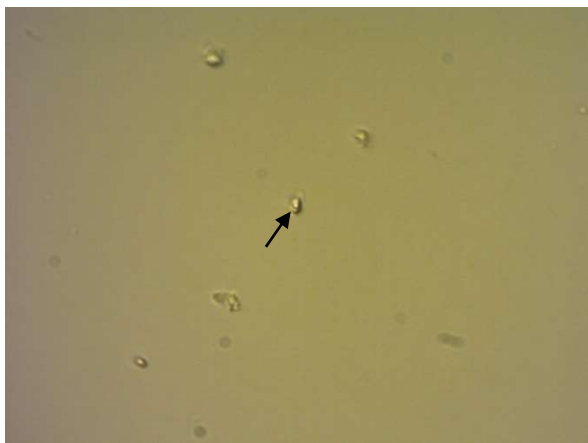
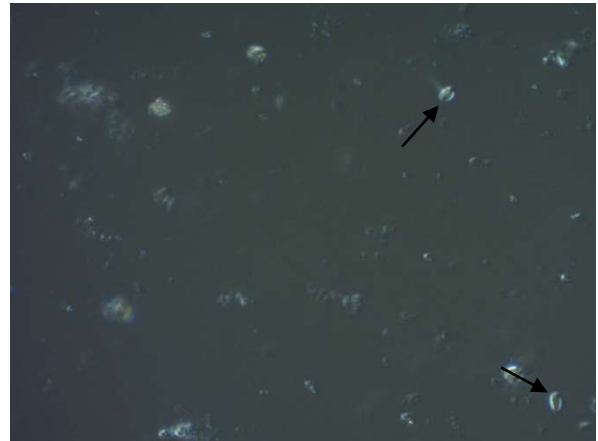


Fig. 4.13. Fragmente mici din depunerile colectate din oase arheologice sunt refringente în lumină polarizată (1000 X)

4.6.2. Microscopie electronică cu baleiaj (*Scanning Electron Microscopy* – SEM) și *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* (EDS sau EDX)

Analiza SEM a depozitelor din măduva osoasă a evidențiat cristale cu o lungime de 100-150 nm (fig. 4.15.) și o lățime de aproximativ 30 nm.

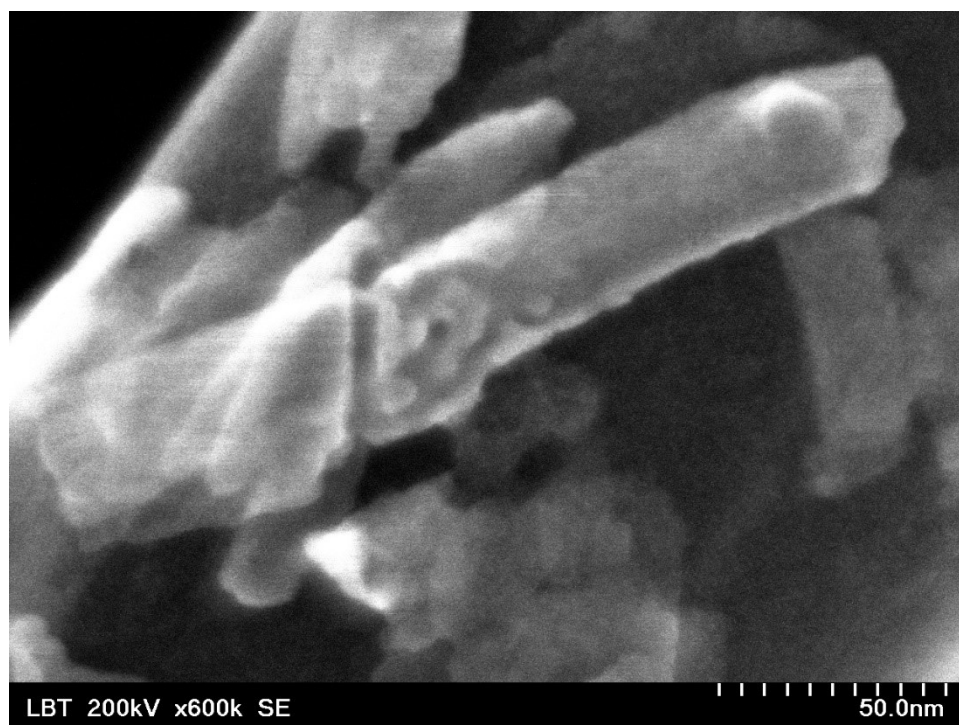


Fig.4.15 . Morfologia unui cristal identificat în depunerile de hemozină

Compoziția și distribuția spațială a elementelor arată modul de distribuție a fierului și corelația sa spațială cu oxigenul (fig. 4.16.). Compoziția elementală astfel detectată este congruentă cu natura chimică a hemozoinii (Wendt și colab., 2021), un polimer de hem care conține carbon, oxigen, azot, fier. Calciul și oxigenul, specifice matricei organice, sunt detectate pe întreaga zonă analizată, așa cum este de așteptat având în vedere prezența țesutului osos.

