

**“Evoluție Genetică: Dovezi noi în studiul unor structuri interconectate.
O călătorie biomoleculară în jurul Carpaților din Antichitate până în Evul Mediu”**

**Raport științific
Sumar 2012-2016**

CUPRINS

- 1. Sumar raportări științifice pe perioada de desfășurare a proiectului**
- 2. Raport științific an 2016 (12 luni)**
 - a. Antropologie fizică – 2012/2016
 - b. Antropologie moleculară:
 - i. Tumulul de la Mireasa și necropola medievală de la Capidava (Epoca Bronzului, perioada medievală), rezultate finale - 2016
 - ii. Tartru dentar (perioada medievală) - 2016
 - iii. Diagnostic molecular malarie (perioada premodernă) - 2016
 - c. Bioarheologie: identificarea unor resturi arheologice vegetale (cereale) - 2016
 - d. Analize conexe - 2016
- 3. Raport științific an 2015 (12 luni)**
- 4. Raport științific an 2014 (12 luni)**
- 5. Raport științific an 2013 (12 luni)**
- 6. Raport științific an 2012 (3 luni)**

1. Sumar raportări științifice pe perioada de desfășurare a proiectului

În cadrul acestui proiect, desfășurat în perioada 2012-2016, am reușit, pornind de la o echipă nucleu reunind istorici, arheologi, biologi și fizicieni afiliați la Institutul de Arheologie Vasile Pârvan al Academiei Române, Centrul de Studii Transilvane al Academiei Române, Institutul de Biologie București al Academiei Române, Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe al Universității Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca și la Facultățile de Istorie și Biologie ale Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, în premieră națională, constituirea unei rețele interdisciplinare funcționale capabilă să demareze, susțină și valorifice studii complexe având ca obiect materialul arheologic. Această rețea, a fost extinsă pe parcursul proiectului pentru a include alți actori naționali și internaționali relevanți și interesați de abordarea interdisciplinară în arheologie. Astfel, echipa funcțională include acum și cercetători ai Muzeului de Istorie Națională și Arheologie Constanța, colaborări susținute cu Universitatea din Florența (Laboratorul de Paleogenetică).

Proiectul susține activitatea de cercetare a patru studenți doctoranzi, care vor susține tezele doctorale la finalul anului 2017.

Geografic, probele analizate în cadrul proiectului acoperă zone din Transilvania, Moldova, Muntenia și Dobrogea, iar din punct de vedere cronologic au fost analizate probe neolitice, din Epoca Bronzului, perioada clasică, perioada medievală și perioada premodernă. Probele dominante analizate sunt probe osteoarheologice umane, dar au mai fost analizate și probe arheozoologice, material de inventar (ceramică, lemn, metal) și alte materiale bioarheologice (resturi vegetale).

Activitatea grupului constituit în cadrul acestui proiect va continua și se va diversifica după încheierea acestuia.

În perioada de desfășurare a proiectului au fost raportate 24 de articole publicate sau acceptate spre publicare, 61 de participări la conferințe internaționale cu prezentări orale sau postere (conform datelor încărcate în platforma de raportare).

În cadrul proiectului au fost organizate trei workshop-uri (2013, 2014 și 2015) la Cluj-Napoca în vederea popularizării rezultatelor proiectului în mediul academic și o conferință de încheiere a proiectului la Iași, în 2016.

2. Raport științific an 2016 (12 luni)

a. Antropologie fizică – 2012/2016

Principalele obiective de lucru ale laboratorului de antropologie fizică au fost: 1. realizarea unui protocol de lucru unitar care să cuprindă o selecție de metode din cele existente în literatura internațională, precum și metodologia de aplicare a acestor metode și de înregistrare a datelor; 2. analiza extinsă a unor serii de eșantioane osteologice; 3. publicarea rezultatelor prin articole științifice și participări la conferințe.

1. Protocolul de lucru

S-a realizat un protocol de lucru ce cuprinde 37 de pagini. Metodele selectate sunt folosite la nivel internațional și permit realizarea unor comparații între rezultate. Acestea urmăresc stabilirea unor atribute standard cum sunt sexul și vârsta la deces, dar și a măsurătorilor metrice și identificarea unor patologii dentare și osoase. Aceste date oferă informații cu privire la demografia populațiilor arheologice, stilul de viață, dieta și patologiiile la care erau expuși indivizii în diferite perioade istorice. Se observă de asemenea prezența traumelor și fracturilor, cu scopul identificării comportamentului violent dar și a intervențiilor post-mortem asupra defunctului.

Studiul macroscopic al materialului osteologic include următoarele observații:

- Starea de reprezentare și inventarul oaselor
- Determinarea sexului și estimarea vârstei la deces
- Inventarul dentiției și patologia dentară
- Identificarea osteoartritei
- Identificarea inflamării sub-periostale
- Identificarea patologiilor metabolice (anemie, scorbut, rahitism)
- Identificarea unor leziuni patologice indicatoare pentru boli specifice (sifilis, tuberculoză, osteomielită, sinuzită etc.)
- Realizarea măsurătorilor metrice

Metodele folosite pentru realizarea observațiilor de mai sus au fost selectate în funcție de două principii – aplicabilitate (metodele să nu dea erori când sunt aplicate pe populații de pe teritoriul României) și comparabilitate (rezultatele să poată fi comparate cu date internaționale).

Metode folosite:

1. Pentru determinarea sexului
 - a. Prin observarea caracterelor craniene – Acsadi, Nemeskeri, 1970.
 - b. Prin observarea caracterelor regiunii subpubice – Phenice, 1969; Buikstra, Ubelaker, 1994.
2. Pentru estimarea vârstei la deces
 - a. Morfologia capetelor costo-condrale – Ișcan și colab., 1984.
 - b. Morfologia simfizei pubiene – Todd, 1920, 1921.
 - c. Morfologia suprafeței auriculare – Lovejoy și colab., 1985.
 - d. Sinostoza suturilor craniene – Meindl, Lovejoy, 1985.
 - e. Uzura dentară – Brothwell, 1981.
 - f. Erupția dentară – Ubelaker, 1989.
 - g. Lungimea oaselor – pentru rămășițe fetale – Fazekas, Kósa, 1978.
 - h. Lungimea oaselor – Stloukal, Hanáková, 1978.
 - i. Sinostoza epifizelor – Coqueugnot, Weaver, 2007.

3. Analiza dentiției
 - a. Hipoplazia dentară – Hassett 2014.
4. Artroza articulațiilor – Steckel și colab., 2011.
5. Nodulii lui Schmorl – Üstündağ 2008.
6. Remodelarea leziunilor – Mensforth și colab., 1978.
7. Hiperostoza porotică – Stuart-Macadam, 1985.
8. Fracturi și traume – Lovell, 1997.
9. Modificări osoase (deranjarea secundară) – Outram, 1998; Villa, Mahieu, 1991; Outram și colab., 2005.

2. Analiza materialului osteologic

S-a analizat un număr de aproximativ 800 de schelete provenind din 26 de necropole diferite. Cronologia acestora variază, din perioada Neolitică până în secolul al 19-lea.

Tabel 1. Probe osteologice studiate

	Nume sit	Județ	Datare cronologică	Număr de schelete	Publicație
1	Alba – Gâmbaș	Alba	Multiplă (Ep. Bronzului, Avari, etc.)	10	
2	Boldești-Grădiște	Prahova	sec. 4-5	18	C
3	Călinești	Prahova	Medieval	171	
4	Capidava	Constanța	Multiplă (Ep. Bronzului, Ep. Medievală)	127	C
5	Cristian	Sibiu	Neolitic	5	A
6	Ernei	Mureș	Sec. 2-4	1	C
7	Fântânele	Bistrița-Năsăud	Sec. 6-7	10	
8	Feleac	Cluj	Medieval	25	
9	Galații Bistriței	Bistrița	Sec. 6-7	13	
10	Gheorgheni	Harghita	Medieval	28	A, C
11	Gherăseni	Buzău	Sec. 4-5	4	A
12	Histria	Constanța	Multiplă	9	A
13	Hunedoara	Hunedoara	Sec. 1 BCE- 2 CE	39	C
14	Joseni	Harghita	Medieval	11	
15	Mălăiești	Prahova	Sec. 2-3	1	C
16	Micești	Alba	Ep. Bronzului	3	A
17	Mireasa 1	Constanța	Ep. Bronzului	12	A, C
18	Mireasa 2	Constanța	Medieval	150	C
19	Nădlac 1	Arad	Sec. 6-7	2	A
20	Nădlac 2	Arad	Sec. 2-4	24	
21	Autostradă	Arad	Sec. 2-4	17	A
22	Suplacu de	Sălaj	Neolitic	1	A, C

	Barcău				
23	Toboliu	Bihor	Ep. Modernă	8	A
24	Turdaș	Hunedoara	Neolitic	2	A
25	Turda	Cluj	Sec. 6-7	2	
26	Vlaha	Cluj	Sec. 6-7	110	C
	TOTAL			803	

*C – conferință; A – articol științific.

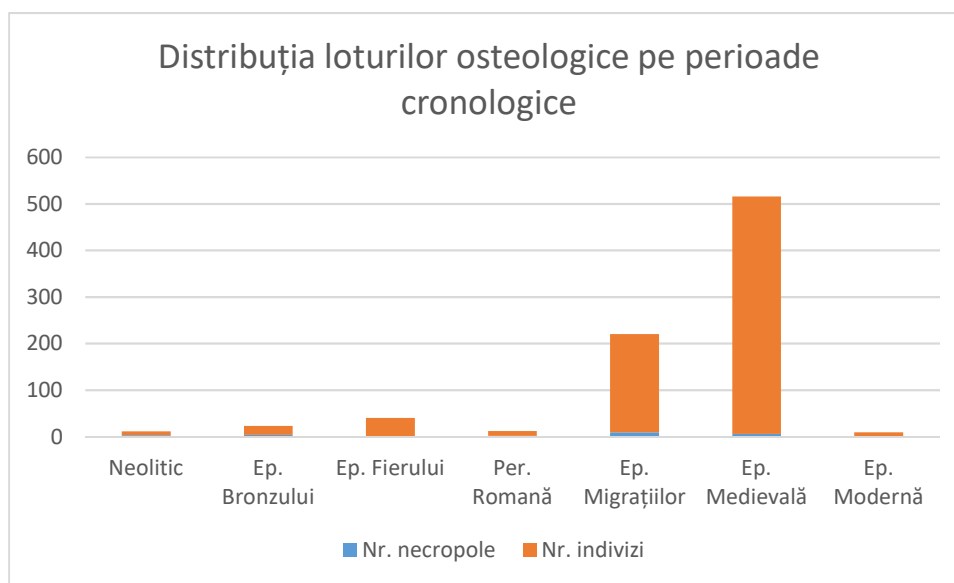


Figura 1. *Ep. Migrațiilor cuprinde și populații din Barbaricum din timpul perioadei romane. Interpretarea rezultatelor s-a axat pe trei direcții: necropole cu un număr mare de indivizi, grupurile populaționale extinse și cazurile excepționale.

2.1. Necropole cu un număr mare de indivizi (peste 100 de indivizi)

În acest grup intră materialul osteologic de la Capidava (perioada medievală, N=125), Călinești (perioada medievală, N=171), Mireasa (perioada medievală, N=150) și Vlaha (epoca migrațiilor, N=110). Datorită numărului mare de indivizi existent în fiecare necropolă, rezultatele obținute sunt mult mai reprezentative la nivel populațional.

2.2. Grupuri populaționale extinse

În majoritatea cazurilor, necropolele nu sunt investigate arheologic integral, astfel că numărul de indivizi este de multe ori redus. Cu toate acestea, unele loturi osteologice fac parte din același grup populațional cu o răspândire geografică mai largă sau sunt date în aceeași perioadă cronologică. Acest lucru ne permite atât realizarea unor comparații între sub-grupuri cât și o analiză populațională, care, ca și în cazurile necropolelor descrise mai sus, este mai reprezentativă. Dintre loturile analizate, se observă următoarele grupuri, reprezentate în special de grupuri etnice: cultura Iamnaia, Sarmati, Gepizi și perioada medievală.

Lotul osteologic de la Mireasa, județul Constanța, reprezintă un complex funerar tumular cu 15 morminte, datate în Epoca timpurie a Bronzului, care conțin 12 indivizi. Lotul osteologic este compus din 4 subadultți, 2 adolescenți și 6 adulți (5 bărbați și un adult pentru care sexul nu a putut fi determinat). Din punctul de vedere al stării de sănătate, atât la nivel osos cât și dentar grupul populațional nu prezintă leziuni patologice extinse. Distribuția hiperostozei porotice la

40% dintre indivizi coroborată cu lipsa defectelor de dezvoltare dentare sugerează că acest grup a fost afectat moderat de stres fiziologic și deficiențe nutriționale. De asemenea, lipsa cariilor este indiciu pentru o dietă săracă în carbohidrați. Acest lucru poate fi corelat cu valoarea izotopului stabil $\delta^{13}C$, -19,7‰, care ne indică o dietă compusă din plante C3. Nu în ultimul rând, s-a observat lipsa indivizilor de sex masculin în acest ansamblu funerar. Compoziția demografică a lotului osteologic de la Mireasa a fost comparată cu alte 17 situri contemporane. Din 168 de indivizi, femeile reprezintă doar 12,5% (n=21). În concluzie, studiul nostru (Radu și colab., Bioarchaeological characterization of the human remains from the Early Bronze Age barrow from Mireasa, Romania) oferă o perspectivă bioarheologică asupra acestui grup populațional, insistându-se asupra stării de sănătate (prin identificarea leziunilor patologice), dietei (prin identificarea indicatorilor de stres nutrițional) și interpretării bioculturale a unor date biologice.

Două necropole identificate pe tronsoanele în lucru ale autostrăzii Arad-Timișoara au fost încadrate pe baza culturii materiale populației sarmatice și datate în secolele 2-4 CE. În total au fost analizați 45 de indivizi. Prima necropolă (punct: autostrada Arad-Timișoara, tronson Arad-Seceani, km 23+170 - 23 +690 (siturile B0_7-B0_8), responsabil Dr. Vitalie Bârcă) cuprinde 17 morminte. Conservarea precară a materialului osteologic a limitat analiza, care s-a axat în special pe dentiție. Lotul cuprinde 14 copii și 3 adulți. Cea de-a doua necropolă (responsabil Dr. Adrian Ursuțiu) cuprinde 24 de indivizi, dintre care 8 sunt femei, 6 bărbați, 6 adulți pentru care sexul nu a putut fi determinat, și 4 subadulți.

Populația gepidică este reprezentată de materialul osteologic provenit de la Galații Bistriței, Fântânele, Vlaha și Nădlac 1. În total au fost analizați 136 de indivizi. Datele obținute vor fi prelucrate în vederea realizării primei sinteze bioarheologice pentru această populație. Mai mult, pentru necropolele cu morminte în șiruri paralele este caracteristic fenomenul deranjării secundare, cel mai probabil cu scopul jefuirii mormintelor (Opreanu, 2003). Astfel, în analiza acestor loturi s-a acordat o atenție specială morfologiei și distribuției traumelor pe schelet. Modul în care osul se rupe este influențat de nivelul de scheletizare a osului. Cu cât a trecut mai mult timp de la moartea defunctului, cu atât osul este mai demineralizat. Studiul nostru a pornit de la ipoteza că deranjarea mormintelor se realizează la puțin timp după înmormântare, probabil chiar de membri ai comunității de care aceștia aparțin. Prin aplicarea protocolului de lucru elaborat special pentru a studia această problemă, am reușit să identificăm modele diferite în modul în care oasele sunt afectate și, mai exact, perioade diferite în care deranjarea secundară are loc (în cazul unor indivizi oasele erau mai scheletizate la momentul producerii traumelor decât la alții). În continuare, acest protocol va fi aplicat pe încă o serie de loturi osteologice, urmând ca rezultatele să fie coroborate cu datele osteologice și arheologice.

Perioada medievală este larg reprezentată în cadrul materialului osteologic analizat, în special prin cele 3 mari necropole descrise mai sus. În total, au fost analizați 510 indivizi. Răspândirea necropolelor este la nivelul întregului actual teritoriu al României. Numărul mare de indivizi ne permite să investigăm frecvența și distribuția unor boli cum sunt tuberculoza, sifilisul sau infecții respiratorii, dar și a traumelor în medii diferite (urban și rural). În cazul necropolei de la Călinești, s-a observat o frecvență ridicată a fracturilor de col femural, dar și a infecțiilor de tipul sifilisului și tuberculozei. În cazul necropolei de la Capidava există două situații excepționale: o groapă comună, respectiv o distribuție largă a unui tip de traumă craniană. Groapa comună cuprinde minimum 10 indivizi (femei, adulți și copii). Studiul acestora vizează comparația cu ceilalți indivizi din necropolă pentru identificarea unor factori care să motiveze modul în care au fost înmormântați. Analizele moleculare sunt în curs de desfășurare. Cât privește trauma craniană, aceasta a fost identificată la 9 indivizi sub forma unei lovituri circulare

vindecate, realizată antemortem cu un obiect contondent, având un diametru aproximativ între 10 și 22 de cm. Din cei nouă indivizi, patru prezintă o singură lovitură, iar 5 au traume multiple (între 2 și 8/individ) (vezi tabel 2).

Tabel 2. Distribuția traumelor craniene circulare la indivizii din necropola de la Capidava.

Nr. Mormânt	Sex	Vârsta la deces	Frontal	Parietal	Occipital	Nr. traume
C50	M	24-35		√		1
C7 M3	F	44-50		√ x3		3
C96P	M	18-20	√ x 2			2
C105P	M	24-34		√ x7	√	8
C87P	F	27-34		√ x2		2
C100P	M	35-44		√ x2	√ x2	4
C91P	M	25-51.5		√		1
C106P	M	39-44		√		1
C86P	M	34.7-44		√		1

2.3. Cazuri excepționale

2.3.1. Ernei

În anul 2004, în cadrul unor săpături de salvare a fost identificat un complex arheologic datat inițial în Epoca Migrațiilor. Complexul conține patru niveluri, dintre care trei doar cu obiecte iar unul, cel mai de la suprafață, cu un schelet (Lăzărescu, Crișan, 2010). Deși scheletul a fost analizat antropologic anterior în cadrul altui laborator, analiza noastră a identificat două traume la nivelul vertebrei C4, realizate perimortem și indicatoare pentru decapitarea individului. Un fragment osos a fost datat cu radiocarbon, iar încadrarea cronologică este diferită de cea inițială, relativă, și anume 75-235 Cal AD. Astfel cercetarea acestui complex include date osteologice, paleopatologice, moleculare, biochimice și arheologice. Cazul a fost prezentat în cadrul CHNT 20. Conference on Cultural Heritage and New Technologies (2-4 noiembrie 2015, Viena, Austria). Publicarea rezultatelor este în curs. Se intenționează publicarea acestora în Journal of Archaeological Science.

2.3.2. Suplacu de Barcău

În anul 2012 a fost identificat un schelet în cadrul așezării neolitice de la Suplacu de Barcău – „Corău”, cercetată de Dr. Florin Gogâltan și Dr. Gruia Fazecaș. Datarea scheletului a oferit o dată Cal BC 4830-4710. În urma analizei am identificat o serie de caracteristici patologice rar întâlnite. Diagnosticul diferențial al leziunilor sugerează că ar putea fi vorba de un caz de Diabet de tip II. Dat fiind faptul că la momentul actual nu există cazuri publicate de diabet la populații arheologice, argumentarea diagnosticului este îngreunată. Rezultatele primare au fost publicate în Acta Musei Porolissensis XXXV, 2013. Se intenționează publicarea extinsă a rezultatelor în International Journal of Paleopathology.