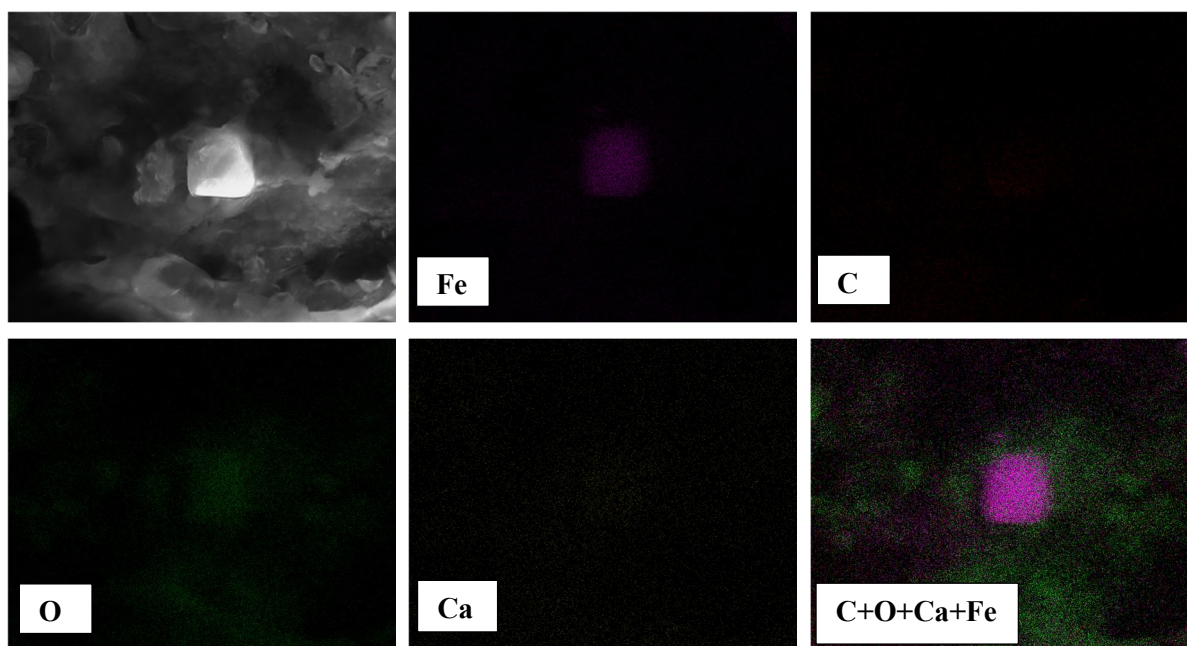


Fig. 4.16. Analiza SEM / EDX pentru cartarea elementelor/ distribuția spațială a elementelor

4.6.3. Microscopie electronică cu transmisie (TEM) și *Selected Area Electron Diffraction* (SAED)

Probele (pulbere fină, obținută prin mărunțirea mecanică a depunerilor) care au fost depuse direct pe grilă au arătat că particulele din ambele probe analizate prezintă o heterogenitate morfologică considerabilă (Fig. 4.17.A. și Fig. 4.17.D.). În zonele mai puțin transparente (marcate cu săgeți roșii) pot fi observate conglomerate de particule aciforme, precum și particule mai transparente (marcate cu săgeți albastre) de forme și dimensiuni neregulate.

Un aspect mai uniform al particulelor a fost observat în cazul în care probele (din aceeași sursă) au fost depuse pe grilă după sonicare și centrifugare (Fig. 4.17.B. și Fig. 4.17.E.). Morfologia cristalelor este similară în ambele probe investigate. Particulele observate au o formă de ac de aproximativ 150 nm lungime și 25 nm diametru, după cum se poate distinge în unele zone mai puțin dense.

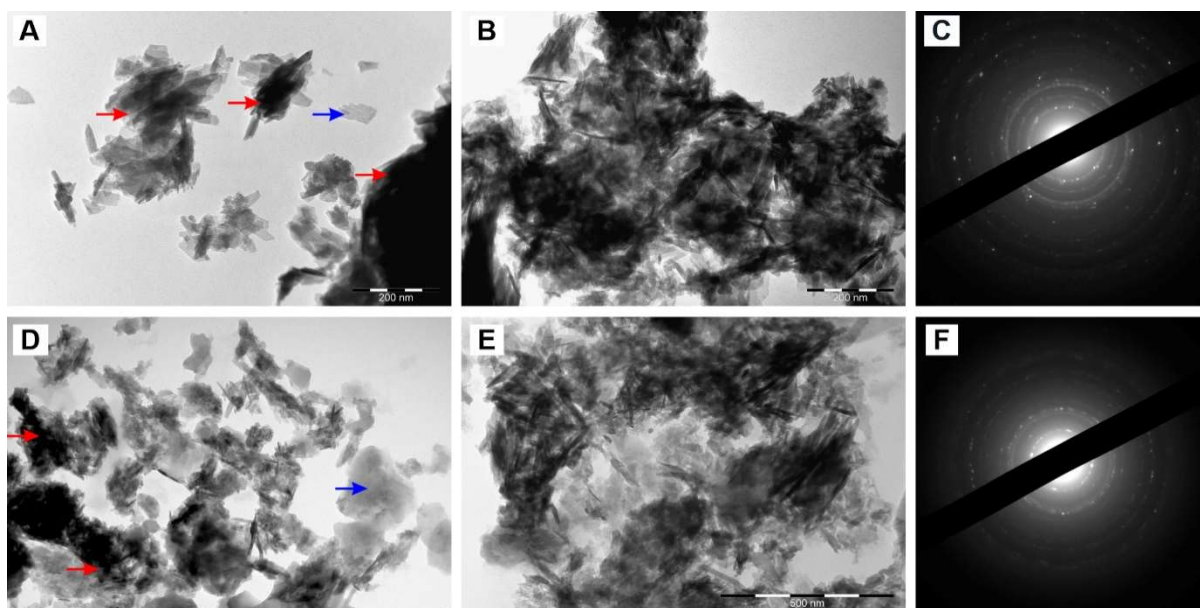


Fig. 4.17. A,D probele depuse direct pe grilă; B, E probele ultrasonicate și centrifugate; C,F Modelele SAED asociate probelor (din Paica și colab., 2023 © Elsevier Inc.)

Aspectul general este comparabil cu descrierile anterioare ale hemozoini native produsă de *Plasmodium* (Noland și colab., 2003; Orbán și colab., 2014), dar dimensiunile particulelor sunt mai mici. În schimb, dimensiunile acestor particule sunt similare cu cele observate la probele vizualizate prin SEM. Cercetările privind caracterizarea structurală și morfologică a hemozoini se limitează la probe proaspete (culturi de celule, sânge, măduvă osoasă), în timp ce pentru probele arheologice nu am identificat niciun fel de date în literatura de specialitate. Nu se cunoaște modul în care vârsta istorică a probelor, protocoalele de procesare sau diferitele medii *post-mortem* afectează morfologia cristalelor.

Probele arheologice incluse în analiza TEM și SAED au dat naștere unor modele de difracție electronică. Apariția acestor modele constituie dovada că probele studiate au structură cristalină. Modelele de difracție ale particulelor de hemozină dispersate, formate din inele concentrice, sunt specifice cristalitelor orientate aleatoriu (Fig. 4.17.C. și Fig. 4.17.F.). Din cauza faptului că hemozoina este aderentă pe țesutul osos spongios și nu poate fi separată, fragmentele de țesut osos apar ca impurități în imaginile TEM. În plus, hidroxiapatita criptocristalină din țesutul osos precum și alte impurități amorfe apar ca fundal amorf în difracția electronilor.

Prin suprapunerea modelului experimental (Fig. 4.18.A.) cu datele de referință (Slater și colab., 1991 - fig. 4.18.B.; Oliveira și colab., 2005 - fig. 4.18.C.) se poate observa cu ușurință că modelul de difracție obținut coincide atât în funcție de pozițiile unghiulare, cât și în funcție de intensitățile liniilor de difracție. În plus, difractograma de raze X (XRD) se aseamănă cu ambele modele de difracție, indiferent de metoda de analiză.

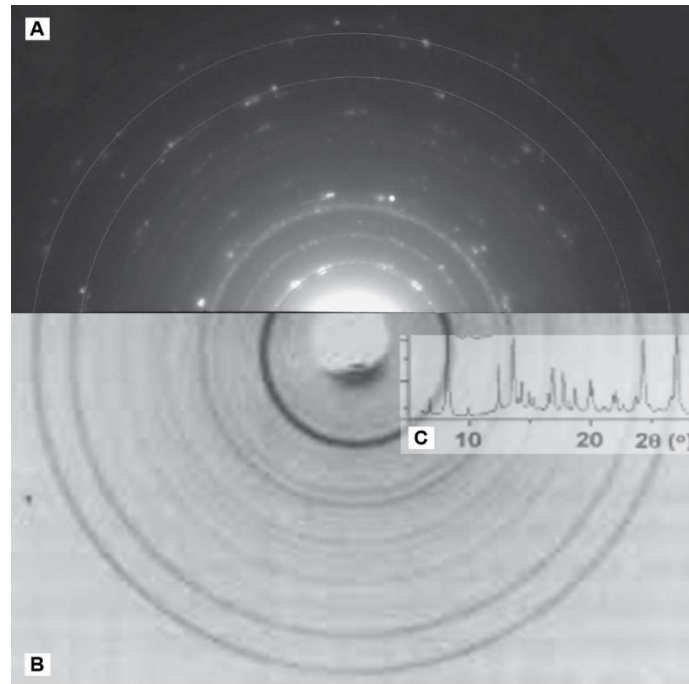


Fig. 4.18. Sector al unui model de difracție comparat cu datele de referință:

A. Modelul SAED M44

B. modelul de difracție a razelor X de referință modif. din (Slater și colab., 1991)

C. difractograma de raze X realizată pe hemozină, modif. din Oliveira și colab., 2005.

Pentru a furniza informații suplimentare cu privire la structura cristalelor, au fost calculate distanțele interplanare pentru planurile care corespund celor mai intense vârfuri de difracție electronică, notate d_{exp} . Datele experimentale (d_{exp}) au fost comparate cu distanțele teoretice (d_{hkl}) calculate pe baza datelor din Oliveira și colab. (2005), după cum se arată în tabelul 4.7. Diferențele dintre distanțele interplanetare calculate pentru datele noastre experimentale și cele teoretice sunt neglijabile, prin urmare putem considera că probele analizate conțin cristale de hemozină.