2.3.3. Mălăiești

Un schelet de copil cu o vârstă la deces între 0 și 2 luni a fost descoperit în anul 2014 în cadrul termelor romane săpate la Mălăiești, jud. Prahova de Dr. Ovidiu Țentea. Cu toate că scheletul este prost păstrat, s-a putut observa prezența unei patologii la nivelul tuturor fragmentelor osoase recuperate. Mai mult, analizele de izotopi stabili au arătat valori foarte scăzute pentru $\delta^{15}N$, 7,9‰. Acest lucru este interesant deoarece sugarii prin ingerarea laptelui

matern practic urcă în lanțul trofic și astfel prezintă valori mai ridicate pentru $\delta^{15}\text{N}$. Valoarea înregistrată în cazul acestui copil sugerează în primul rând că dieta sa nu se baza pe laptele matern și că aceasta e caracterizată de un aport scăzut de proteine. Aceste informații se corelează cu datele paleopatologice. Leziunile identificate pe scheletul copilului sunt caracterizate de os patologic nou format. Pentru diagnosticul diferențial este revelatorie prezența leziunilor pe mandibulă și claviculă, acestea fiind patognomonice pentru hiperostoza corticală infantilă. În cazurile clinice, sugarii care se prezintă cu leziuni pe mandibulă adesea refuză alăptarea, ceea ce se potrivește cu valorile izotopilor stabili. Cazul a fost prezentat în cadrul 3rd International Congress. Biomedical Sciences in Archaeology (6-9 noiembrie 2014, Bordeaux, Franța). Publicarea este în curs. Se intenționează publicarea rezultatelor în *Archaeological and Anthropological Sciences*.

3. Publicarea rezultatelor

3.1. Participări la conferințe

În total, s-a participat la 13 conferințe, dintre care 6 în străinătate. Acest lucru a permis atât discutarea unor cazuri cu experți din străinătate, dar și creșterea vizibilității grupului de lucru la nivel internațional. Creșterea vizibilității grupului s-a realizat și la nivel național, lucru evidențiat de numărul mare de instituții cu care colaborăm:

- Institutul de Arheologie și Istoria Artei, Academia Română, Cluj-Napoca
- Muzeul Național de Istorie a Transilvaniei, Cluj-Napoca
- Muzeul Național de Istorie a României, București
- Muzeul Județean de Istorie și Arheologie, Ploiești
- Muzeul Țării Crișurilor, Oradea
- Muzeul Județean, Satu-Mare
- Muzeul Național al Unirii, Alba-Iulia
- Muzeul de Istorie Națională și Arheologie, Constanța
- Muzeul Național Brukenthal, Sibiu
- Muzeul Tarisznyás Márton, Gheorgheni

3.2. Articole științifice

S-au publicat 13 articole științifice. Publicarea rezultatelor s-a făcut în unele din cele mai importante reviste din țară pentru domeniul arheologiei: *Ephemeris Napocensis*, *Materiale și Cercetări Arheologice*, *Brukenthal Acta Musei*, *Analele Banatului*, *Pontica*, *Terra Sebus*, *Acta Musei Porolissensis*, *Annales Universitatis Apulensis. Series Historica*, *Journal of Ancient History and Archaeology*. Alte patru articole au fost publicate în volume aferente unor conferințe (*Archaeopress Publishing*, Oxford, United Kingdom; *JATEPress Kiado*, Szeged, Ungaria), respectiv capitole în două volume editate.

Data fiind lipsa acută de informație bioarheologică în cercetarea din România, am încercat să publicăm cât mai mult din materialul analizat, crescând astfel nivelul de date existente pentru diferite perioade cronologice sau populații. Mai mult decât atât, cu o excepție, toate publicațiile sunt în limba engleză. Acest lucru se adaugă la utilizarea unor metode aplicate în cercetarea internațională, rezultând un grad ridicat de accesibilitate a informațiilor existente în mediul academic internațional cu privire la aplicații bioarheologice pentru teritoriul României.

4. Direcții viitoare

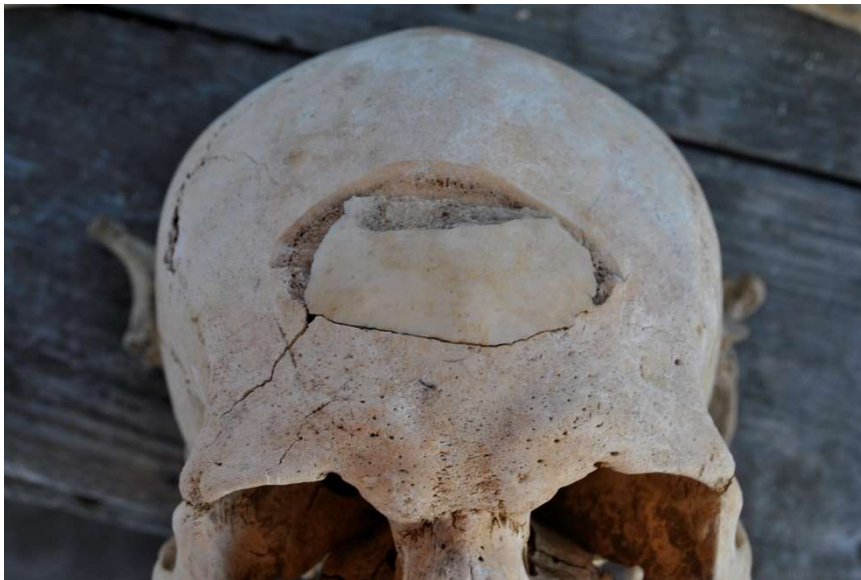
În perioada următoare se va continua publicarea rezultatelor obținute. Se vizează două direcții: publicarea cazurilor descrise la punctul 2.3., respectiv publicarea unor lucrări de sinteză. Astfel, cercetarea celor trei cazuri de la punctul 2.3. este multidisciplinară, incluzând date obținute din analiză macroscopică, microscopică, moleculară sau biochimică. Gradul de complexitate al studiului și al interpretării datelor argumentează pentru publicarea rezultatelor în reviste internaționale. În al doilea rând, se dorește publicarea datelor pentru cele trei necropole medievale (Capidava, Mireasa și Călinești) împreună cu datele arheologice.

- Acsádi, Gy., Nemeskéri, J. (1970). History of human life span and mortality. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Brothwell, D. R. (1981). *Digging up bones: The excavation, treatment, and study of human skeletal remains*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- Buikstra, J. E., Ubelaker, D. H. (eds.) (1994). *Standards For Data Collection from Human Skeletal Remains*. Arkansas Archaeological Survey Research Series No. 44.
- Coqueugniot, H., Weaver, T. D. (2007). Infracranial Maturation in the Skeletal Collection from Coimbra, Portugal: New Aging Standards for Epiphyseal Union. *American Journal of Physical Anthropology* 134: 424-437.
- Fazekas, I. Gy., Kósa, F. (1978). *Forensic Fetal Osteology*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Hassett, B. R. (2014). Missing defects? A Comparison of Microscopic and Macroscopic Approaches to Identifying Linear Enamel Hypoplasia. *American Journal of Physical Anthropology* 153: 463-472.
- Ișcan, M. Y., Loth, S.R., Wright, R.K. (1984). Metamorphosis at the Sternal Rib End: A New Method to Estimate Age at Death in White Males. *American Journal of Physical Anthropology* 65: 147-156.
- Lovejoy C. O., Meindl, R. S., Pryzbeck T. R., Mensforth R. P. (1985). Chronological Metamorphosis of the Auricular Surface of the Ilium: A New Method for the Determination of Adult Skeletal Age at Death. *American Journal of Physical Anthropology* 68: 15-28.
- Lovell, N. C. (1997). Trauma Analysis in Paleopathology. *Yearbook of Physical Anthropology* 40: 139-170.
- Meindl, R. S., Lovejoy, C. O. (1985). Ectocranial Suture Closure: A Revised Method for the Determination of Skeletal Age at Death Based on the Lateral-Anterior Sutures. *American Journal of Physical Anthropology* 68: 57-66.
- Mensforth, R. P., Lovejoy, C.O., Lallo, J.W., Armelagos, G. J. (1978). The Role of Constitutional Factors, Diet, and Infectious Disease in the Etiology of Porotic Hyperostosis and Periosteal Reactions in Prehistoric Infants and Children. *Medical Anthropology* 2: 1-59.
- Outram, A. K. (1998). The Identification and Palaeoeconomic Context of Prehistoric Bone Marrow and Grease Exploitation. PhD Thesis. Department of Archaeology, University of Durham.
- Outram, A. K., Knusel, C. J., Knight, S., Harding, A. F. (2005). Understanding complex fragmented assemblages of human and animal remains: a fully integrated approach. *Journal of Archaeological Science* 32, 1699-1710.

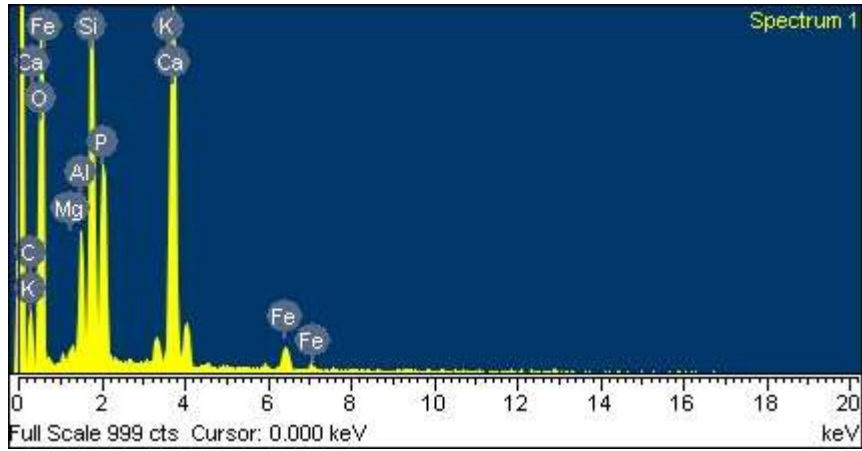
- Phenice, T. W. (1969). A newly developed visual method of sexing the os pubis. *American Journal of Physical Anthropology* 30 (2), 297-301.
- Steckel, R. H., Larsen, C. S., Sciulli, P. W., Walker, P. L. (2011). *Data Collection Codebook for the Global History of Health Project*. (http://global.sbs.ohio-state.edu/new_docs/Codebook-01-24-11-em.pdf)
- Stloukal, M., Hanáková, H. (1978). Die Länge der Längsknochen altslawischer Bevölkerung - Unter besonderer Berücksichtigung von Wachstumsfragen (The length of long bones in ancient Slavonic populations - With particular consideration to the question of growth). *Homo*, 29, p. 53-69.
- Stuart-Macadam, P. (1985). Porotic Hyperostosis: Representative of a Childhood Condition. *American Journal of Physical Anthropology* 66, 391-398.
- Todd, T. W. (1920). Age Changes in the Pubic Bone. I. The Male White Pubis. *American Journal of Physical Anthropology* 3: 285-334.
- Todd, T. W. (1921). Age Changes in the Pubic Bone. II. The Pubis of the Male Negro-White Hybrid. III. The Pubis of the White Female. IV. The Pubis of the Female Negro-White Hybrid. *American Journal of Physical Anthropology* 4: 1-70.
- Ubelaker, D. H. (1989). *Human skeletal remains: excavation, analysis, interpretation*. Taraxacum, Washington.
- Üstündag, H. (2008). Schmorl's Nodes in a Post-Medieval Skeletal Sample from Klostermarienberg, Austria. *International Journal of Osteoarchaeology* 19, 695-710.
- Villa, P., Mahieu, E. (1991). Breakage patterns of human long bones. *Journal of Human Evolution* 21, 27-48.



Traumă circulară vindecată. Capidava.



Traumă realizată perimortem. Capidava.

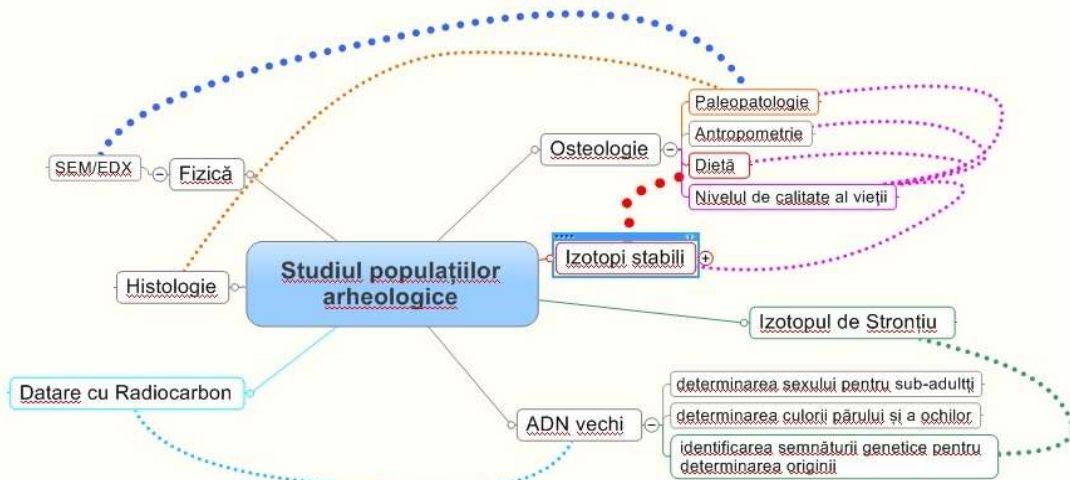
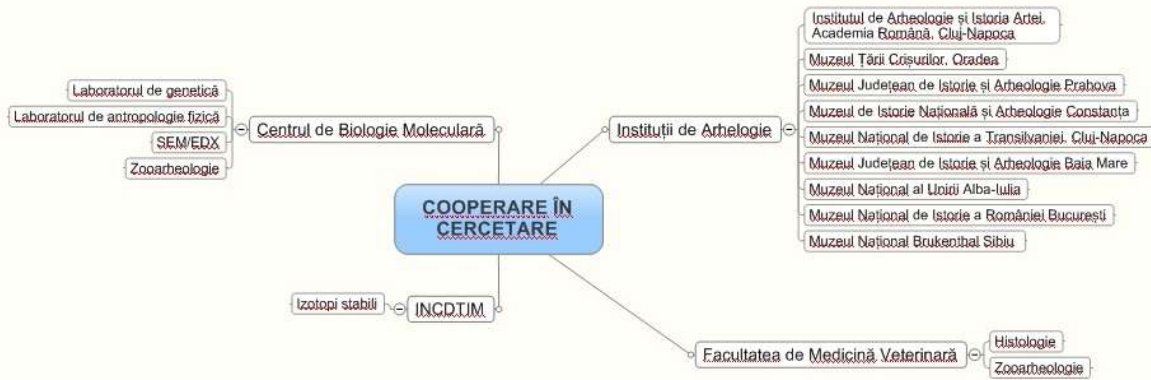


EDX pentru vertebra secționată aparținând individului de la Ernei.



Trauma la nivelul vertebrei aparținând individului de la Ernei.

Schemă a rețelei de colaborări și a procesului de lucru ideal în bioarheologie determinat pe parcursul desfășurării proiectului.



b. Antropologie moleculară:

i. Tumulul de la Mireasa și necropola medievală de la Capidava (Epoca Bronzului, perioada medievală), rezultate finale - 2016

1. Rezumat

- Efectuarea analizelor de genetica populațiilor și statistică comparativă (PCA, „Pairwise population differentiation values (FST)”, „Hierarchical agglomerative clustering”) pe baza rezultatelor moleculare privind populația medievală de la Capidava obținute în anul anterior (inclusiv datele NGS, obținute în Laboratorul de Antropologie Moleculară din Florența), în vederea evaluării relațiilor genetice dintre populații ce datează din aceeași perioadă istorică.
- Obținerea informației genetice de la nivelul regiunii de control a genomului mitocondrial pentru un grup de 9 indivizi ce datează din Epoca Bronzului, descoperiți în tumulul T-38 de la Mireasa (sit localizat în apropierea Capidavei). Aceste date permit evaluarea variației genetice a populațiilor umane în timp, în spațiul din sud-estul României furnizând explicații suplimentare cu privire la modul de formare a diversității genetice actuale. Epoca Bronzului este o perioadă istorică dinamică, de mare interes pentru lumea bioarheologiei (dar nu numai), iar contextul istoric și arheologic al populației analizate ridică ipoteze interesante, deși recuperarea secvențelor autentice de ADN din probe atât de vechi reprezintă o provocare din punct de vedere metodologic.
- Procesarea unui număr de 11 probe de proveniență arheologică în timpul stagiului de cercetare efectuat în Laboratorul de Antropologie Moleculară (Florența: 1.10.2016 - 25.11.2016). Acestea includ 6 probe ce au fost descoperite în timpul săpăturii arheologice de la Capidava, campania 2015, care sunt de mare interes, având în vedere că indivizii au fost descoperiți într-o groapă comună și prezintă diferite tipuri de traume, un tipar diferit față de cel reflectat de indivizii deja analizați. Alte 2 probe provin de la 2 indivizii din populația de la Mireasa ce au fost deja analizați în laboratorul de ADN vechi din cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe (Cluj-Napoca). Re-analiza lor este necesară pentru a confirma autenticitatea rezultatelor. Restul indivizilor datează din sec. XI-XII AD. și prezintă un interes deosebit prin prisma contextului istoric și arheologic.
- Rezultatele obținute au fost diseminate prin participarea și susținerea câte unei prezentări orale la două conferințe internaționale.

2. Stadiul actual al cunoașterii în domeniu

Peisajul genetic al populației moderne este rezultatul interacțiunilor complexe dintre fonduri locale cu dimensiuni și distribuție spațială variabilă și cele din exterior care se datorează, în principal, mișcărilor populaționale. Indicii cruciale pentru deslușirea modului în care acestea au dus la diversitatea genetică în populația contemporană se pot obține prin completarea axei temporale și spațiale cu cât mai multe informații stocate în ADN-ul specimenelor de proveniență arheologică, o dovadă directă a trecutului istoric.

Epoca Bronzului (3000-1000 î.e.n.) este o perioadă istorică dinamică, caracterizată de evenimente demografice majore, precum și de schimbări culturale și sociale care au avut o influență semnificativă asupra fondului genetic european contemporan. De-a lungul timpului a fost intens dezbătut de către arheologi dacă schimbările remarcate pe parcursul Epocii Bronzului au fost determinate de migrația populațiilor umane sau de difuzia ideilor între grupuri adiacente. Studii recente de ADN vechi aduc primele indicii ce privesc legătura dintre schimbările

culturale, mobilitate și tipare lingvistice (Allentoft și colab., 2015; Haak și colab., 2015; Mathieson și colab., 2015). Acestea pun în lumină faptul că dispersia majoră a tehnologiilor și a materialului genetic se datorează expansiunii umane atribuite culturii Yamnaya, care în Epoca Bronzului Timpuriu se regăsea în stepa Pontico-Caspică. Pe lângă ruta de migrație estică, înspre centrul Asiei, dovezile genetice indică un vestică, înspre centrul și nordul Europei, unde ia naștere cultura „Corded Ware”, ca rezultat al amestecului cu populația locală neolitică (Allentoft și colab., 2015). Aceste mișcări populaționale sunt în corespondență cu ipoteza legată de expansiunea limbii Indo-Europene (Haak și colab., 2015). Cu toate acestea, relațiile observate rămân de demonstrat pentru fiecare caz în parte, iar prin analiza moleculară a probelor din alte regiuni geografice sau intervale istorice mai recente se pot aduce informații suplimentare care să contribuie la conturarea tiparului ce a determinat diversitatea genetică actuală în Europa.

Dacă prin intermediul datelor genetice asociate Epocii Bronzului este conturată o imagine globală, dar cu rezoluție nu foarte bună, situația pentru Evul Mediu este diferită. Cercetările paleogenetice ce reflectă această perioadă istorică sunt restrânse la câteva zone geografice dispersate pe teritoriul European printre care Italia, Ungaria, Norvegia, Polonia (Alt și colab., 2015; Vai și colab., 2015; Krzewińska și colab., 2015; Juras și colab., 2014). Până în prezent, sud-estul Europei este reprezentat doar prin analiza moleculară a unor populații proto-bulgare (Nesheva și colab., 2015).

Datele genetice revelate de cele două grupuri analizate aduc dovezi noi, dintr-o regiune geografică care nu este reprezentată în literatura de specialitate. În același timp, pe baza lor se poate verifica dacă relațiile observate până în prezent se confirmă și în aceste cazuri particulare sau dacă ele reprezintă excepții. Studiile de genetica populațiilor istorice din sud-estul Europei sunt de o importanță deosebită, mai ales din pricina faptului că în acest areal, în diferite perioade istorice, au existat indivizi provenind din amestecuri populaționale și cu variate origini etnice, fiind greu de distins doar pe baza înregistrărilor arheologice.

3. Activități și metode de cercetare

Acizii nucleici din probele istorice sunt adesea slab conservați și în diverse stadii de degradare, în funcție de vechime și de condițiile de mediu, astfel încât recuperarea acestora în cantități suficiente pentru analizele ulterioare este un punct crucial. Optimizarea protocolului de extracție a ADN-ului vechi a fost realizată prin modificarea compoziției tamponului de legare („binding buffer”), creșterea volumului său în raport cu cel al tamponului de extracție și scurtarea timpului pentru digestia pulberii osoase (Dabney și colab., 2013). Acest lucru a permis analizarea variației genetice de la nivelul celor două regiuni hipervariabile ale genomului mitocondrial pentru populația de Epoca Bronzului de la Mireasa (Dobrogea). Secvențele de interes au fost obținute prin amplificarea a 8 fragmente scurte (150 pb), clonarea și secvențializarea lor (Gabriel și colab., 2001). Polimorfismul genetic a fost determinat prin alinierea secvențelor în BioEdit și încadrat în haplogroup cu ajutorul aplicației online HaploGrep2 (Weissensteiner și colab., 2016; van Oven M., 2015).

Procesarea probelor în laboratorul din Florența a presupus extracția moleculelor de ADN vechi, urmată de construirea bibliotecilor de ADN, etapă pe care o presupune protocolul de secvențializare pentru platforma Illumina (MiSeq) (Kircher și colab., 2010). Selectarea fragmentelor de interes (genomul mitocondrial uman) din amestecul ADN existent în bibliotecile obținute s-a realizat prin capturare („target capture”) (Maricic și colab., 2010), acestea fiind apoi amplificate prin PCR pentru a obține cantitatea necesară pentru secvențializare. Rezultatele secvențializării vor fi obținute la începutul anului 2017.

Secvențele de ADN vechi asociate celor două populații (Mireasa, Capidava) au fost comparate cu câte un set de peste 300, respectiv 500 de secvențe mitocondriale aparținând unor populații euro-asiatice ce datează din aceleași intervale istorice (Epoca Bronzului, respectiv Evul Mediu), colectate din literatură. În cazul populației de la Mireasa a fost efectuată analiza PCA, folosind XLSTAT, pe baza frecvențelor haplogrupurilor mitocondriale identificate în 19 populații (Fig. 2). Variația genetică a populației de la Capidava a fost comparată cu cea identificată în alte 14 populații medievale, analiza PCA fiind efectuată cu ajutorul funcției *prcomp* pentru date categorice, implementată în R 3.3.2 (R Core Team, 2014). Rezultatul a fost vizualizat într-un spațiu bi-dimensional pe baza primelor două componente principale (PC) (Fig. 3). Pe lângă PCA, în cazul acestei populații, a fost realizat și clustering-ul ierarhic, utilizând algoritmul Ward și metoda euclideană de măsurare a distanței („Ward type algorithm and Euclidean measurement method”) (Ward, 1963). Pentru clustering au fost utilizate toate componentele principale (PC), iar rezultatul a fost vizualizat ca dendrogramă prin intermediul R 3.3.2. Semnificația clusterului a fost evaluată printr-un bootstrap de 10000, folosind funcția *pvcust* în R 3.3.2, iar semnificația fiecărui cluster este dată de valoarea AU („approximately unbiased”), exprimată ca procent (Fig. 4).

Comparația între cele 15 populații medievale a fost realizată, folosind Arlequin versiunea 3.5.2.2 (Excoffier și colab., 2010). Valorile de diferențiere populațională (FST) au fost calculate pe baza secvențelor HVR-I (pozițiile nucleotidice 16050–16383), considerând modelul de substituție Tamura & Nei (Tamura și Nei., 1993) cu o valoare gamma de 0,26. Variațiile semnificative ale valorilor FST au fost testate prin 10000 de permutări între cele 15 populații medievale incluse în analiză, iar matricea valorilor FST ce a rezultat a fost vizualizată cu ajutorul R 3.3.2 (Fig. 5).

4. Rezultate

Tumulul de Epoca Bronzului de la Mireasa se remarcă printr-un context arheologic deosebit, cu unele trăsături caracteristice culturii Yamnaya. Cei 9 indivizi analizați din această populație sunt încadrați pe baza polimorfismului genetic din regiunea de control în 5 haplogrupuri distincte, 4 din ele europene, iar unul (D) asiatic. Interesant este faptul că linia maternă asiatică este asociată individului care prezintă un ritual de înmormântare mai aparte (mormânt cu bârne de lemn), spre deosebire de ceilalți membri ai comunității (Fig. 1). Prin comparația frecvențelor haplogrupurilor mitocondriale determinate în populația analizată cu cele ale altor 18 populații euroasiatice din același interval istoric, Mireasa este plasată în proximitatea a două grupuri asociate culturii Yamnaya din stepa Pontico-Caspică. Deși geografic Mireasa este localizată mai aproape de grupul Yamnaya_eEU, distanța genetică este mai mare decât în cazul Mireasa-Yamnaya_Samara/Kalmykia, așa cum rezultă din analiza PCA (Fig. 2).

În cazul a 3 indivizi din cei 6 din necropola medievală de la Capidava care au fost re-analizați prin NGS în laboratorul din Florența la finele anului 2015 am obținut rezultate pentru întreg genomul mitocondrial. În regiunea de control, fragment pentru care am obținut date prin ambele tipuri de analiză, am observat același tipar genetic pentru fiecare dintre cei trei indivizi, fapt ce confirmă autenticitatea rezultatelor inițiale, obținute în laboratorul de ADN vechi din Cluj-Napoca. În același timp, mutațiile identificate la nivelul întregului genom mitocondrial rafinează încadrarea în haplogrup, dar fără a schimba interpretările preliminare.

Analiza moleculară a celor 11 indivizi din necropola de secol X AD. de la Capidava, datare confirmată prin analize de radiocarbon, dezvăluie existența unei diversități genetice ridicate în această populație având în vedere prezența a 9 haplotipuri mitocondriale. Majoritatea liniilor materne sunt europene cu o singură excepție, N9 care este specifică sudului Asiei. În

plus, variația genetică în populația analizată este mai apropiată de cea existentă în populația Bizantină în comparație cu cea reflectată în alte populații de aceeași perioadă din diverse areale ale Europei, fapt ce reiese din analiza PCA (Fig. 3). Existența unei relații genetice strânse între aceste grupuri populaționale nu este atât de surprinzătoare dacă este luat în calcul și contextul istoric și cel arheologic al populației analizate. Contextul istoric ce privește Dobrogea secolelor X-XI AD. este unul controversat, datorită faptului că această regiune este centrul conflictelor dintre Imperiul Bizantin, Rusia Kieveană și Bulgari. Inelul cu pentagramă descoperit la unul din indivizii de la Capidava este considerat ca fiind reprezentativ pentru cultura bizantină a secolelor X-XI AD. Deși simbolul pentagramei își are originile în civilizațiile străvechi, acesta este întâlnit și în simbolistica creștină, unde semnifică cele cinci răni ale mântuitorului. De asemenea, simbolul pentagramei este asociat cu mișcarea religioasă, cunoscută sub numele de bogomilism, ce apare în Bulgaria în secolul X AD (Pinter și colab., 2011). Interesantă este legătura nu foarte strânsă a populației de la Capidava cu cea proto-bulgară, cel mai probabil nefiind surprinsă datorită numărului mic de probe analizate în ambele cazuri.

Populațiile medievale și Vikingii din nordul Europei sunt grupate împreună, în direcția primelor două componente PC1 și PC2 (variație 33,9%). Populațiile medievale din sudul Europei sunt, de asemenea, apropiat grupate, cea mai îndepărtată populație de-a lungul componente PC1 fiind cea a Cumanilor din Ungaria. Clusteringul ierarhic reflectă o diagramă similară cu cea a PCA-ului, cu excepția faptului că populația medievală din Polonia este grupată cu cea Bizantină și cu cea de la Capidava, explicația fiind faptul că în această analiză a fost luată în calcul interacțiunea dintre toate componentele principale (PC) (Fig. 4). Din calculul distanței genetice între cele 15 populații medievale reiese faptul că cea de la Capidava în raport cu restul, este semnificativ diferită ($p < 0,05$) doar față de populația medievală din Italia.

Pe lângă determinarea compoziției genetice pe baza liniilor materne în cele două populații antice de pe teritoriul actual al României și caracterizarea relațiilor lor cu alte populații ce datează din aceleași intervale istorice este necesară o comparație și cu populația modernă, iar ulterior rezultatele și interpretările vor putea fi valorificate sub forma unui articol cotate ISI.

5. Diseminarea rezultatelor

1. Lista de comunicări la conferințe și a lucrărilor publicate

- Rusu, I., Methods for mitochondrial DNA typing in ancient human populations, International Symposium “Young Researchers in BioSciences”, Cluj-Napoca, July 25-31, 2016.
- Rusu, I., Radu, C., Dobrinescu, C., Bodolică, V., Kelemen, B., The story told by Mireasa (Constanța) Bronze Age barrow – interdisciplinary approach, 22nd Annual Meeting of the EAA, Vilnius, 31st August – 4th September, 2016

2. Stagii internaționale de cercetare

- 01.10.16 – 25.11.16: Stagiul internațional de cercetare în Laboratorul de Antropologie Moleculară, din cadrul departamentului de Biologie al Universității din Florența (Italia), sub îndrumarea prof. David Carameli

6. Ilustrații

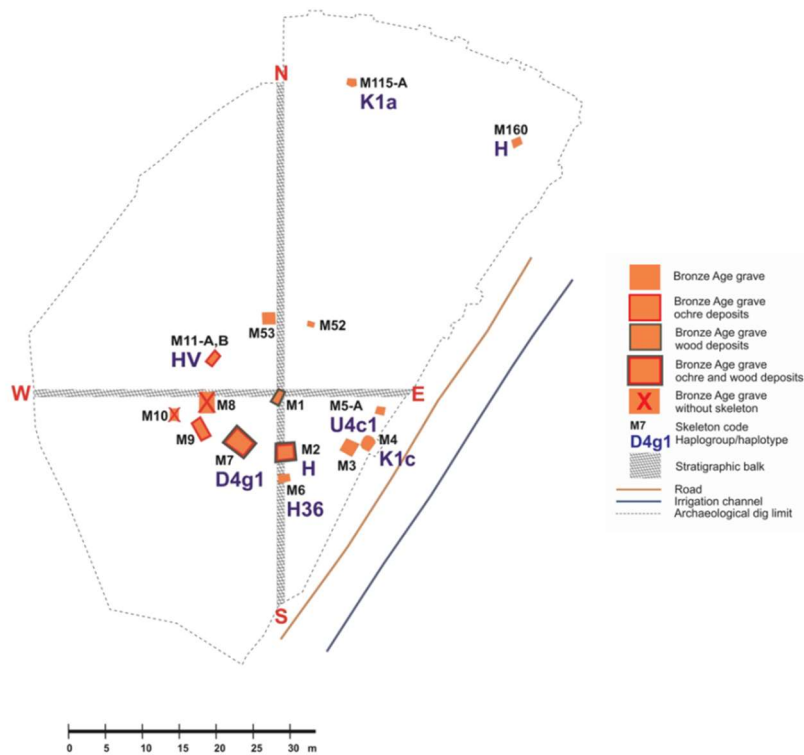


Fig. 1 Distribuția mormintelor în tumulul T-38 Mireasa, caracteristicile arheologice și haplogrupurile mitocondriale pentru indivizii analizați.

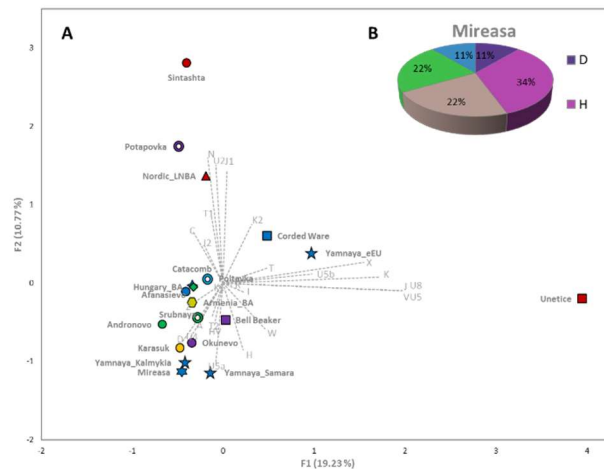


Fig. 2 Rezultatele analizelor genetice ale populației de Epoca Bronzului de la Mireasa; **A:** PCA efectuat pe baza frecvenței haplogrupurilor mitocondriale a 19 populații de EB; **B:** Frecvența haplogrupurilor mitocondriale în populația de la Mireasa.

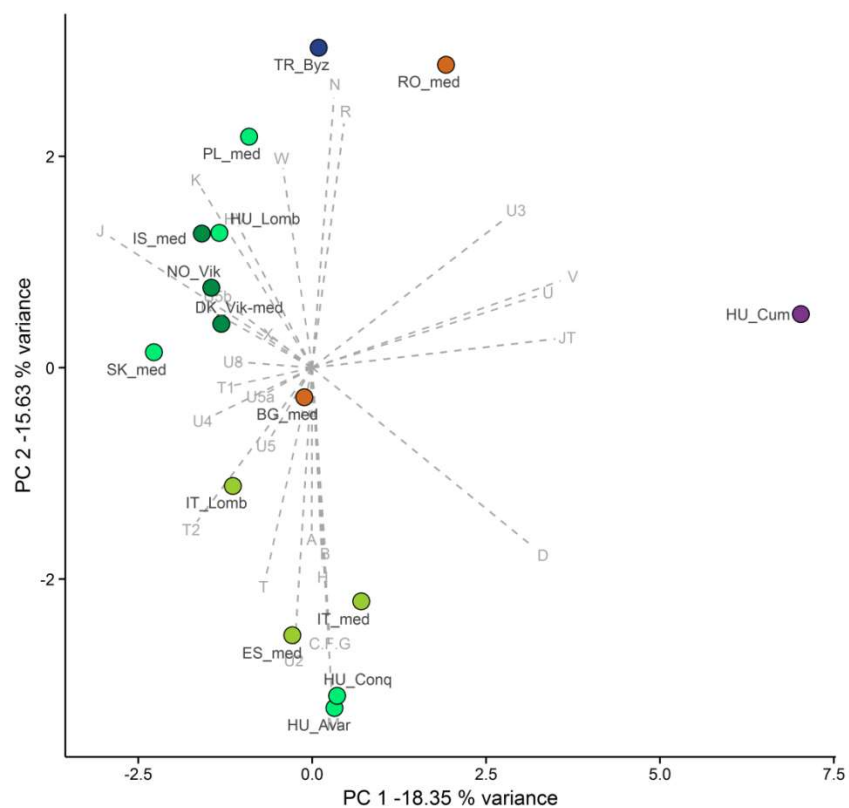


Fig. 3 Analiza PCA efectuată pe baza frecvenței haplogrupurilor mitocondriale a 15 populații medievale.

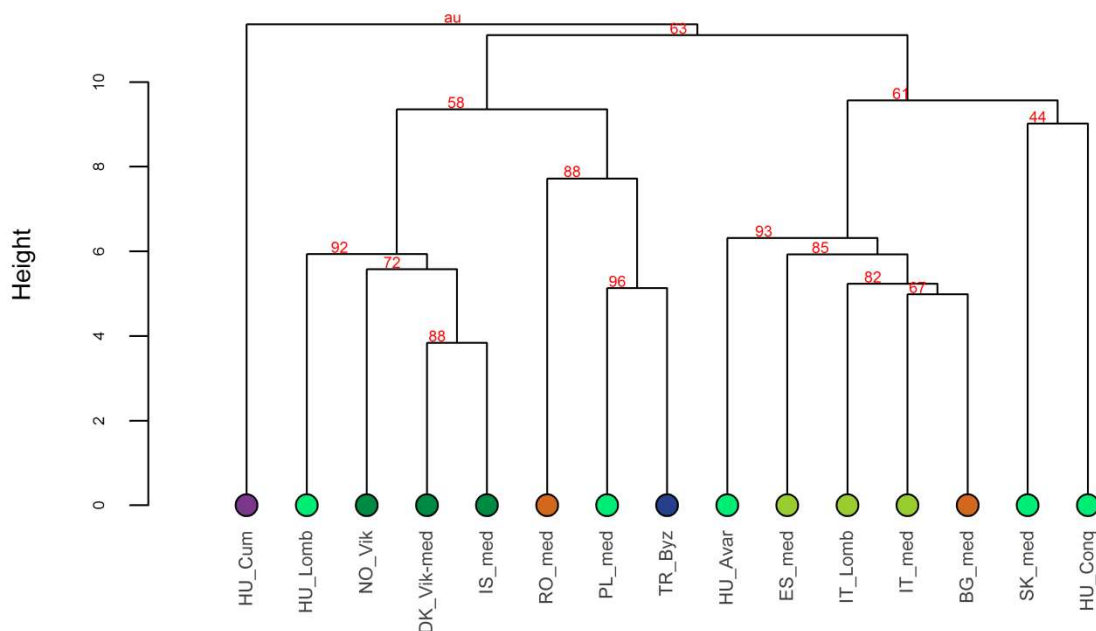


Fig 4. Clustering ierarhic al variațiilor genetice în cele 15 populații medievale.

Matrix of pairwise F_{ST}

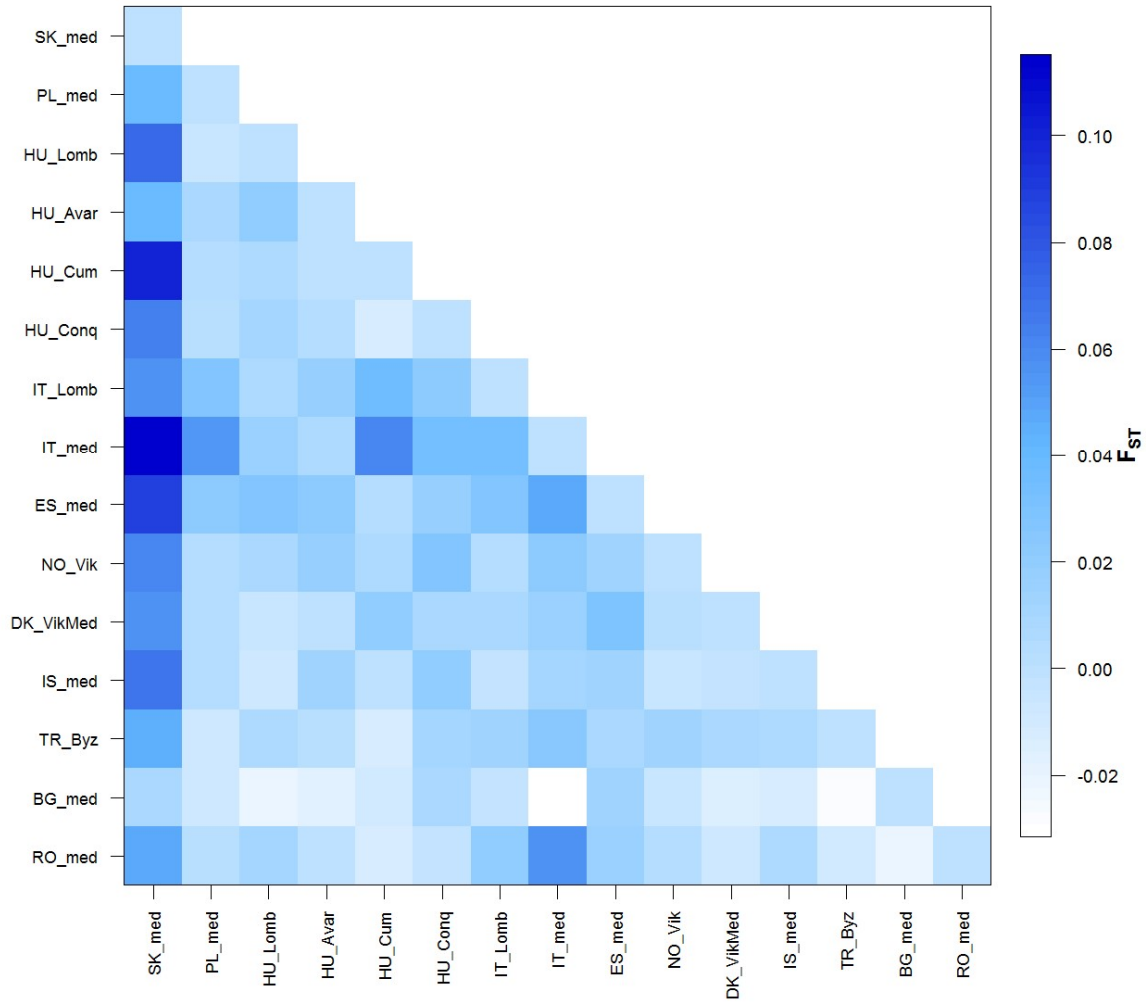


Fig. 5 Matricea valorilor de diferențiere populațională (F_{ST}) între 15 populații medievale.

ii. Tartru dentar (perioada medievală) - 2016

Tartrul, asociat rămășițelor arheologice, reprezintă de fapt placa bacteriană calcifiată, având capacitatea de a conserva pe perioade îndelungate microorganisme prezente la un moment dat în cavitatea bucală a unui individ. Pe lângă comunitatea microbiană în sine, pot fi înglobate în tartru celule de origine animală sau vegetală care au constituit la un moment dat sursa de hrană a acestuia.