Tabel. 4.7. Distanțele interplanare calculate pe baza datelor teoretice (d_{hkl}) și a datelor experimentale (d_{exp}) pentru planurile definite de principalii indici Miller (hkl).

Plan			Distanța interplanară (Å)	
h	k	l	d_{hkl}	d_{exp}
1	0	0	11.98	11.96
0	2	0	7.28	7.31
1	2	0	5.87	5.85
2	1	1	4.19	4.23
0	3	1	4.11	4.11
1	3	1	3.69	3.71
3	1	0	3.72	3.73
3	1	1	3.23	3.23

Rezultatele indică faptul că depozitele ce apar în oasele lungi ale rămășițelor arheologice ar putea fi utilizate ca metodă alternativă pentru diagnosticarea malariei. În plus, hemozina este ușor de vizualizat cu ajutorul microscopiei în lumină polarizată fără procesarea suplimentară a probelor, permițând confirmarea prezenței ei în câteva minute. Analiza elementală calitativă a depozitelor a confirmat, de asemenea, prezența Fe, C și O, ceea ce este în concordanță cu compoziția chimică cunoscută a hemozinei. În plus, modelele de difracție a electronilor obținute pentru probele studiate pot fi atribuite hemozinei. Astfel, în urma diferitelor analize de microscopie am adus dovezi convingătoare că depozitele de hemozină supraviețuiesc în oasele lungi ale resturilor scheletice ale indivizilor afectați de malarie și că acestea sunt disponibile pentru prelevare și identificare.

4.7. SUMARUL REZULTATELOR

În total, au fost analizate 38 de seturi de rămășițe scheletice, provenite din două situri arheologice: patru din situl Capidava și 34 din situl Mireasa (din care unul din tumulul de Epoca Bronzului și 33 din necropola pre-modernă). Rezultatele obținute sunt prezentate sumar în tabelul 4.8..

Pentru toate cele 38 de probe au fost purificate ADN și proteine, fie independent, fie prin metoda de extracție simultană. ADN-ul și proteinele obținute au fost folosite în scopul identificării unor biomarkeri specifici pentru *Plasmodium* pentru a evalua prezența și frecvența malariei în populațiile studiate.

Rezultatele testelor imunologice au fost pozitive pentru 20 (53%) din probele analizate, ceea ce sugerează prezența malariei. Cu toate acestea, testele de diagnostic sunt concepute pentru diagnosticul din sânge proaspăt, și rezultatele trebuie privite ca o indicație mai mult decât ca un diagnostic precis. Compoziția probelor de proteine extrase din țesuturi arheologice este necunoscută și nu pot fi excluse reacții încrucișate cu reziduuri bacteriene sau fungice din mediul de îngropare sau cu alte substanțe din sol.

În total au fost obținute secvențe de ADN amplificate cu amorse specifice pentru *Plasmodium* pentru 10 din cei 38 de indivizi (26%), dar analiza lor a evidențiat doar prezența ADN-ului contaminant din mediu. Rezultatele privind ADN-ul vechi demonstrează limitele abordării bazate pe PCR în cercetarea paleopatologică, impuse de cantitatea minusculă de ADN al parazitului conservat în rămășițele umane arheologice.

Depunerile de hemozină au putut fi observate doar pentru o parte din scheletele analizate, în funcție de starea de conservare și de prezența oaselor lungi intacte. Analizele referitoare la hemozină au fost distructive și nu au am considerat că sunt necesare pentru toți indivizii, deoarece ele au avut scopul de a demonstra conceptul că acest biomarker poate fi identificat în context arheologic. Prezența depunerilor de hemozină a fost observată la 10 indivizi. Opt dintre ei au avut rezultate pozitive la testele imunologice, iar doi au avut rezultate negative. Apariția acestor rezultate parțial incongruente poate fi explicată prin diferențele în conservarea și recuperarea moleculelor biologice.

Tabelul 4.8. Sumarul rezultatelor

Nr. crt.	Probă	Teste imunologice		ADN <i>Plasmodium</i>	Microscopie optică	Microscopie electronică	
		BinaxNOW	SeeNow			TEM	SEM
1.	M37		+	×			
2.	M40		+	nespecific			✓
3.	M43		-	×			✓
4.	M44	-		nespecific		✓	
5.	M47	+		nespecific	✓		
6.	M49	-		×			
7.	M54	+		nespecific	✓		
8.	M56		-	×			
9.	M62		+	×			
10.	M65		+	nespecific			
11.	M67		-	nespecific			
12.	M69	+		nespecific	✓	✓	
13.	M71	-		×			
14.	M72		+	nespecific	✓		✓
15.	M77		-	×			
16.	M88	+	+	×			✓
17.	M92		-	nespecific			
18.	M95		+	×			
19.	M96		+	×			
20.	M97		+	×			
21.	M100		+	×			✓
22.	M107		-	×			
23.	M111		+	nespecific			
24.	M112	-	-	×			
25.	M116		+	×			
26.	M118		-	×			
27.	M126		+	×			
28.	M131	-		×			
29.	M133		+	×			✓
30.	M134		-	×			
31.	M142		+	×			
32.	M144		+	×			
33.	M152		-	×			
34.	M1 Cap	-		×			
35.	M4 Cap	-		×			
36.	M8 Cap	+		×			
37.	M17 Cap	-		×			
38.	M6	-		×			

5. CONCLUZII

În această lucrare am investigat prezența parazitului *Plasmodium* sau a reziduurilor sale în materialul scheletic uman de proveniență arheologică. Abordarea interdisciplinară a temei s-a dovedit necesară din cauza complexității biologiei parazitului, complicată suplimentar de starea de degradare inerentă a probelor arheologice.