Pentru domeniul arheologiei și antropologiei, analiza tartrului dentar poate oferi o serie de informații legate de modul de viață al indivizilor, dieta și starea de sănătate. Totodată diferite comunități microbiene caracteristice microbiomului oral cuprind în structura lor pe lângă speciile comune și semnături unice, putând fi astfel urmărite în spațiu și timp în populațiile umane. Microorganismele orale se transmit orizontal între membrii familiei, devenind potențiale surse în determinarea structurii populaționale și a răspândirii potențialelor boli.

Probe

- C58_2, C111, C132 din necropola medievală timpurie de la Capidava, jud. Constanța (sec X).
- M14 din necropola premodernă de la Călinești, jud. Prahova (sec XVI-XIX).

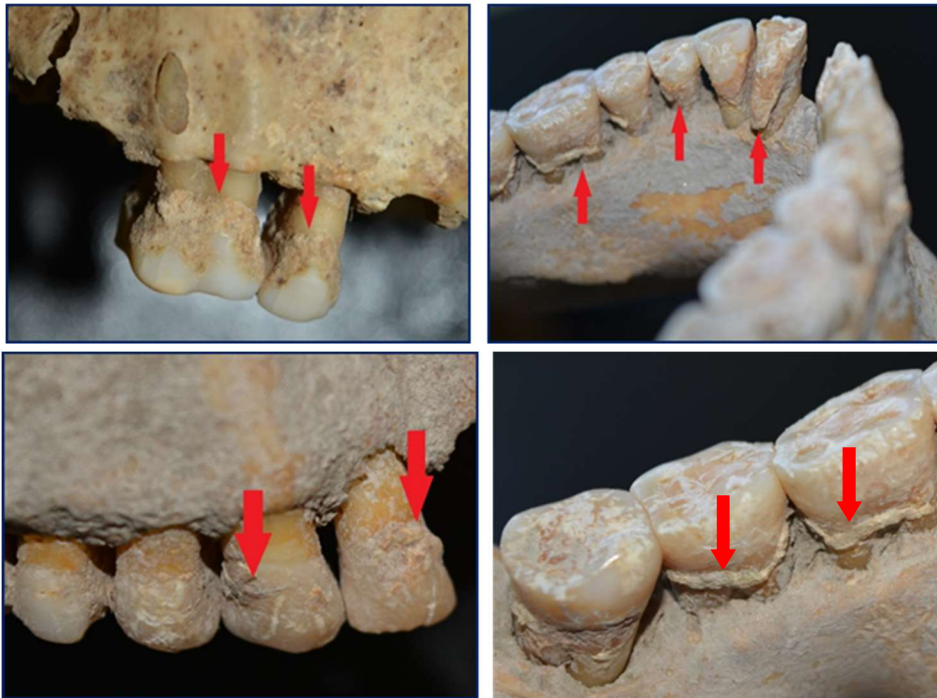


Fig 1. Probe de tartru (marcate prin săgeți): A. C58_2, B. C111, C132, D. M14.

Tabel 1. Rezultatele analizei antropologice pentru indivizii C58_2, C111, C132 și M14. Rezultatele analizei antropolgice oferă detalii legate de severitatea afecțiunilor dentare ale indivizilor. Numărul dinților cariați este mic, iar scorurile atribuite tartrului dentar, peridontitei și hipoplaziei relevă schimbări patologice ușoare și moderate (Buikstra și Ubelaker., 1994).

Probă	Vârstă	Sex	Analiza antropologică							
			Dinți permanenți	Carii dentare	Tartru dentar		Periodontită		Hipoplazie	
					Mandibulă	Maxilar	Mandibulă	Maxilar	Mandibulă	Maxilar
C58_2	24-34	M	30	0	3	2	3	2	1	1
C111	20-34	F	27	1	3	2	1	3	2	1
C132	26-34	M	24	1	2	3	2	2	1	1
M14	26-34		20	2	3	3	2	2	1	1

SEM

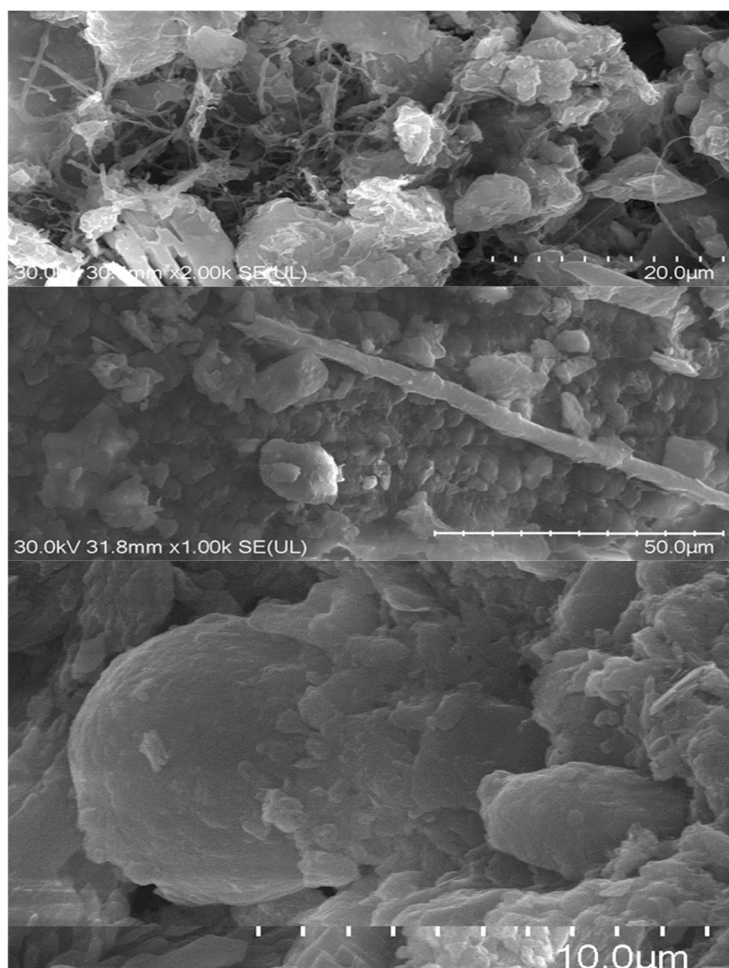


Fig 2. Imaginile de microscopie electronică de baleiaj. A. Celule filamentoase de fungi/bacterii din proba de tartru a individului C58_2. B. Potențială fibră vegetală din proba de tartru a individului C58_2. C. Potențială celulă bacteriană din probă de tartru a individului C111.

Analiza moleculară

Extracție ADN

Protocolul de extracție utilizat pentru recuperarea moleculelor de ADN din probele de tartru este o adaptare a celui propus de Dabney și colab., 2013. Cantitatea de ADN vechi extrasă din tartru este mare, (Warinner, Speller, and Collins 2015), la fel ca și riscul de contaminare. Bacteriile și fungii sunt organisme ubiquitare, speciile moderne venind în contact cu probele arheologice încă din solul în care se păstrează. Analizele moleculare au fost efectuate într-un laborator conceput pentru studiul ADN-ului vechi (localizat la Institutul de Cercetări în Bio-Nano-Științe din Cluj-Napoca).

qPCR

Pentru cuantificarea moleculelor de fungi, bacterii și plante au fost folosite amorsele BITS și B58S3, V6_926F și V6_1046R, respectiv Z1aF și 19bR menționate în Tabelul 2. Pentru curba standard s-a folosit un plasmid pJET1.2 conținând fragmentul de interes care a fost secvențializat în prealabil. Amplificările au avut loc în Rotor-Gene® Q (QIAGEN, Hilden, Germany) utilizând SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit (Bioline). Reacțiile s-au desfășurat într-un volum final de 20 μl, conținând SensiFAST SYBR No-ROX Mix 1×, 0,5 mM din fiecare amorsă, 1,5 μl ADN și 6,5 μl H₂O. A fost utilizat un program de PCR în trei pași: 95°-3' (95°-10", 56°-15", 72°-15") × 40. Au fost utilizate triplicate pentru fiecare probă cât și controale negative.

Tabel 2. Amorsele utilizate în reacțiile de amplificare

Nume amorsă	Secvență amorsă (5'-3')	Gena țintită
V1F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	16S rRNA
V1 120R	TTACTCACCCGTCGCCRCT	16S rRNA
V6 926F	AAACTYAAAKGAATTGACGGG	16S rRNA
V6 1046R	CGACARCCATGCASCACCT	16S rRNA
A49325	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	<i>trnL</i>
B49466	CCA TTG AGT CTC TGC ACC TAT C	<i>trnL</i>
Z1aF	ATGTCACCACCAACAGAGACTAAAGC	<i>rbcL</i>
19bR	CTTCTTCAGGTGGAAGCTCCAG	<i>rbcL</i>
BITS	ACC TGC GGA RGG ATC A	SSU
B58S3	GAG ATC CRT TGY TRA AAG TT	SSU

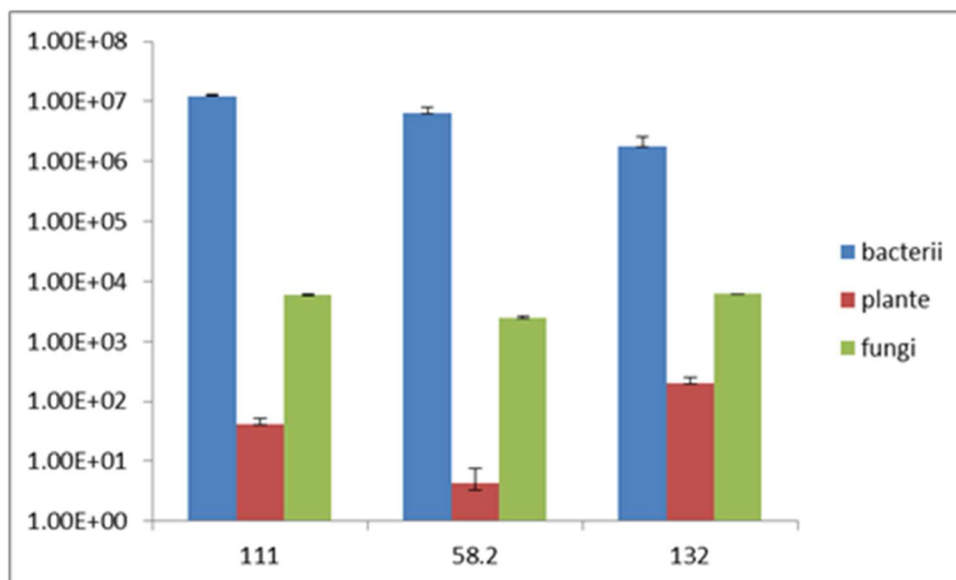


Fig 3. Rezultate qPCR pentru indivizii C58_2, C111, C132. Cuantificarea absolută a numărului de copii de gene pentru 16S ribozomal pentru estimarea numărului de celule bacteriene, a numărului de copii de gene pentru subunitatea mare a RuBisCO pentru estimarea numărului de celule de plante și a numărului de copii de gene pentru SSU pentru estimarea numărului de celule fungice. Valorile au fost raportate la 1 mg de probă.

PCR

Pentru fiecare set de amorse, amplificarea s-a realizat într-un volum final de 25 μ l, amestecurile conținând următoarele componente: 1 \times MangoTaq Colored Reaction Buffer (Bioline), 2,5 mM MgCl₂ (Bioline), 0,2 mM dNTP (Bioline), 0,5 mM din fiecare amorsă (Macrogen Sequencing Service, Korea), 1,25 U MangoTaq (Bioline) și 2 μ l ADN. Pentru fiecare set de amorse a fost introdus un control negativ. Pentru amplificare au fost folosite următoarele variații termice pe parcursul a 35 de cicluri: 95°C pentru 5 min, 95°C pentru 30 sec, 56°C pentru 30 sec și 72°C pentru 30 sec, 72°C pentru 5min, 4°C ∞ . Reacția de amplificare a generat fragmente de ADN de dimensiuni așteptate care au fost clonate și ulterior trimise la secvențat (Macrogen Sequencing Service, Korea). Au fost analizate câte 16 clone pentru fiecare din markerii moleculari utilizați.

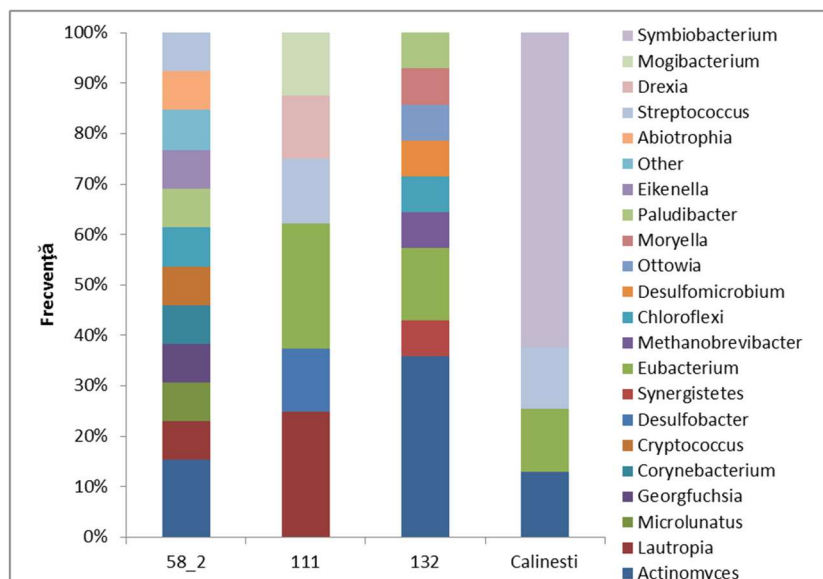


Fig 4. Abundența relativă a genurilor dominante de bacterii din probele de tartru analizate. Au fost identificate 22 de genuri de bacterii frecvent corelate în literatură cu microbiomul uman oral. Cea mai mare variabilitate a fost întâlnită în cadrul probei C 58_2 de la Capidava, iar cea mai scăzută în cadrul probei de la Călinești. O serie de genuri precum: *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Eubacterium* au fost asociați cu periodontita, putând fi astfel explicate scorurile artibuite în urma analizei antropologice.

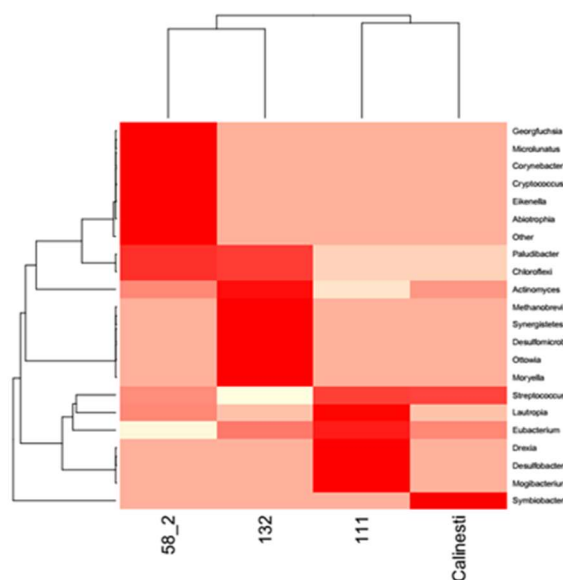


Fig 5. "Heatmap" realizat pe baza indicelui de similaritate Bray-Curtis obținut pe baza abundenței relative a celor 22 de genuri identificate. Se observă o similaritate mai mare între comunitățile microbiene orale asociate indivizilor C58_2 și C132 spre deosebire de indivizii C111și M14.

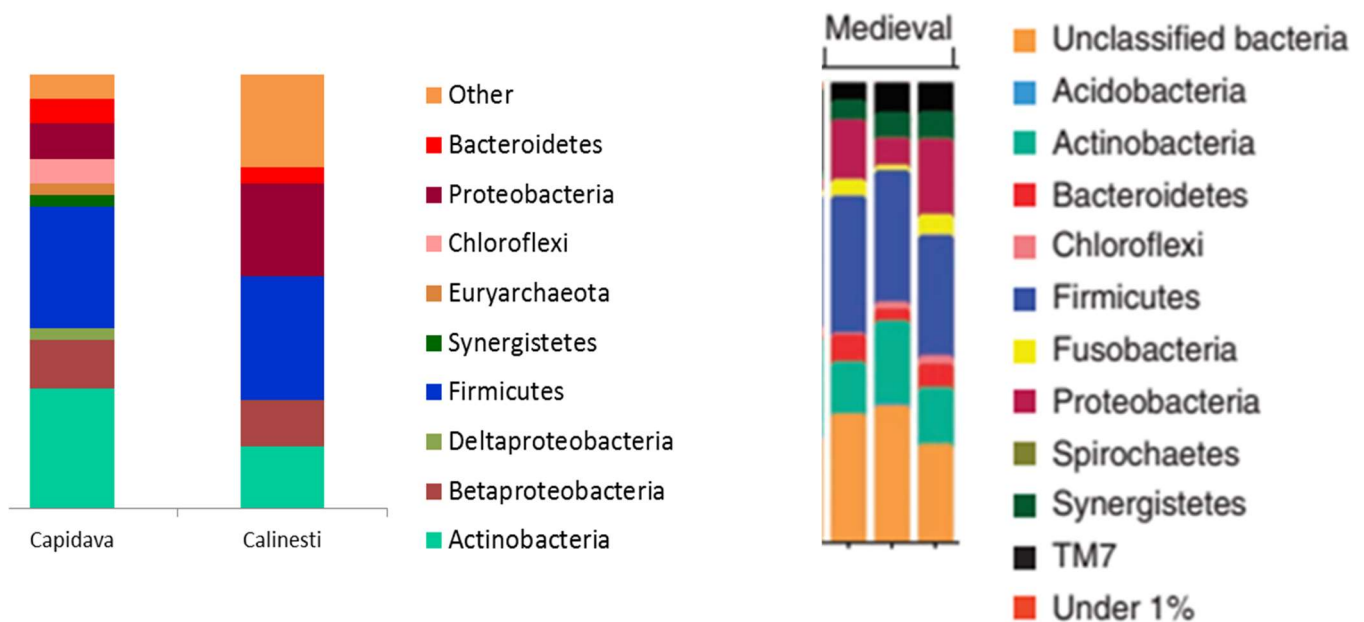


Fig 5. Comparație între comunitățile bacteriene orale identificate în cadrul necropolei de la Capidava, respectiv Călinești și 3 necropole medievale localizate în vestul Europei (Yorkshire, York, Northamptonshire). Filumuri comune comunităților bacteriene orale ca: *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Synergistetes*, *Euryarchaeota*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* au fost semnalate în toate necropolele menționate mai sus (Adler și colab., 2013). Filumurile prezente sunt comparabile cu cele întâlnite la populația modernă, fiind cantitativ mai puțin reprezentate cele potențial cariogene (*Proteobacteria*, *Acidobacteria*) care încep să predomină în microbiomul oral uman după revoluția industrială.