- 1) Câte o probă pentru fiecare necropolă inclusă în studiu a fost datată cu radiocarbon pentru a stabili cu certitudine vechimea probelor. În timp ce vechimea necropolei medievale de la Capidava și a tumulului de Epoca Bronzului de la Mireasa sugerate de contextul arheologic au fost confirmate de datarea cu ^{14}C , necropola de la Mireasa este mai recentă decât se presupunea inițial, fiind datată la perioada pre-modernă.
- 2) În urma analizei antropologice au fost înregistrate leziuni osoase indicatoare ale anemiei la majoritatea scheletelor, ceea ce susține ipoteza ca populațiile studiate ar fi putut fi afectate de malarie.
- 3) Am căutat să vedem dacă există ADN de *Plasmodium* spp. într-o cantitate rezonabilă în probele noastre pentru a putea fi identificat. Deși ADN-ul vechi uman a putut fi recuperat, încercările de a recupera ADN-ul parazitului au fost împiedicate de prezența ADN-ului contaminant din sol (bacterii și insecte care apar inevitabil în cazul rămășițelor care au fost înhumate).
- 4) În paralel cu analiza ADN-ului, au fost utilizate și testele de diagnostic rapid pentru detectarea prezenței proteinelor specifice *Plasmodium* spp. ale căror rezultate sugerează prezența parazitului în populațiile studiate.
- 5) Cercetările privind ambele tipuri de molecule (ADN și proteine) au dispus elaborarea și testarea unei metode originale de izolare a ADN-ului și a proteinelor vechi din aceeași sursă de țesut, reducând astfel cantitatea de țesuturi arheologice distruse în scopul analizelor moleculare. Detaliile acestei metode au fost publicate în lucrarea Rusu I*, Paica I* și colab., Dual DNA-protein extraction from human archeological remains. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 11, 3299–3307 (2019).
- 6) Un alt produs al metabolismului produs de *Plasmodium*, hemozoina, ar putea fi un biomarker potrivit atunci când rezultatele analizelor ADN-ului vechi și ale proteinelor sunt insuficiente sau inconcludente. Detecția hemozoinii în rămășițe arheologice este teoretic posibilă, dar nu sunt raportate decât puține încercări de a identifica acest produs de

metabolism, și acelea neconcludente. În cadrul acestor studii am identificat depozite de hemozoină pe care le-am analizat detaliat prin metode de microscopie optică și electronică, pe baza unor caracteristici precum birefrința în lumina polarizată, compoziția elementală (SEM/EDX) sau modelul specific de difracție a electronilor (TEM/SAED). Rezultatul acestor cercetări a fost descris în lucrarea Paica și colab., Tentative indicators of malaria in archaeological skeletal samples, a pilot study testing different methods. *International Journal of Paleopathology*, 40, 109-116 (2023).

Rezultatele studiilor subliniază provocările și limitele diagnosticului malariei în paleopatologie pe baza proteinelor și a ADN-ului vechi. În același timp, rezultatele studiului pilot demonstrează că detecția și caracterizarea hemozoinei prin metode de microscopie este o strategie promițătoare care ar putea fi utilizată în diagnosticarea malariei, pentru completarea dovezilor genetice și imunologice. O evaluare mai aprofundată a disponibilității și conservării hemozoinei în probe de oase din contexte arheologice mai diverse (din punct de vedere al conservării, vârstei, condițiilor de mediu etc.) ar fi utilă pentru dezvoltarea viitoare a acestei strategii de diagnostic în paleopatologie.

Lista lucrărilor publicate din subiectul tezei

1. Rusu, I., **Paica, I.**, Vulpoi, A., Radu, C., Mircea, C., Dobrinescu, C., Bodolică, V., Kelemen, B. (2019) Dual DNA-protein extraction from human archeological remains. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 11, 3299–3307.
2. **Paica, I. C.**, Rusu, I., Popescu, O., Brînzan, A., Pencea, I., Dobrinescu, C., & Kelemen, B. (2023). Tentative indicators of malaria in archaeological skeletal samples, a pilot study testing different methods. *International Journal of Paleopathology*, 40, 109-116.

6. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Al-Khafif, G. D., El-Banna, R., Khattab, N., Gad Rashed, T., & Dahesh, S. (2018). The immunodetection of non-falciparum malaria in ancient Egyptian bones (Giza Necropolis). *BioMed Research International*, 2018.
- Bianucci, R. Araujo, A., Pusch, C.M. și Nerlich, A.G. (2015) 'The identification of malaria in paleopathology – An in-depth assessment of the strategies to detect malaria in ancient remains', *Acta Tropica*, 152, pp. 176–180. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.09.002.
- Boualam, M.A., Pradines, B., Drancourt, M. and Barbieri, R. (2021) 'Malaria in Europe: A Historical Perspective', *Frontiers in Medicine*, 8, 691095. doi: 10.3389/fmed.2021.691095.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buikstra, J.E., DeWitte, S.N., Agarwal, S.C., Baker, B.J., Bartelink, E.J., Berger, E., Blevins, K.E., Bolhofner, K., Boutin, A.T., Brickley, M.B., Buzon, M.R., de la Cova, C., Goldstein, L., Gowland, R., Grauer, A.L., Gregoricka, L.A., Halcrow, S.E., Hall, S.A., Hillson, S., Kakaliouras, A.M., Klaus, H.G., Knudson, K.J., Knüsel, C.J., Larsen, C.S., Martin, D.L., Milner, G.R., Novak, M., Nystrom, K.C., Pacheco-Forés, S.I., Prowse, T.L., Robbins Schug, G., Roberts, C.A., Rothwell, J.E., Santos, A.L., Stojanowski, C., Stone, A.C., Stull, K.E., Temple, D.H., Torres, C.M., Toyne, J.M., Tung, T.A., Ullinger, J., Wiltschke-Schrotta, K. și Zakrzewski, S.R. (2022) 'Twenty-first century bioarchaeology: Taking stock and moving forward', *American Journal of Biological Anthropology*, 178 (Supple 74), pp. 54-114. doi: 10.1002/ajpa.24494.
- Buzic, I. și Giuffra, V. (2020) 'The paleopathological evidence on the origins of human tuberculosis: a review', *Journal of preventive medicine and hygiene*, 61(1), pp. 3–8. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1s1.1379.
- Cho, S., Kim, S., Kim, Y. și Park, Y.K. (2012) 'Optical imaging techniques for the study of malaria', *Trends in Biotechnology*. 30(2), pp. 71–79. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.08.004.
- Ciuca, M. (1956) 'Le paludisme en Roumanie de 1949 - 1955.', *Bulletin of the World Health Organization*, 15(3–5), pp. 725–751.
- Ciuca, M. (1966) L'e'radication du paludisme en Roumanie. *Bucharest: Medical Publishing House*, 57–156
- Conway, D.J., Fanello, C., Lloyd, J.M., Al-Joubori, B.M., Baloch, A.H., Somanath, S.D., Roper, C., Oduola, A.M., Mulder, B., Pova, M.M., Singh, B. și Thomas, A.W. (2000) 'Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111(1), pp. 163–171. doi: 10.1016/s0166-6851(00)00313-3.
- Cox, M.D. (2018) 'Malaria in the prehistoric Caribbean: the hunt for hemozoin'. Electronic Theses and Dissertations, Paper 2926. <https://doi.org/10.18297/etd/2926>.
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke I., Gansauge, M.-T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J.-L. și Meyer M. (2013) 'Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), pp. 15758–15763. doi: 10.1073/pnas.1314445110.

- De Villiers, K.A., Gildenhuis, J. și Le Roex, T. (2012) 'Iron(III) protoporphyrin IX complexes of the antimalarial cinchona alkaloids quinine and quinidine', *ACS Chemical Biology*, 7(4), pp. 666–671. doi: 10.1021/cb200528z.
- Donoghue, H.D. (2016) 'Paleomicrobiology of Human Tuberculosis', *Microbiology Spectrum*, 4(4), pp. 1–14. doi: 10.1128/microbiolspec.poh-0003-2014.
- Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O. și Raoult, D. (1998) 'Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), pp. 12637–12640. doi: 10.1073/pnas.95.21.12637.
- Dutour, O. (2013). Paleoparasitology and paleopathology. Synergies for reconstructing the past of human infectious diseases and their pathocenosis. *International Journal of Paleopathology*, 3(3), 145-149.
- Fernández, P.L. (2012) 'Palaeopathology: The study of disease in the past', *Pathobiology*, 79(5), pp. 221–227. doi: 10.1159/000335165.
- Fornaciari, G., Giuffra, V., Ferroglio, E. și Bianucci, R. (2010a) 'Malaria was "the killer" of Francesco I de' Medici (1531-1587)', *American Journal of Medicine*, 123(6), pp. 568–569. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.12.020.
- Fornaciari, G., Giuffra, V., Ferroglio, E., Gino, S. și Bianucci, R. (2010b) 'Plasmodium falciparum immunodetection in bone remains of members of the Renaissance Medici family (Florence, Italy, sixteenth century)', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(9), pp. 583–587. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.06.007.
- Gabriel, M. N., Huffine, E. F., Ryan, J. H., Holland, M. M., & Parsons, T. J. (2001) 'Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer set" amplification strategy.', *Journal of forensic sciences*, 46(2), pp. 247–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11305426>.
- Ghosh, K și Ghosh, K. (2007) 'Pathogenesis of anemia in malaria: A concise review', *Parasitology Research*, 101(6), pp. 1463–1469. doi: 10.1007/s00436-007-0742-1.
- Huldén, L., Huldén, L. and Heliövaara, K. (2005) 'Endemic malaria: An "indoor" disease in northern Europe. Historical data analysed', *Malaria Journal*, 4, pp. 1–13. doi: 10.1186/1475-2875-4-19.
- Hume, J.C.C., Lyons, E.J. și Day, K.P. (2003) 'Malaria in antiquity: A genetics perspective', *World Archaeology*, 35(2), pp. 180–192. doi: 10.1080/0043821000111362.
- Joy, D.A., Feng, X., Mu, J., Furuya, T., Chotivanich, K., Krettli, A.U., Ho, M., Wang, A., White, N.J., Suh, E., Beerli, P. și Su, X.Z. (2003) 'Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*', *Science*, 300(5617), pp. 318–321. doi: 10.1126/science.1081449.
- Kazarina, A., Gerhards, G., Petersone-Gordina, E., Kimsis, J., Pole, I., Zole, E., Leonova, V., & Ranka, R. (2019) 'Analysis of the bacterial communities in ancient human bones and burial soil samples: Tracing the impact of environmental bacteria', *Journal of Archaeological Science*. Elsevier, 109(July), p. 104989. doi: 10.1016/j.jas.2019.104989.
- Klonis, N., Dilanian, R., Hanssen, E., Darmanin, C., Streltsov, V., Deed, S., Quiney, H., & Tilley, L. (2010) 'Hematin-hematin self-association states involved in the formation and reactivity of the malaria parasite pigment, hemozoin', *Biochemistry*, 49(31), pp. 6804–6811. doi: 10.1021/bi100567j.
- Kolman, C.J., Centurion-Lara, A., Lukehart, S.A., Owsley, D.W. și Tuross, N. (1999) 'Identification of *Treponema pallidum* subspecies pallidum in a 200-year-old skeletal