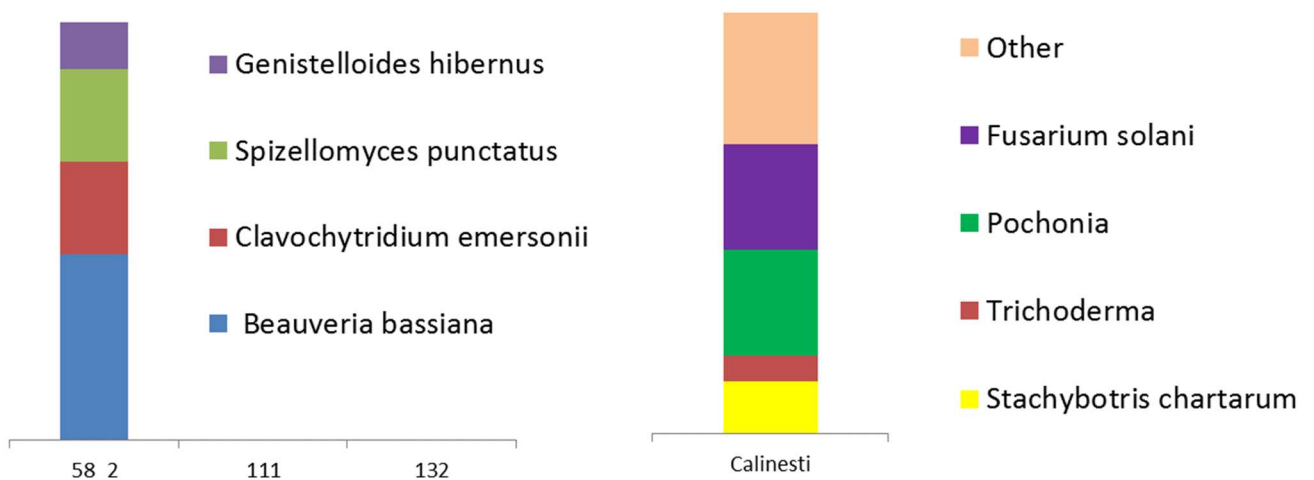


Fig 6. Comparație între comunitățile fungice identificate în cadrul probelor de tartru asociate indivizilor necropolei de la Capidava, respectiv Călinești. Pentru Capidava, au fost amplificate cu succes fragmente doar pentru individul C58_2, deși un număr similar de celule fungice disponibile reacției de amplificare au fost semnalate și pentru ceilalți indivizi ai necropolei în

urma qPCR-ului. Spre deosebire de speciile de bacterii, fungii identificați au provenit în exclusivitate din sol, fiind specii implicate în descompunerea resturilor de natură celulozică prezente în sol: *Spizellomyces punctatus*, *Genistelloides hibernus*, *Clavochytridium emersonii*, *Beauveria bassiana*. Prezența exclusivă a speciilor din sol poate fi explicată, fie prin numărul mic de secvențe analizate, fie prin lipsa patogenilor de natură fungică în microbiomele orale studiate.

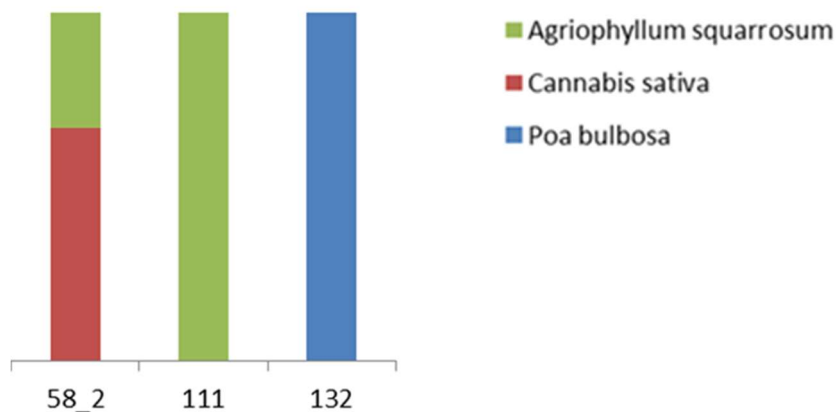


Fig 7. Comparație între speciile de plante identificate în probele de tartru ale indivizilor de la Capidava. Pentru individul C132 specia *Poa bulbosa*, ubicvitară în flora actuală a Dobrogei, este cel mai probabil contaminantă, nefiind nici o specie comestibilă. Pe de altă parte, *Agriophyllum squarrosum* este o specie care nu se găsește în flora actuală a Dobrogei. Specia este caracteristică dunelor de nisip din centrul Asiei, fiind cunoscută sub denumirea de orez de nisip. Semințele se consumă având valori nutriționale ridicate 23 % proteine, 9 % lipide, 45 % carbohidrați. Prezența ei ca sursă de hrană pentru necropola medievală timpurie de la Capidava, fiind pluzibilă. *Cannabis sativa* este o specie cu o utilizare vastă de-a lungul timpului, fibrele sau semințele fiind întrebuințate în scop recreațional sau medicinal.

iii. Diagnostic molecular malarie (perioada premodernă) - 2016

Proteine pentru teste de malarie

Protocolul de extracție a proteinei totale din pulpă dentară se bazează o variantă modificată a unui protocol descris de Tran și colab. (2011).

Pulberea obținută prin burghierea pulpei dentare a fost decalcificată peste noapte într-o soluție de 0,5 M EDTA, pH 8, cu agitare permanentă. Probele au fost apoi sonicate pentru a facilita desprinderea proteinelor de hidroxilapatită. După sonicare, probele au fost centrifugate timp de 20 min la $12000 \times g$. Supernatantul a fost filtrat folosind filtre Centricon 30K conform instrucțiunilor de utilizare. Filtrul Centricon a fost spălat de 3 ori cu TBS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 8), și o dată cu apă ultrapură. 50-100 μ l soluție proteică recuperată din filtrul Centricon s-au diluat până la un volum final de 500 μ l. Pentru precipitarea proteinelor din această soluție s-a folosit TCA (acid tricloracetic) în concentrație finală de 20%. Pelletul obținut după precipitare a fost spălat cu acetonă și resuspendat în 100 μ l TBS. Concentrația proteinelor obținute a fost determinată prin măsurarea spectrofotometrică a absorbanței de 280 nm.

Proteinele obținute au fost folosite pentru diagnosticul rapid al malariei cu ajutorul testelor SeeNow Malaria Casette (CampMedica).

Au fost aplicate aceste teste pentru 23 de indivizi din necropola pre-modernă de la Mireasa, jud. Constanța. Pentru fiecare individ au fost făcute minim 3 repetiții ale testului rapid. Mormintele din care provin probele folosite au fost alese aleatoriu, de pe toată suprafața necropolei. Pozițiile acestor sunt marcate pe planul general.



Plan general T38.

Pentru 10 (M40, M47, M54, M62, M69, M72, M88, M95, M96, M144) din cei 23 de indivizi au fost obținute teste pozitive pentru *Plasmodium falciparum*. Pentru restul de 13 indivizi (M43, M44, M49, M56, M71, M77, M92, M97, M112, M118, M131, M134, M152) au fost obținute rezultate negative la toate repetările testelor rapide.



Exemplu: Mireasa M88, pozitiv

Din cei 23 de indivizi studiați 6 sunt pre-adulți (M44 -, M62 +, M77 -, M118 -, M134 - și M144 +), restul de 17 sunt adulți (M40 +, M43 -, M47 +, M49 -, M54 +, M56 -, M69 +, M71 -, M72 +, M88 +, M92 -, M95 +, M96 +, M97 -, M112 -, M131 -, M152 -). Nu se observă un pattern al rezultatelor pozitive care să fie corelat cu vârsta la momentul morții.

ADN - Confirmarea diagnosticului

Pentru confirmarea diagnosticului stabilit cu ajutorul testelor rapide ne-am propus amplificarea unui fragment de 196pb din gena AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) specific genului *Plasmodium*. Această abordare a mai fost folosită cu succes și este descrisă de Hawass și colab. (2010) și Lalremruata și colab. (2013).

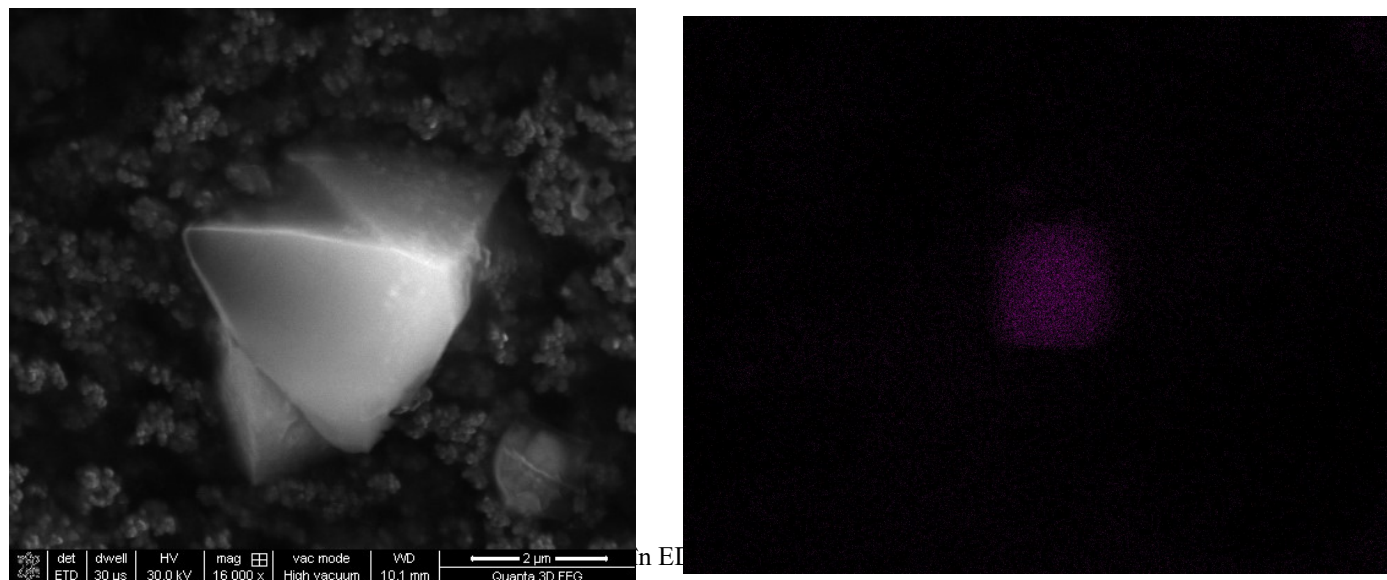
ADN a fost obținut din pulpa dentară folosind protocolul descris de Dabney și colab. (2013) pentru 12 indivizi din necropola Mireasa pentru care au fost făcute și teste de diagnostic rapid: M40, M42, M44, M47, M49, M54, M69, M71, M77, M88, M112, M118.

Am obținut amplificarea unor fragmente de dimensiuni așteptate pentru 4 din aceștii indivizi (M40, M43, M47 și M69). Producții de PCR obținuți au fost clonați și secvențializați (Macrogen). Secvențele obținute indică o contaminare cu microorganisme din sol.

Hemozoină

Hemozoina este produsă de organismele din genul *Plasmodium* pentru a evita efectele toxice ale hemului provenit din digestia hemoglobinei. Natura insolubilă a acestui compus și proprietățile sale specifice sugerează că acest marker ar putea fi folosit și pentru diagnosticul malariei în context arheologic. Depunerile de hemozoină din cavitatea măduvei osoase ale oaselor lungi poate fi un criteriu suplimentar de diagnostic al malariei în cazul rămășițelor umane scheletizate.

Am folosit microscopia electronică SEM pentru a detecta și vizualiza cristalele de hemozină din interiorul cavității măduvei osoase pentru indivizii M40 și M43. Compoziția cristalelor a fost studiată prin EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy).



Având în vedere faptul că hemozoina conține exclusiv hem, elementul distinctiv care permite identificarea cristalelor de hemozină este fierul. Se poate observa în imaginile obținute că distribuția fierului corespunde poziției cristalului.

- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.-T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., Garcia, N., Paabo, S., Arsuaga, J.L., 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), 15758–15763. doi:10.1073/pnas.1314445110
- Hawass, Z., Gad, Y., Ismail, S., Khairat, R., Fathalla, D., Hasan, N., Ahmed, A., Elleithy, H., Ball, M., Gaballah, F., Wasef, S., Fatewen, M., Amer, H., Gostner, P., Selim, A., Zink, A., Pusch, C. M. (2010). Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. *JAMA*, 303(7), 638–647.
- Lalremruata, A., Ball, M., Bianucci, R., Welte, B., Nerlich, A. G., Kun, J. F. J., & 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), 9–12. doi:10.1371/journal.pone.0060307

Bioarheologie: identificarea unor resturi arheologice vegetale (cereale)

Resturi vegetale (cereale) carbonizate

Resturile vegetale descoperite în siturile arheologice prezintă o importanță crescută pentru comunitatea arheologică oferind informații legate de sursele de hrană și tipul de agricultură practicat. De cele mai multe ori, resturile vegetale suferă un proces de combustie, fiind în mare parte carbonizate. Fiind carbonizate, nu pot servi ca o bună sursă de ADN, încercările de identificare a speciilor bazându-se de cele mai multe ori pe criterii morfologice și nu moleculare. Pentru ca resturile vegetale să își păstreze forma, temperatura de combustie trebuie să fie relativ joasă. Arderea împiedică procesul de degradare stopând accesul microorganismelor la sursa de substanță organică

Probe

- Resturi vegetale carbonizate asociate unei amfore de tip Carthage LR II pastrată fragmentar în situl arheologic de la Capidava.

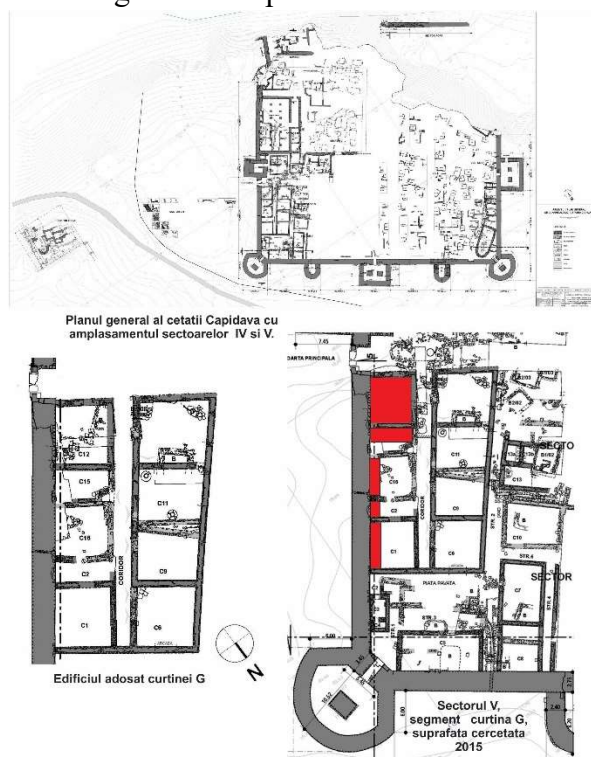
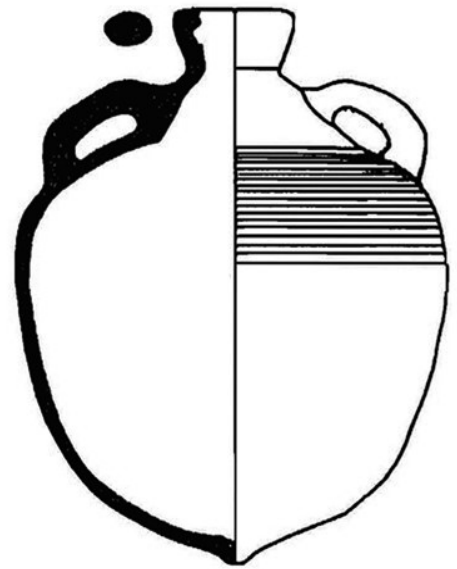


Fig 1. Planul general al cetății Capidava. Localizarea amforei de tip Carthage LR II cu resturi vegetale carbonizate în sectorul C12, marcat cu roșu.



**LR 2 Amphora type
reconstruction**

Fig 2. Amforă de tip tip Carthage LR II, utilizată cu precădere pentru transportul vinului, însă o întrebuințare multiplă nu poate fi exclusă.



Fig 3. Resturi vegetale carbonizate.

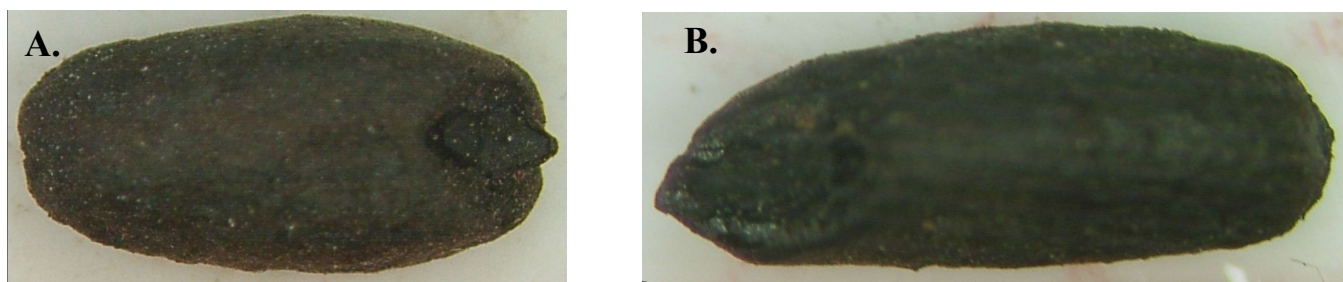


Fig 4. Resturi vegetale carbonizate. Cariopsele analizate au fost împărțite în două categorii, redate prin imaginile A. și B. pe baza caracteristicilor morfologice. Cu 1 au fost notate cariopsele asemănătoare celei din imaginea B., iar cu 2 cele asemănătoare celei din imaginea A.

Analiza moleculară

Extracție ADN

Pentru extracția de ADN s-au utilizat câte 6 cariopse din fiecare categorie mai sus menționată și kitul Animal and Fungi DNA Preparation Kit[®] (Jena Bioscience), în conformitate cu indicațiile producătorului.

PCR

Utilizând amorsele Uni-MinibarF1 și Uni-MinibarR1 au fost identificate trei genuri de bacterii: *Rothia*, *Olsenella* și *Lachnobacterium*. Genurile menționate nu sunt frecvente în sol, dar sunt asociate cu procese fermentative, putând determina procesul de combustie care să determine carbonizarea resturilor de cereale analizate.

Tabel 1. Amorse utilizate în reacția de amplificare

Nume amorsă	Secevență amorsă (5'-3')	Gena țintă
Uni-MinibarF1	TCCACTAATCACAARGATATTGGTAC	<i>COI</i>
Uni-MinibarR1	GAAAATCATAATGAAGGCATGAGC	<i>COI</i>
Z1aF	ATGTCACCACCAACAGAGACTAAAGC	<i>rbcL</i>
19bR	CTTCTTCAGGTGGAAGTCCAG	<i>rbcL</i>

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130													
2gz 1 pJET1	C	T	T	C	T	C	A	G	G	T	G	G	A	A	C	T	C	C	A	A	C	C	C	T	G	C
2gz 5 pJET1	T	T
2gz 6 pJET1
2gz 8 pJET1
2gz 9 pJET1
2gz 11 pJET1

Utilizând secvențele obținute pentru interogarea bazelor de date de nucleotide din cadrul serviciului BLAST-NCBI s-a obținut încadrarea lor în tribul *Triticeae*.

c. Analize conexe

Procese diagenetice

- termen utilizat inițial în geologie
- W. von Gümbel, Geologie von Bayern, 2 vol., 1884-1894.
- J. Walther, Eileitung in die Geologie als historische Wissenschaft, 1893-1894.
- preluat în paleontologie, antropologie și arheologie
- Doar într-o singură bază de date (<http://www.sciencedirect.com>) peste 1200 de lucrări ce analizează probe arheologice, apărute în ultimii 10 ani
 - Atacul microbial
 - Scăderea cantității de collagen
 - Creșterea gradului de cristalinitate
 - Pierderea de masă și creșterea porozității
 - Absorbția sărurilor (UO_2^{2+} , Sr^{2+})

Procesele diagenetice și condiții de mediu

- Condițiile climatice
- Hidrologia
- Compoziția geochimică $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
 - Determinarea compoziției chimice
 - Analiza compoziției mineralogice
 - Investigarea transformărilor structurale

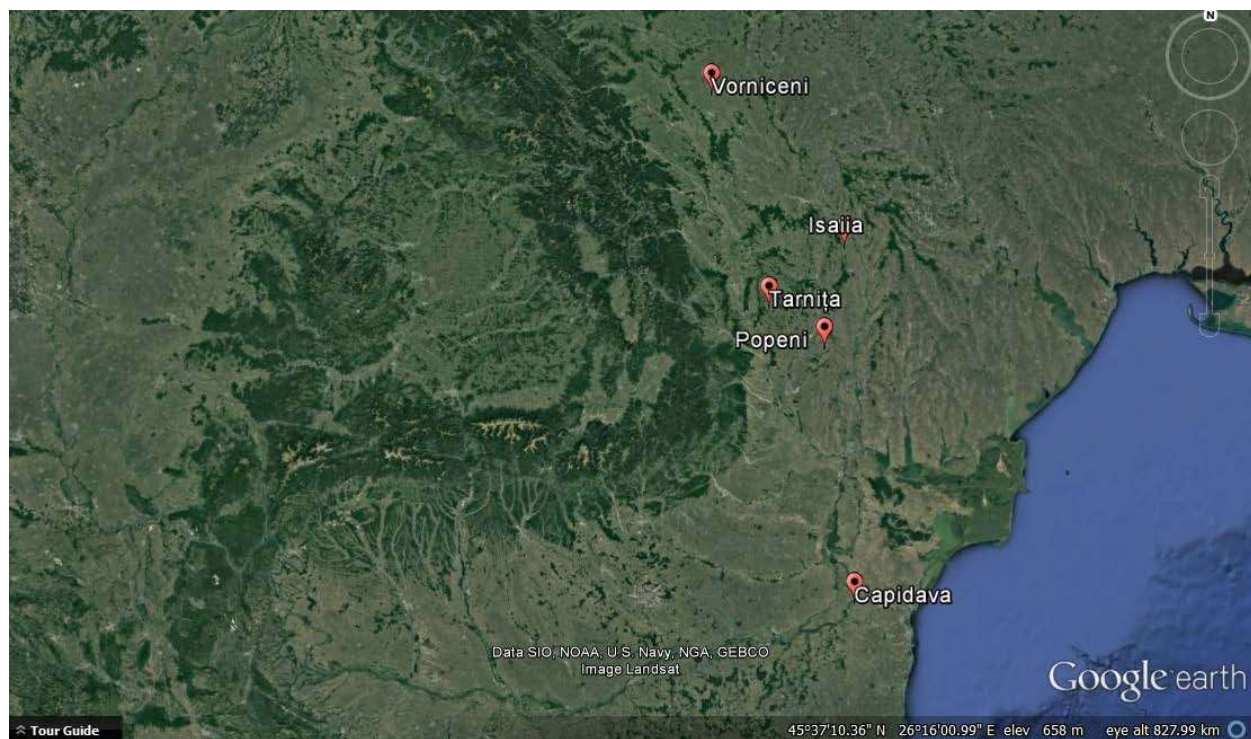


Fig. 1. Localizarea siturilor din care au fost prelevate și analizate fizic probe osteoarheologice umane.

Tab. 1 Detalii despre probele osteoarheologice umane investigate prin metode fizice

Nr. Crt	Denumire sit	Context arheologic	Cod	Cronologie
Compoziția chimică				
1				300
2				500
3				150
4				
5				
6				
7				
8				III
9				
10	Constanța Capidava, jud. Constanța		M3	
11	Constanța Capidava, jud. Constanța		M4	

Fig. 2 Rezultatele analizei elementale de suprafață pentru probele osteoarheologice umane de la Vorniceni (S22)

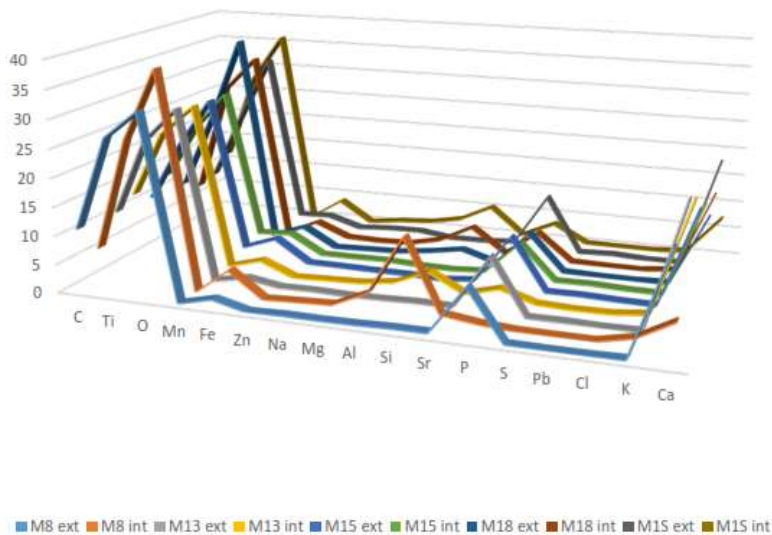


Fig. 3 Rezultatele analizei elementale de suprafață pentru probele osteoarheologice umane de la Isaiia (M8, M13, M15, M18) și Vorniceni (M1S)

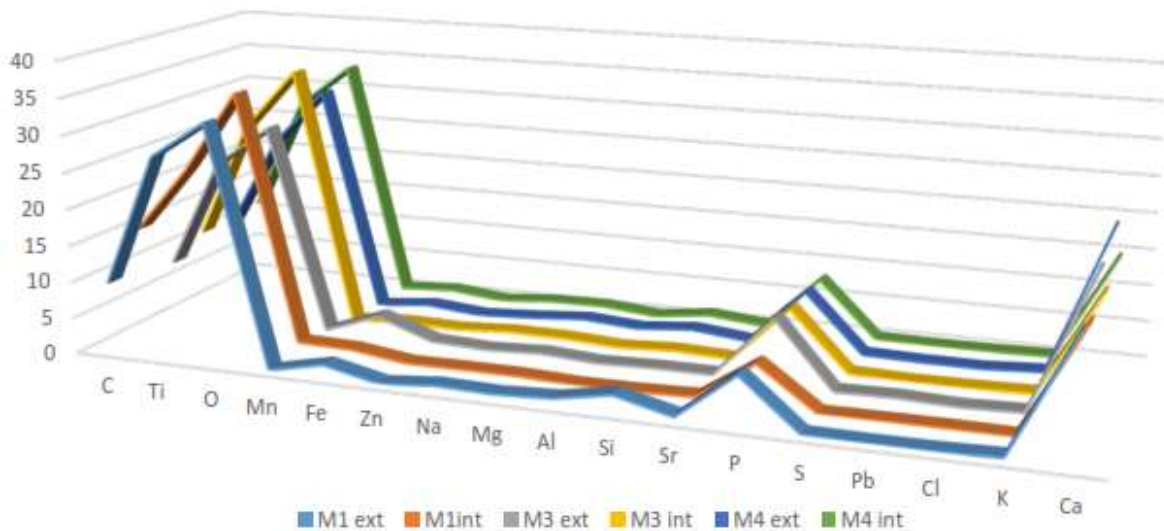


Fig. 4 Rezultatele analizei elementale de suprafață pentru probele osteoarheologice umane de la Capidava (M1, M3, M4)

Analizele fizice și chimice pot avea ca subiect atât resturile organice, cât și inventarul material. În cazul resturilor organice se pot stabili conexiuni cauzale între compoziția fizico-chimică și analiza biologică/antropologică (conservare, cauze ale degradării, momentul de debut al proceselor degradative: - *perimortem*, *postmortem*, în depozit etc.)

Pentru inventarul material (ceramică/ metal) pot fi investigate procesele de construcție, sursele de material, gradul de conservare etc.

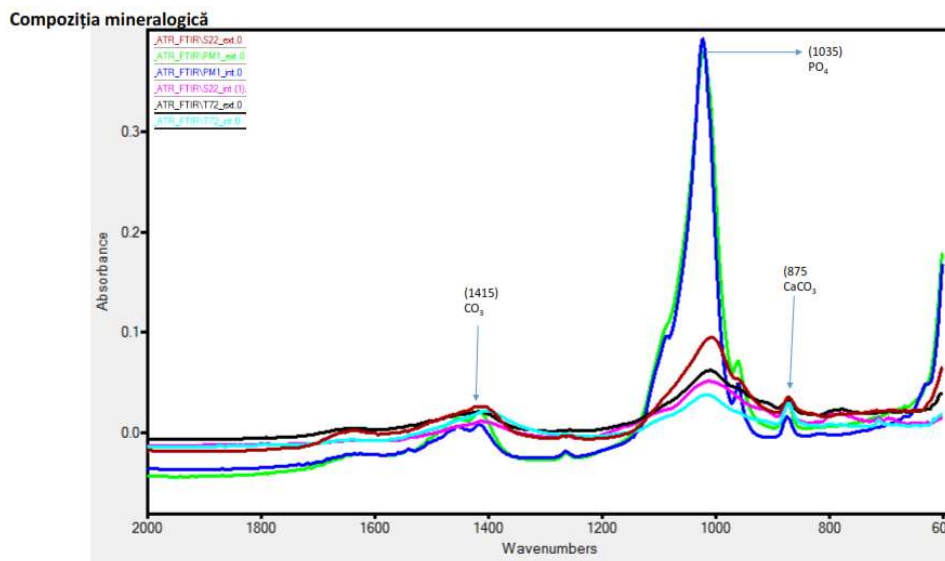


Fig. 5. Spectru obținut prin ATR-FTIR, reflectând compoziția minerală a probelor analizate (raport carbonați/fosfați) – detalii despre starea tafonomică a osului, probe cu slabă conservare a componentei organice/proteice.

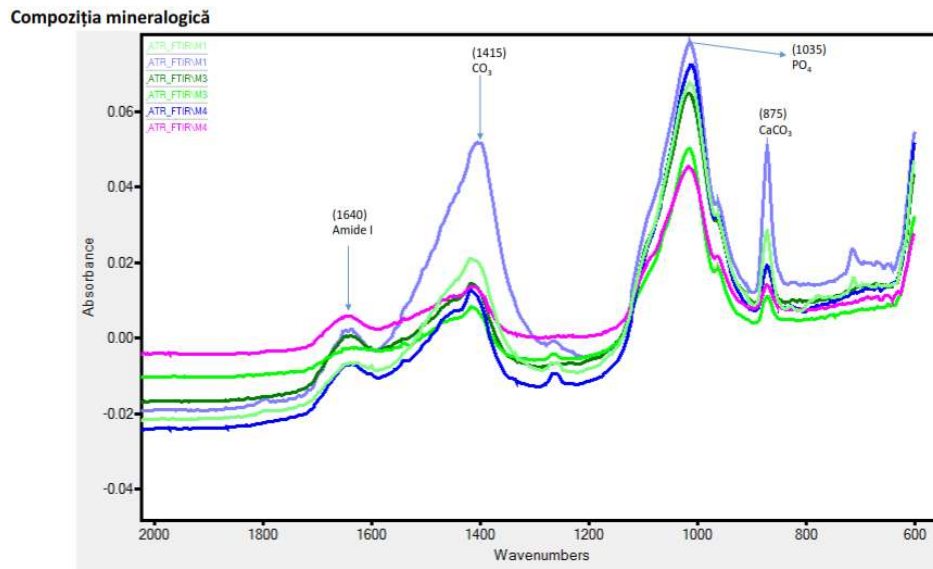


Fig. 6. Spectru obținut prin ATR-FTIR, reflectând compoziția minerală a probelor analizate (raport carbonați/fosfați) – detalii despre starea tafonomică a osului (Capidava, sec. 10, se observă prezența unui peak pentru amida I, indicator al bunei conservări a fracțiunii organice/proteice).

Compoziția mineralică

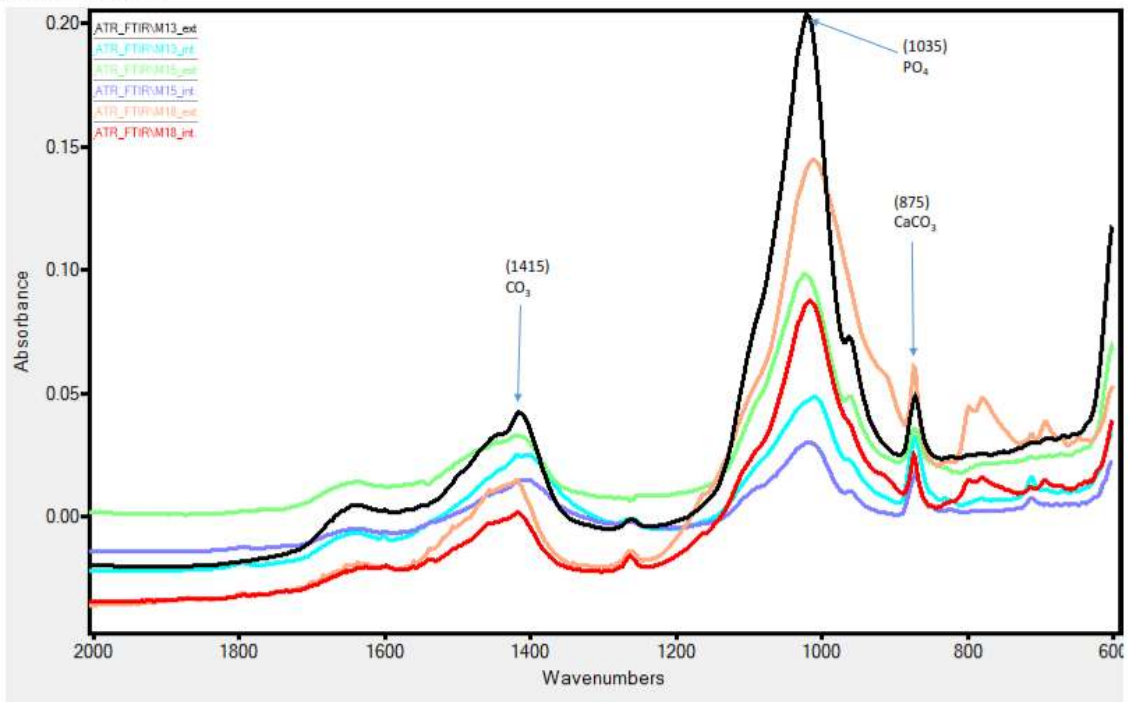


Fig. 7. Spectru obținut prin ATR-FTIR, reflectând compoziția minerală a probelor analizate (raport carbonați/fosfați) – detalii despre starea tafonomică a osului, probe cu slabă conservare a componentei organice/proteice.

Microstructura unui fragment osteologic necontaminat

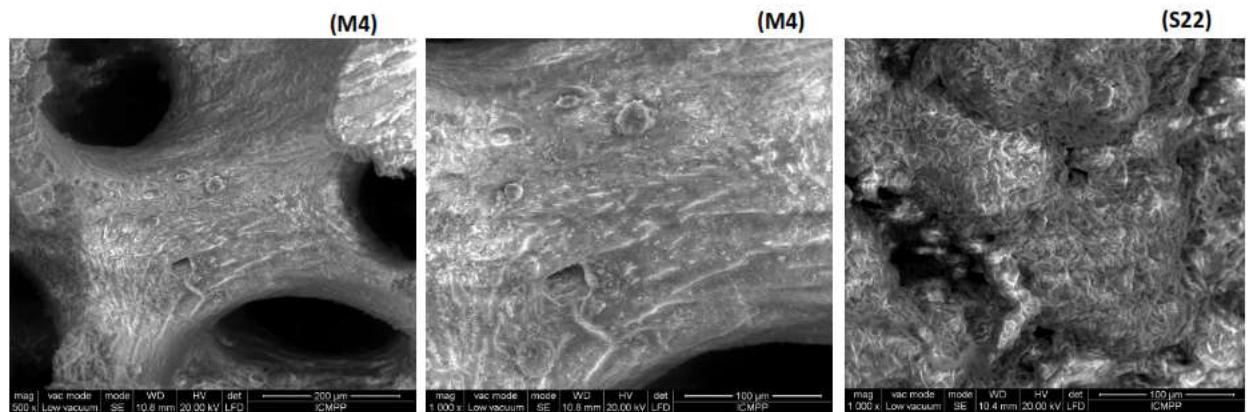


Fig. 8. Micrografiile ale suprafețelor osoase necontaminate, care nu reflectă acțiune microbială/fungică.

Microstructura unui fragment osteologic contaminat (M15)

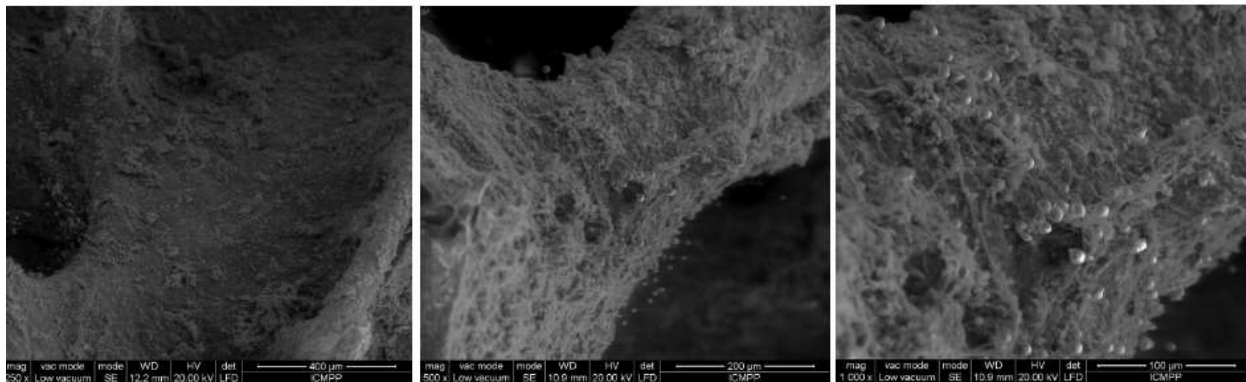


Fig. 9. Micrografiile ale suprafețelor osoase contaminate, care reflectă acțiune microbiană/fungică.

Microstructura unui fragment ceramic contaminat (ceramică Cucuteni C)

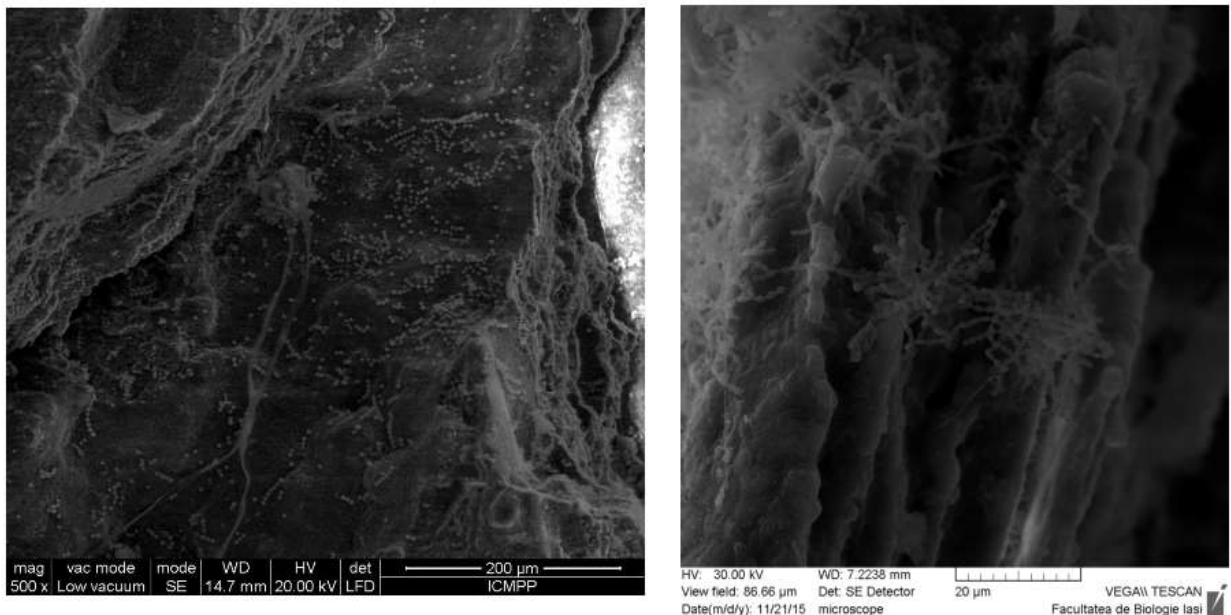


Fig. 10. Micrografiile ale suprafețelor ceramice, care reflectă acțiune microbiană/fungică.