- specimen', *Journal of Infectious Diseases*, 180(6), pp. 2060–2063. doi: 10.1086/315151.
- Krugliak, M., Zhang, J. și Ginsburg, H. (2002) 'Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119(2), pp. 249–256. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00427-3.
- Lalremruata, A., Ball, M., Bianucci, R., Welte, B., Nerlich, A.G., Kun, J.F.J. și Pusch, C.M. (2013) 'Molecular Identification of Falciparum Malaria and Human Tuberculosis Co-Infections in Mummies from the Fayum Depression (Lower Egypt)', *PLoS ONE*, 8(4), e60307. doi: 10.1371/journal.pone.0060307.
- Lambert, P. și Walker, P. (2019) 'Bioarchaeological ethics : Perspective on the use and value of human remains in scientific research', *Biological Anthropology of the Human Skeleton*, pp. 3–42.
- Larsen, C. și Walker, P.L. (2004) 'The Ethics of Bioarchaeology', in *Biological Anthropology and Ethics*, pp. 111–120.
- Lautenschlager, S. D. O. S., Kim, T., Bidóia, D. L., Nakamura, C. V., Anders, H. J., & Steiger, S. (2019) 'Plasma Proteins and Platelets Modulate Neutrophil Clearance of Malaria-Related Hemozoin Crystals', *Cells*, 9(1), p. 93. doi: 10.3390/cells9010093.
- Licata, M. și Monza, F. (2017) 'Ethical issues in paleopathological and anthropological research experiences', *Acta Biomedica*, 88(3), pp. 315–318. doi: 10.23750/abm.v%vi%i.5653.
- Loy, D.E., Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Plenderleith, L.J., Sundararaman, S.A., Sharp, P.M. și Hahn, B.H. (2017) 'Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*', *International Journal for Parasitology*, 47(2-3), 87-97. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.05.008.
- Margaryan, A., Hansen, H. B., Rasmussen, S., Sikora, M., Moiseyev, V., Khoklov, A., Epimakhov, A., Yepiskoposyan, L., Kriiska, A., Varul, L., Saag, L., Lynnerup, N., Willerslev, E. & Allentoft, M. E.. (2018) 'Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones', *Ecology and Evolution*, 8(6), pp. 3534–3542. doi: 10.1002/ece3.3924.
- Mark, L., Patonai, Z., Vaczy, A., Lorand, T. și Marcsik, A. (2010). High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection. *Journal of Archaeological Science*, 37(2), 302-305. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2009.09.041>.
- Meibalan, E. și Marti, M. (2017). Biology of malaria transmission, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(3), a025452. doi: 10.1101/cshperspect.a025452.
- Neghina, R. Neghina, A. M., Marincu, I., & Iacobiciu, I. (2011) 'Malaria and the campaigns toward its eradication in Romania, 1923-1963', *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11(2), pp. 103–110. doi: 10.1089/vbz.2009.0071.
- Nerlich, A. (2016) 'Paleopathology and Paleomicrobiology of Malaria', *Microbiology Spectrum*, 4(6), 4.6.02. doi: 10.1128/microbiolspec.PoH-0006-2015.
- Nerlich, A.G. (2018) 'Molecular paleopathology and paleo-oncology—State of the art, potentials, limitations and perspectives', *International Journal of Paleopathology*, 21, pp. 77–82. doi: 10.1016/j.ijpp.2017.02.004.
- Noland, G. S., Briones, N. and Sullivan, D. J. (2003) 'The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse Plasmodium species', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(2), pp. 91–99. doi: 10.1016/S0166-6851(03)00163-4.
- Oliveira, M.F., Kycia, S.W., Gomez, A., Kosar, A.J., Scott Bohle, D., Hempelmann, E., Menezes, D., Vannier-Santos, M.A., Oliveira, P.L. și Ferreira, S.T. (2005) 'Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni*