Procese diagenetice și reconstituiri istorice

Fracțiunea minerală a fragmentelor osteologice conține pe lângă Ca, P, K, Na, Mg, C, O, H și o serie de *elemente urme* (F, Cu, Zn, Mn, I, Co, Mo, Se)

Reconstituirea paleodietei (d13C, d15N, d Sr87/Sr86)

Determinarea mobilității comunităților umane (d87Sr/86Sr)

Analize de paleoclima (d18O, d13C)

Procese diagenetice și reconstituiri istorice. Posibilități și limite

Nr.	LAB NR	C14 Vârsta	C14 STD	MATERIAL	SPECIE	SIT	PERIOADA
1	DsA-4379	8110	114	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
2	DsA-9145	8105	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
3	DsA-9135	8085	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
4	DsA-9139	8075	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
5	DsA-4185	8070	114	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
6	DsA-9007	8055	86	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
7	DsA-4382	8050	119	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
8	DsA-9138	8040	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
9	DsA-4380	8030	119	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
10	DsA-9137	8010	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
11	DsA-8207	8000	82	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
12	DsA-9174	7980	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
13	DsA-4378	7975	110	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
14	DsA-4381	7960	123	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
15	DsA-9131	7950	95	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
16	DsA-8583	7940	92	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
17	DsA-9131	7935	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
18	DsA-8584	7910	81	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
19	DsA-8549	7905	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
20	DsA-9136	7905	95	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
21	DsA-8581	7900	88	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
22	DsA-8582	7880	200	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
23	DsA-8585	7860	75	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
24	DsA-4183	7850	114	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
25	DsA-9143	7825	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
26	DsA-8550	7820	79	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
27	DsA-8547	7800	79	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
28	DsA-8579	7790	100	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
29	DsA-8585	7780	79	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
30	DsA-8583	7770	240	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
31	DsA-8548	7760	83	os	uman	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
32	DsA-9142	7745	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
33	DsA-9309	7730	70	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
34	DsA-9141	7700	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
35	DsA-9205	7570	90	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
36	DsA-9208	7530	70	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
37	DsA-9206	7460	70	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
38	DsA-9153	7100	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
39	DsA-9210	7010	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
40	DsA-9156	6920	90	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
41	DsA-9157	6890	80	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
42	DsA-9197	6880	90	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
43	DsA-9134	6880	95	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
44	DsA-9189	6770	90	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
45	DsA-9133	6770	95	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic
46	DsA-9158	6695	95	os	animal	Scheia Cladovei	Epipaleolitic

C. Bonsall, M. G. Macklin, A. Boroneant, C. Pickard, L. Bartosiewicz, G. T. Cook, T. F. G. Higham, *Holocene climate change and prehistoric settlement in the lower Danube valley*, Quaternary International, 378, 2015, 14-21.

Fig. 11. Limitele analizelor izotopice.

Procese diagenetice și reconstituiri istorice. Posibilități și limite

- De la Vere Gordon Childe la pachetele neolitice



Beginnings - New Research in the Appearance of the Neolithic between Northwest Anatolia and the Carpathian Basin, Raiko Krauß (Ed.), 2011.

Fig. 12. Înlocuirea nomenclaturii bazată pe încadrări culturale, în nomenclatură zonală bazată pe similarități la nivel fizic/chimic a materialului arheologic.

“Evoluție Genetică: Dovezi noi în studiul unor structuri interconectate. O călătorie biomoleculară în jurul
Carpaților din Antichitate până în Evul Mediu”

Raport științific

Etapa 2015

Cuprins

Rezumat

Raportarea temelor de cercetare la obiectivele prevăzute în etapa 2015

- Necropola Capidava
- Microbiota asociată resturilor umane arheologice – consecințe pentru depozitarea pe termen lung
- Diagnosticul malariei în populații istorice – abordare interdisciplinară
- Alte investigații de antropologie fizică

Concluzii

Rezumat

În condițiile înjumătățirii bugetului prevăzut, pentru al doilea an succesiv, a fost decisă restrângerea cercetărilor din acest an și focalizarea asupra temelor și loturilor cu cel mai mare potențial pentru publicare. Temele selectate sunt: finalizarea analizelor de antropologie fizică și moleculară pentru necropola de la Capidava, jud. Constanța; investigarea prin metode clasice și moleculare a microbiotei asociate resturilor osteoarheologice: decelarea speciilor microbiene proprii individului de cele din sol, investigarea contaminărilor microbiene în depozite și consecințele acestei contaminări pentru depozitarea pe termen lung; utilizarea unei abordări interdisciplinare pentru diagnosticul infecției cu *Plasmodium* sp. în populații istorice din regiuni cu risc crescut de malarie. Au fost continuate investigațiile de antropologie fizică finalizate cu raport, pentru diferite loturi, în vederea identificării unor cazuri cu potențial pentru aprofundarea cercetărilor. Au fost continuate documentările în teren, colecții muzeale și biblioteci.

Temele selectate constituie, de asemenea, subiectele unor teze de doctorat.

A fost organizat la Cluj-Napoca, în perioada 22-28 noiembrie 2015, workshop-ul “Interdisciplinaritatea în arheologie” cu invitați de la Institutul de Arheologie Vasile Pârvan al Academiei Române, Muzeul de Istorie Națională și Arheologie Constanța, Muzeul Brukenthal Sibiu și Universitatea Lucian Blaga Sibiu. În cadrul acestui eveniment au fost prezentate laboratoarele de antropologie fizică și moleculară, au fost organizate cursuri introductive practice de antropologie fizică și moleculară și au fost organizate mese rotunde în vederea identificării a noi oportunități de colaborare și formare de echipe interdisciplinare.

Raportarea temelor de cercetare la obiectivele prevăzute

Activități prevăzute pentru etapa 2015:

1. Documentare și schimburi științifice/ 7. Studii de arhivă

Au fost efectuate vizite de documentare la diverse biblioteci și în colecții ale unor institute internaționale de profil (istorie/arheologie). Dintre acestea amintim documentarea la Topkapi Seray, Istanbul, Turcia, Biblioteca Secretă a Vaticanului, Vatican, Biblioteca Națională a Austriei, Austria – colecția de manuscrise medieval și altele.

2. Investigații paleo-osteologice

A fost continuată analiza unor noi loturi osteologice după cum urmează: Călinești (jud. Prahova) n = 188; Capidava n = 116 (în pregătire pentru publicare); Ernei n = 1 (caz special, în pregătire pentru publicare); Nădlac n = 19; Turda n = 1; Târgșor n = 4; Cripta franciscană Cluj-Napoca = nr. minim de indivizi 130.

3. ADN vechi – secvențializare și genotipare

În această etapă au fost obținute, prelucrate și interpretate în vederea publicării peste 1000 de secvențe ADN (720 de secvențe ADN mitocondrial caracterizând 15 indivizi din necropola Capidava și cazul Ernei; 300 de secvențe folosite pentru determinarea speciilor de bacterii și fungi din resturi osteologice umane de proveniență arheologică, tartru și sol, în vederea caracterizării microbiotei asociate acestui tip de material și impactul asupra tafonomiei și depozitării pe termen lung; 200 de secvențializări în scopul identificării prezenței vectorului malariei *Plasmodium sp.*).

4. Analize izotopi stabili ai carbonului (C) și azotului (N) pentru caracterizarea dietei

Prin sondaj, au fost datate cu radiocarbon și au fost efectuate analize de izotopi stabili ai C și N pe probe aparținând tuturor loturilor investigate molecular în această etapă.

5. Analize complementare (SEM, spectroscopie IR)

Au fost efectuate analize de microscopie electronică pentru detecția fungilor din microbiota asociată osului și pentru detecția cristalelor de hemozoină formate prin degradarea hemoglobinei de către vectorul malariei. Tehnici de spectroscopie IR au fost utilizate pentru evaluarea tafonomiei oaselor studiate.

6. Săpături arheologice și procesarea inventarului material

Membrii echipelor partenere în proiect au participat pe șantiere arheologice la Stoina, Bâzdâna și Capidava. La Capidava, datorită condițiilor fortuite create de restaurarea cetății a fost săpată necropola medieval și au fost descoperite aproape 200 de complexe conținând resturi umane arheologice.

Necropola Capidava

Pentru probele umane arheologice provenind din această necropolă (campaniile 2010, 2013 și 2014) au fost secvențializate prin abordare clasică (extracție ADN, amplificare segmente țintă, clonare și secvențializare: 11 probe). În acest an a fost reluată secvențializarea prin tehnici de ultimă generație (**Next-Generation-Sequencing** - NGS) pentru 6 indivizi cu scopul de a verifica datele obținute și pregătirea lor pentru publicare.

Materialul genetic stocat în speciile arheologice reprezintă o dovadă genetică directă pentru un anumit moment din trecut și permite observarea evoluției genetice în timp real, spre deosebire de ADN-ul modern prin intermediul căruia se pot efectua doar inferențe asupra evenimentelor istorice, pe baza tiparelor actuale de distribuție a frecvențelor genice. Faptul că acest tip de informație poate fi accesată a deschis calea spre noi direcții de cercetare, iar metodele utilizate pentru procesarea probelor au fost constant îmbunătățite. Necesitatea optimizării metodelor de analiză utilizate în studiile de paleogenetică se datorează unor caracteristici pe care moleculele de ADN vechi le posedă: nivelul slab de conservare și fragmentarea secvențelor nucleotidice din cauza degradării post-mortem a acizilor nucleici (Pääbo et al., 2004; Willerslev și Cooper, 2005). O altă provocare pentru această arie de cercetare este recuperarea și procesarea moleculelor autentice, deoarece în probele arheologice există un amestec de ADN endogen și ADN ce provine din mediul înconjurător. În plus, contaminarea probelor cu ADN modern în timpul manipulării poate afecta autenticitatea rezultatelor, motiv pentru care în laboratoarele de ADN vechi se lucrează în condiții de sterilitate, după protocoale stricte (Pilli et al., 2013; Poinar, 2003; Yang și Watt, 2005).

Tehnica PCR sau reacția în lanț a polimerazei permite generarea unui număr considerabil de copii ale unui fragment de ADN. Dezvoltarea acesteia a avut consecințe remarcabile în domeniul bioarheologiei moleculare, deoarece permite analiza markerilor genetici din probe ce conțin un număr mic de molecule de ADN, cum sunt cele arheologice. La scurt timp după implementarea acestei tehnici în studiile de ADN vechi numărul lor a crescut apreciabil, iar focusul fiind tot mai diversificat. Originea și evoluția speciilor, relațiile filogenetice, dinamica populațiilor sau răspândirea unor specii patogene în rândul populațiilor antice sunt doar câteva dintre aspectele cheie vizate în domeniu (Hervella et al., 2015; Nesheva et al., 2015; Noonan et al., 2005; Papagrigrakis et al., 2006). Această strategie de amplificare a fragmentelor nucleotidice de interes este încă cea mai frecvent utilizată atât pentru secvențializarea clasică de tip Sanger, cât și pentru abordările de tip NGS, deși situația s-ar putea schimba în viitorul apropiat (Knapp și Hofreiter, 2010).

Dezvoltarea tehnologiilor de secvențializare, cunoscute sub numele de NGS, a avut un impact revoluționar asupra majorității ariilor de cercetare ale biologiei moleculare, dar nu toate au avut de câștigat la fel de mult precum studiile de ADN vechi. Dacă prin metoda clasică, cele mai accesibile informații erau, în general, cele de la nivelul unor segmente ale genomului mitocondrial, prin NGS se pot obține date de la nivelul întregului genom mitocondrial, dar și de la cel nuclear. În câțiva ani de la inventarea NGS numărul datelor de secvențe de ADN vechi au crescut exponențial, punând în lumină tot mai multe informații legate de originea și evoluția speciilor. Astfel, a fost posibilă analiza genetică a unor resturi osoase extrem de vechi care reprezintă verigi în evoluția omului ca specie și care oferă răspunsuri pentru unul din cele mai intrigante subiecte pentru comunitatea științifică (Fu et al., 2015; Meyer et al., 2014; Sawyer et al., 2015). Numărul tot mai mare de probe analizate în cadrul anumitor studii este corelat și cu scăderea dramatică a costurilor pentru secvențializare (Allentoft et al., 2015; Haak et al., 2015). Cu toate acestea, costurile necesare pentru pregătirea probelor de ADN vechi pentru secvențializare sunt încă ridicate, nefiind accesibile pentru toate laboratoarele specializate în domeniu. Există mai multe instrumente de secvențializare disponibile, cele mai comune pentru analiza ADN-ului

vechi fiind Roche (454) GS FLX Titanium și Illumina (Solexa) Genome Analyzer IIE (Millar et al., 2008). Cu ajutorul ambelor instrumente se realizează o secvențializare de tipul *massively parallel sequencing*, diferența dintre cele două fiind dată de lungimea fragmentelor ADN citite și de cantitatea de date generată printr-o singură rulare (Knapp și Hofreiter, 2010). Alegerea platformei de secvențializare este influențată, în principal, de calitatea ADN-ului folosit și de scopul urmărit.

Studiu de caz: genetica populațiilor medievale din sud-estul României

În scopul investigării din punct de vedere genetic a populațiilor umane vechi ce au ocupat în perioada medievală teritoriul din sud-estul României, Dobrogea de azi, s-au analizat mai întâi rămășițele osoase descoperite în necropola de la Capidava. Această necropolă datează din secolul al X-lea AD, conform contextului arheologic, o perioadă în care mișcările populaționale în regiune au fost intense (Pinter et al., 2011). Datele genetice suplimentează informația obținută din sursele tradiționale (izvoare istorice, arheologice) care pot fi adesea controversate și pun în lumină aspecte legate de aportul genetic în această zonă și posibila origine biogeografică a populațiilor. Rezultatele moleculare pentru indivizii de la Capidava au fost obținute prin două abordări distincte, efectuate în laboratoare diferite. Mai întâi, s-a obținut tiparul genetic reflectat de analiza regiunii de control a genomului mitocondrial prin metoda clasică de analiză a ADN-ului vechi. Astfel au fost analizați un număr total de 11 indivizi în Laboratorul de Bioarheologie moleculară din cadrul ICI-BNS, Cluj-Napoca. Dintre aceștia, 6 indivizi au fost selectați pentru a fi analizați în Laboratorul de Antropologie moleculară și paleogenetică din Florența. Aceste probe au fost procesate pentru a obține informația genetică de la nivelul întregului genom mitocondrial prin secvențializare NGS și confirmarea autenticității rezultatelor obținute anterior în România. În continuare vor fi descrise aspectele metodologice, cu precizarea avantajelor și a limitărilor, urmărite în cele două moduri de abordare.

1. Metoda clasică de analiză

Sursa pentru extracția ADN-ului a fost reprezentată de piese dentare, bine conservate, fără carii sau fisuri. Pentru decontaminare, dinții au fost, mai întâi, spălați cu soluție de clor 10%, apoi cu apă sterilă, iar ulterior întreaga suprafață a dinților a fost iradiată UV, timp de 40 de minute. Extracția ADN-ului s-a desfășurat într-o încăpere sterilă, separată de cea în care se realizează amplificarea prin PCR. Protocolul de extracție utilizat a fost descris de Yang și colaboratorii săi în 1998, fiind adaptat la condițiile din laboratorul nostru (Yang et al. 1998). Fiecare probă a fost reprezentată de 50 mg de pulbere dentară care a fost incubată la 55°C timp de 60 de ore în 1 ml de tampon de extracție (0,5 M EDTA pH 8.0; 0,5 % SDS; 2 mg/ml Proteinază K), iar ulterior incubată la 37°C timp de 4 ore. Izolarea ADN-ului s-a efectuat cu ajutorul kit-ului QIAquick PCR purification kit (Qiagen), conform specificațiilor producătorului. La fiecare extracție au fost incluse controale negative pentru monitorizarea unei eventuale contaminări a reactivilor. De asemenea, au fost considerate alte metode de precauție, frecvent utilizate în cercetările de ADN vechi: sterilizarea UV a incintelor de lucru, accesul cercetătorilor doar cu echipament adecvat (combinezon, mască, mănuși de unică folosință) (Gilbert et al. 2005; Pääbo et al. 2004; Yang și Watt, 2005).

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). Monitorizarea unei posibile contaminări a reactivilor folosiți s-a realizat prin adăugarea controalelor negative de PCR. La finalul reacțiilor de

amplificare s-a verificat faptul că au fost amplificate fragmentele de interes prin intermediul electroforezei în gel de agaroză. Această metodă analitică presupune separarea moleculelor de acizi nucleici care migrează în câmp electric în funcție de dimensiunea pe care o au. Astfel, cunoscând dimensiunea ampliconului, în urma migrării sale într-un gel de agaroză colorat cu bromură de etidiu, se poate vizualiza la UV prezența ADN-ului de mărimea așteptată. Segmentele de ADN de interes obținute în gel au fost purificate, în vederea clonării lor.

Pentru fiecare amplicon s-au efectuat un minim de 6 clone, rezultând un număr total de 48 de clone pentru un singur individ. Etapa de clonare presupune inserarea ampliconilor în vectori plasmidiali de clonare, transformarea unei tulpini de *E. coli*, purificarea plasmidelor și verificarea prezenței insertului prin digestia cu enzime de restricție. Deși acest proces este unul de durată, el este indispensabil pentru că permite efectuarea distincției între mutațiile reale și cele datorate degradării post-mortem a ADN-ului, precum și identificarea prezenței unui amestec de ADN în urma alinierii secvențelor. Secvențializarea tradițională, de tip Sanger, a clonelor a fost efectuată prin intermediul serviciilor disponibile în cadrul MacroGen.

2. NGS

Ca în cazul primei metode de analiză, izolarea ADN s-a realizat din dinți care reprezintă cea mai bună sursă pentru recuperarea materialului genetic din speciile arheologice, datorită proprietăților morfologice (Adler et al., 2011; Higgins și Austin, 2013). Extracția ADN a fost realizată conform protocolului descris de Dabney et al., 2013. Spre deosebire de metodele de extracție publicate anterior (Rohland și Hofreiter, 2007), acest protocol se remarcă prin: modificări în compoziția tamponului de legare ADN (*binding buffer*), creșterea volumului acestui tampon față de cel de extracție și utilizarea coloanelor de silica cuplate cu un rezervor care să permită încărcarea unor volume mari. Această tehnică de extracție în combinație cu pregătirea bibliotecilor de ADN permite recuperarea eficientă a moleculelor de ADN vechi scurte de până la 30 de perechi de baze (Dabney et al., 2013). În cazul amplificării PCR directe a produsului de extracție informația conținută în secvențele nucleotidice scurte este pierdută, deoarece doar fragmentele suficient de lungi permit atașarea complementară a amorsoarelor la secvența de interes și implicit replicarea acesteia.