- and *Rhodnius prolixus*', *FEBS Letters*, 579(27), pp. 6010–6016. doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.035.
- Olivier, M., Van Den Ham, K., Shio, M.T., Kassa, F.A. și Fougeray, S. (2014) 'Malarial Pigment Hemozoin and the Innate Inflammatory Response', *Frontiers in Immunology*, 5, 25. pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2014.00025.
- Orbán, Á., Butykai, Á., Molnár, A., Pröhle, Z., Fülöp, G., Zelles, T., Forsyth, W., Hill, D., Müller, I., Schofield, L., Rebelo, M., Hänscheid, T., Karl, S. și Kézsmárki I. (2014) 'Evaluation of a novel magneto-optical method for the detection of malaria parasites', *PLoS ONE*, 9(5), e96981. doi: 10.1371/journal.pone.0096981.
- Pinter, Z., Dobrinescu, C., Dragotă, A., & Kelemen, B. (2011). „Cercetări preliminare în necropola medievală de la Capidava (com. Topalu, jud. Constanța),”. *Pontica* (44) pp.387-400.
- Pirnstill, C. W. and Coté, G. L. (2015) 'Malaria Diagnosis Using a Mobile Phone Polarized Microscope', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–13. doi: 10.1038/srep13368.
- Rafi, A., Spigelman, M., Stanford, J., Lemma, E., Donoghue, H. și Zias, J. (1994) 'Mycobacterium leprae DNA from ancient bone detected by PCR', *Lancet*, 343(8909), pp. 1360–1361.
- Raoult, D., Aboudharam, G., Crubézy, E., Larrouy, G., Ludes, B. și Drancourt M. (2000) 'Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), pp. 12800–12803. doi: 10.1073/pnas.220225197.
- Salo, WL., Aufderheide, A.C., Buikstra, J. și Holcomb, T.A. (1994) 'Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), pp. 2091–2094. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2091>.
- Schats, R. (2023). Developing an archaeology of malaria. A critical review of current approaches and a discussion on ways forward. *International Journal of Paleopathology*, 41, 32-42.
- Schmidt-Schultz, T. H. and Schultz, M. (2004) 'Bone Protects Proteins over Thousands of Years: Extraction, Analysis, and Interpretation of Extracellular Matrix Proteins in Archeological Skeletal Remains', *American Journal of Physical Anthropology*, 123, pp. 30–39. doi: 10.1002/ajpa.10308.
- Setzer, T. J. (2014) 'Malaria detection in the field of paleopathology: A meta-analysis of the state of the art', *Acta Tropica*, 140, pp. 97–104. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.08.010.
- Siddle, K.J. și Quintana-Murci, L. (2014) 'The Red Queen's long race: Human adaptation to pathogen pressure', *Current Opinion in Genetics and Development*, 29, pp. 31–38. doi: 10.1016/j.gde.2014.07.004.
- Sinden, R.E. (2016) 'The biology of malaria transmission', *Recent Advances in Malaria*, pp. 87–124. doi: 10.1002/9781118493816.ch4.
- Slater, A.F., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A. și Henderson, G.B. (1991) 'An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), pp. 325–329. doi: 10.1073/pnas.88.2.325.
- Smith-Guzmán, N.E. (2015) 'The skeletal manifestation of malaria: An epidemiological approach using documented skeletal collections', *American Journal of Physical Anthropology*, 158(4), pp. 624–635. doi: 10.1002/ajpa.22819.
- Spigelman, M. și Rubini, M. (2016) 'Paleomicrobiology of Leprosy', *Microbiology Spectrum*, 4(4), pp. 1–9. doi: 10.1128/microbiolspec.poh-0009-2015.

- Sun, J., Wang, S.W., Jin, C.L., Zeng, X.L., Piao, X.Y., Bai, L., Tang, D.L. și Ji, C.L. (2016) 'Can hemozoin alone cause host anaemia?', *Parasitology Research*, 115(12), pp. 4611–4616. doi: 10.1007/s00436-016-5252-6.
- Taylor, G.M., Rutland, R. și Molleson, T. (1997), 'A sensitive polymerase chain reaction method for the detection of Plasmodium species DNA in ancient human remains. *Ancient Biomolecules*, 1, pp. 193–203
- Tran, T.-N.-N., Aboudharam, G., Raoult, D. și Drancourt, M. (2011) 'Beyond ancient microbial DNA: Nonnucleotidic biomolecules for paleomicrobiology', *BioTechniques*, 50(24), pp. 370–380. doi: 10.2144/000113689.
- Waldron, T. (2021) *Paleopathology* (2nd edition), Cambridge University Press. ISBN-13: 978-1108730884.
- Wendt, C., de Souza, W., Pinheiro, A., Silva, L., de Sa Pinheiro, A. A., Gauvin, R., & Miranda, K. (2021) 'High-Resolution Electron Microscopy Analysis of Malaria Hemozoin Crystals Reveals New Aspects of Crystal Growth and Elemental Composition', *Crystal Growth and Design*, 21(10), pp. 5521–5533. doi: 10.1021/acs.cgd.1c00087.
- Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S. Dudar, J.C. și Saunders, S.R. (1998) 'Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns.', *American Journal of Physical Anthropology*, 105(4), pp. 539–543. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199804)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1.

<https://news.yale.edu/2015/03/17/creating-malaria-test-ancient-human-remains>