Protocolul de secvențializare pentru platforma Illumina (MiSeq) presupune convertirea secvențelor ce urmează a fi determinate în biblioteci de ADN care permit amplificarea și imobilizarea lor pentru secvențializare (Kircher et al., 2010). Bibliotecile de ADN pot fi construite fie din molecule monocatenare, fie din molecule dublu-catenare. Dat fiind faptul că metodele de preparare a bibliotecilor monocatenare de ADN vechi sunt limitate de costurile ridicate și de timpul îndelungat necesar pentru obținerea lor, s-a optat pentru cealaltă variantă care permite recuperarea eficientă a materialului genetic endogen (Bennett et al., 2014). Primul pas pentru crearea bibliotecilor este fragmentarea segmentelor mari de acizi nucleici, dar din moment ce ADN-ul conținut în probele arheologice are dimensiuni mici, datorită degradării post-mortem, această etapă nu mai este necesară. Astfel, construirea bibliotecilor ADN a fost realizată prin ligarea unor adaptor universali trunchiați la ambele capete ale segmentelor bicatenare extrase (Meyer și Kircher, 2010). Adaptorii conțin situsuri de recunoaștere și atașare ale amorsoarelor (*priming sites*) utilizate pentru amplificare și secvențializare. În scopul ligării eficiente ale acestor segmente nucleotidice scurte s-au efectuat modificări la nivelul capetelor fragmentelor de ADN matriță. Mai întâi aceste capete au fost îndreptate printr-o reacție *blunt-end*, iar apoi la unul din capete a fost extins prin adăugarea unei cozi poliA care permite atașarea complementară a adaptorilor ce conțin capete 3' poliT. În acest fel se asigură faptul că la fiecare din cele două capete se vor lega adaptorii diferiți. După cele 2 reacții (*blunt-end*, *adaptor ligation*) produșii obținuți au fost purificați cu ajutorul coloanelor cu silica MinElute (Qiagen). La fiecare pas de purificare o cantitate de ADN matriță este pierdută, alterând randamentul de construire a bibliotecilor. Din această cauză este recomandat ca numărul acestor purificări să fie cât mai mic (Maricic și Paabo, 2009). După o

reacție de completare a secvențelor adaptorilor, s-au adăugat secvențe nucleotidice scurte, numite etichete (index) cu ajutorul unor amorse cu coadă (*tailed-primers*). Etichetele sunt secvențe specifice fiecărei biblioteci provenite dintr-o singură sursă și permit identificarea acestora după ce mai multe probe (de regulă 2, 3) sunt împreunate pentru captură și secvențializare multiplex. Profilul bibliotecilor ADN a fost verificat prin electroforeză capilară, iar numărul de molecule a fost cuantificat prin PCR cantitativ.

Selectarea fragmentelor de interes (genomul mitocondrial uman) din amestecul ADN existent în bibliotecile obținute s-a realizat prin capturare (*target capture*) (Maricic et al., 2010). Acest proces presupune hibridarea secvențelor ADN pe bază de complementaritate cu secvențele probă care sunt imobilizate pe sfere magnetice. Fragmentele de ADN irelevante (care nu s-au legat de sfere) au fost înlăturate prin spălare, iar apoi fragmentele țintă au fost eluate. Pentru obținerea unui număr de copii suficient de mare pentru secvențializare, bibliotecile de ADN ce conțin doar fragmente aparținând genomului mitocondrial uman au fost amplificate prin PCR.

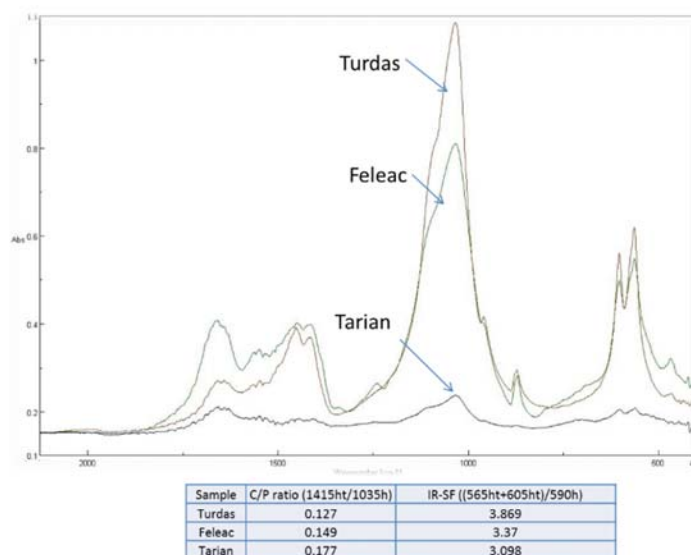
În concluzie, caracteristicile moleculelor de ADN vechi impun adaptarea metodelor și tehnicilor utilizate în studiile de ADN modern. Protocoalele de lucru sunt constant optimizate astfel încât să se acceseze cât mai mult din informația genetică păstrată în rămășițele arheologice, iar costurile pentru procesarea probelor să fie cât mai reduse. Progresul tehnologic în domeniu este unul uluitor, fiind disponibile tot mai multe metode de analiză a ADN-ului vechi, iar alegerea uneia se realizează în funcție de scopul studiului, caracteristicile materialului arheologic, dotările din laborator și fondurile disponibile.

Analiza moleculară a celor 11 indivizi din această necropolă demonstrează existența unei diversități genetice mari în cadrul acestei populații. Variația genetică la nivelul celor două regiuni hipervariabile ale genomului mitocondrial pentru majoritatea indivizilor analizați corespunde unor linii materne est-europene, cu o singură excepție care este specifică sudului Asiei. Aceste rezultate indică existența unei origini biogeografice diferite pentru indivizii din comunitatea medievală analizată. În plus, rezultatele obținute confirmă ipoteza arheologilor cu privire la existența unor relații de rudenie între două grupuri de câte doi indivizi înmormântați în complexul arheologic Capidava.

Microbiota asociată resturilor umane arheologice – consecințe pentru depozitarea pe termen lung

Pentru evidențierea efectului biodegradativ al fungilor asupra resurselor arheologice au fost utilizate probe de os din trei situri arheologice din Transilvania: Feleac (secolele XII-XVI AD), Tarian (secolul al XIX-lea AD) și Turdaș (mileniul al V-lea BC). Oasele au fost selectate datorită prezenței pe suprafața lor a unor zone pigmentate. Pentru a diferenția posibilele specii vechi de cele contaminante din mediu au fost rulate în paralel probe de sol corespunzătoare fiecărui individ analizat.

Tehnica FTIR

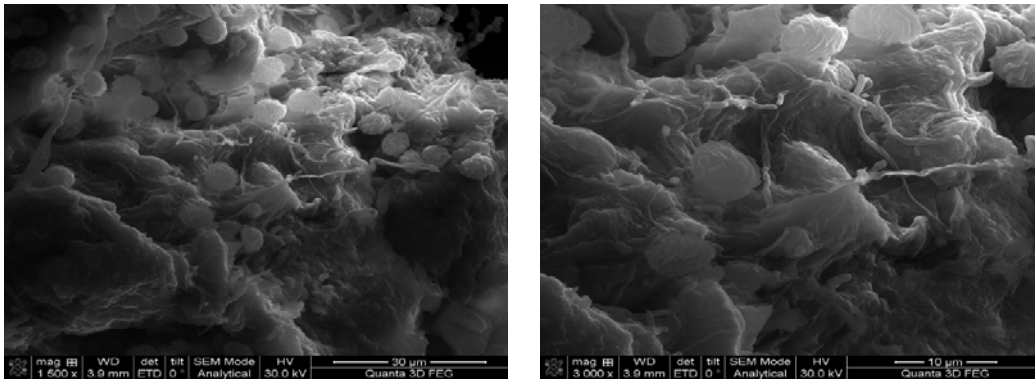


Spectru FTIR pentru probe de os de proveniență arheologică

Cu ajutorul tehnicii fizice FTIR (*Fourier Transformant Infrared Spectroscopy*) poate fi evaluat rapid gradul de remodelare pe care îl suferă osul în cadrul procesului de degradare. Raportul dintre apatită și colagen se schimbă de-a lungul timpului putând fi urmărite modificările de structură. Principalii factori prin care se evaluează gradul de conservare sunt IR-SF (*Infrared Splitting Factor*) și raportul carbonat/fosfat (*C/P ratio*). Pentru probele moderne valorile indicelui IR-SF sunt cuprinse între 2,5 și 3,25, descriind cristalinitatea matricei minerale a osului. Pentru probele arheologice, care prezintă alterări de structură, valorile indicelui sunt mai mari de 3,4 (Surovel și Stiner, 2001). În cazul raportului C/P se iau în calcul valorile *peak*-urilor la 1035 cm^{-1} pentru fosfat, respectiv 1415 cm^{-1} pentru carbonat (Beasley et al., 2014).

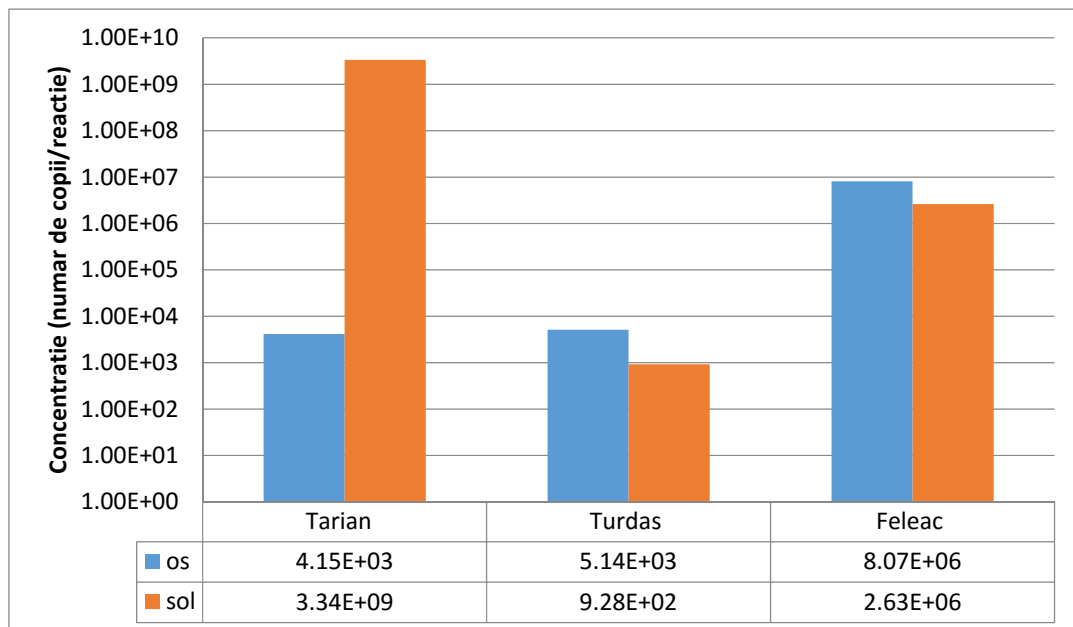
Valorile obținute pentru probele analizate sunt în concordanță cu vechimea atribuită de arheologi. Scorurile tafonomice atribuite în cadrul analizei antropologice sunt identice, utilizarea analizei FTIR fiind deci necesară.

Tehnica SEM (microscopie electronica de baleiaj)



Cu ajutorul microscopiei ce baleiaj a fost evidențiată prezența speciei *Stachybotrys chartarum* pe suprafața osului de la Feleac.

qPCR



Abundența absolută a speciilor de funghi pentru fiecare din probele de sol și os analizate din siturile arheologice de la Tarian, Turdaș, respectiv Feleac.

Pentru cuantificarea moleculelor de funghi prezente în probele de os și sol analizate au fost folosite amorsele FR1 (5'-AICCATTC AATCGGTAIT-3') și FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Pervost-Bouré et al., 2011) care țintesc un fragment de 390 pb din gena pentru ARNr 18S. Pentru curba standard s-a folosit un plasmid pJET1.2 conținând fragmentul de interes care a fost secvențializat în prealabil. Amplificările au avut loc în Rotor-Gene® Q (QIAGEN, Hilden, Germany) utilizând SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit (Bioline) reacțiile desfășurându-se într-un volum final de 20 μl, conținând 10 μl of SensiFAST SYBR No-ROX Mix 1x, 1 μl din fiecare amorsă (500 nM), 1,5 μl de ADN și 6,5 μl H₂O. A fost utilizat un

program PCR în trei pași, după cum urmează: 95°C - 3' (95°C - 10", 56°C - 15", 72°C - 15") × 40. Au fost utilizate duplicate pentru fiecare probă, precum și controale negative.

Pentru probele de sol de la Tarian și Feleac s-au obținut valori similare cu datele de qPCR prezente în literatură, spre deosebire de cea de la Turdaș unde valorile sunt mici. Abundența de specii este mai mare pentru probele de os comparativ cu cele de sol în cazul siturilor de la Feleac și Turdaș, oasele oferind substraturi mai bogate în nutrienți decât sol. Diversitatea și numărul de specii de fungi din sol scade cu adâncimea, probele de sol asociate indivizilor analizați provenind de la 40 cm adâncime.

Analiza probelor prin metoda independentă de cultivare

ADN-ul a fost extras din 200 mg probă de os sau sol direct utilizând PowerSoil®DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) conform specificațiilor producătorului.

Pentru analiza moleculară a fost aleasă regiunea *spacer*-ului intern transcris (ITS). Amorsele utilizate în reacția de amplificare au fost ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') și ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') pentru regiunea ITS1, respectiv ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') și ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') pentru regiunea ITS2 (White et al., 1990). O altă regiune țintită a fost gena pentru ARNr 18S, iar amorsele folosite au fost FR1 (5'-AICCATCAATCGGTAIT-3') și FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Pervost-Bouré et al., 2011).

Pentru fiecare set de amorse, amplificarea s-a realizat într-un volum final de 25 μl, amestecurile conținând următoarele componente: 5 μl de 5 × MangoTaq Colored Reaction Buffer (Bioline), 1,25 μl de MgCl₂ 50 mM (Bioline), 0,5 μl dNTP 10 mM (Bioline), 1,25 μl din fiecare amorsă (Macrogen Sequencing Service, Korea), 0,25 μl de MangoTaq (Bioline) 5 U/μl și 2 μl de ADN. Pentru fiecare set de amorse a fost introdus un control negativ, care nu conține ADN. Pentru amplificare au fost folosite următoarele variații termice pe parcursul a 35 de cicluri: 95°C pentru 30 sec, 56°C pentru 30 sec și 72°C pentru 30 sec.

Reacția de amplificare a generat fragmente de ADN de dimensiuni așteptate care au fost clonate și ulterior trimise la secvențializat (Macrogen Sequencing Service, Korea). Au fost analizate câte 8 clone pentru fiecare din markerii moleculari utilizați.



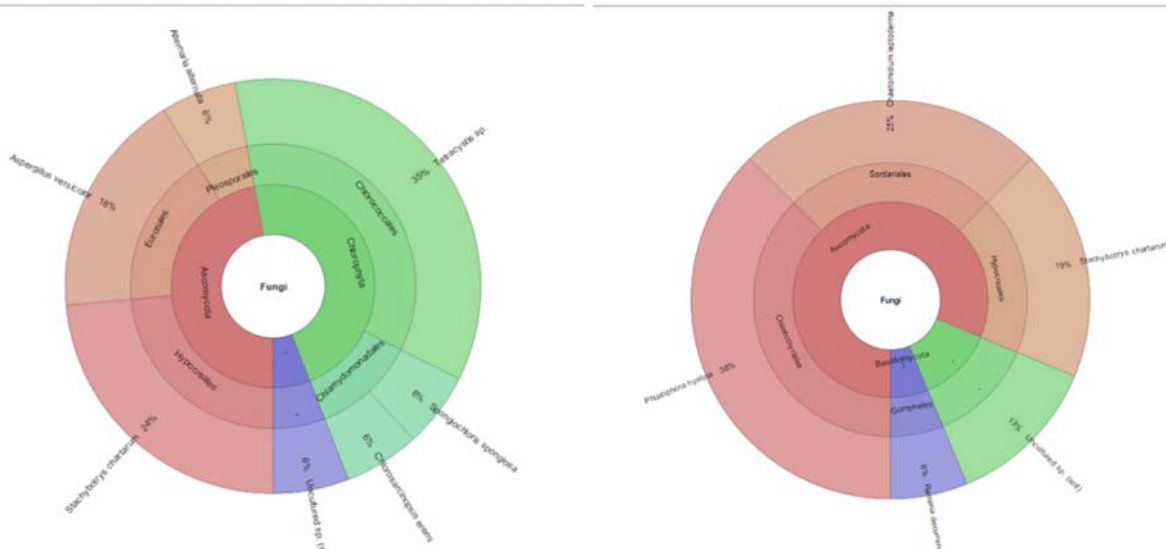
Specii microbiene în os, respectiv sol, probe Feleacu, Cluj.

În cazul probelor de la Feleac au fost identificate secvențe aparținând speciilor din genul *Stachybotrys*, atât în sol cât și pe suprafața osului. Diversitatea de specii este scăzută pentru acest sit. Toate speciile identificate sunt comune în sol fiind de fapt larg răspândite în mediu. Se remarcă prezența unei secvențe amplificate din os care se aliniază în bazele de date cu o specie necultivată asociată pielii umane. Fragmentul este totuși mare aprox. 300 pb neputând fi corelat cu o posibilă specie veche. Problema contaminării în timpul procesului de investigare este de luat în calcul (transferul acestei specii de la cei care au manipulat probele: arheologi, biologi).



Specii microbiene în os, respectiv sol, probe Tarian, Oradea.

În cazul probelor de sol, respectiv os de la Tarian, se observă o diversitate mult mai mare de specii. S-au obținut secvențe aparținând câtorva specii încadrate în regnul plante fiind evident efectul prezenței apei în procesul de biodegradare.

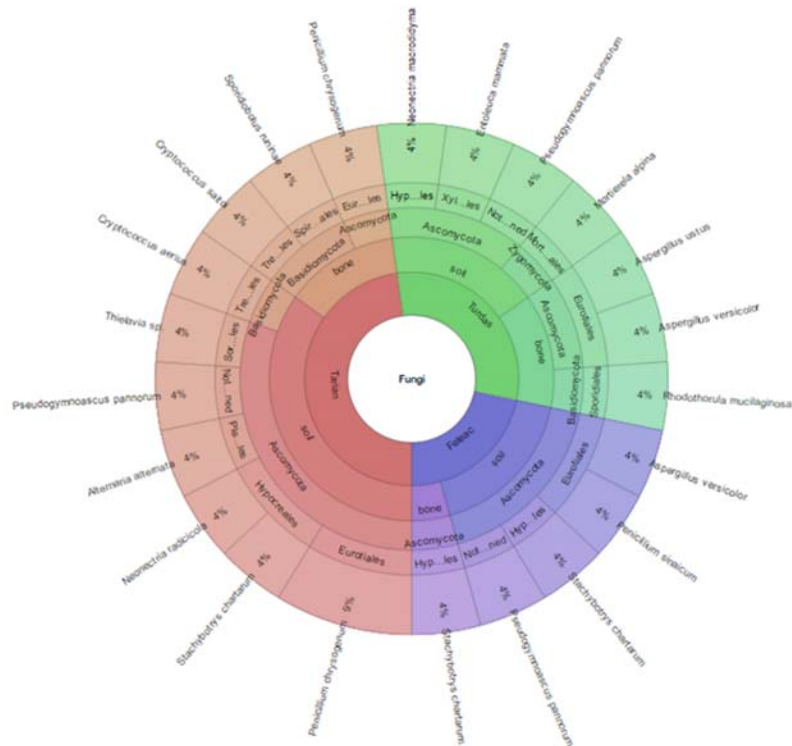


Specii microbiene în os, respectiv sol, probe Turdaș, Hunedoara.

Stachybotrys e prezent în toate probele, probabil contaminare din depozit.

Analiza probelor prin metoda bazată pe cultivare

Pentru a detecta speciile active asociate suprafeței s-a utilizat metoda de analiză bazată pe cultivare. Suprafața curată a osului a fost pulverizată mecanic, peste 100 mg de pudră de os fiind adăugați 500 μl apă ultrapură. 300 μl au fost inoculați pe plăci Sabouraud agar conținând: 40 g/l glucoză, 10 g/l peptonă, 15 g/l agar, 50 μg/ml cloramfenicol la pH 5,6. Plăcile au fost incubate 7 zile la 25°C.



Specii microbiene caracterizate prin tehnica de cultivare pe mediu.

Specii din genurile *Rhodotorula*, *Stachybotrys*, *Epicocum*, care apar constant în probele studiate sunt asociate în unele cazuri cu patologii.

Specii bacteriene aparținând microbiotei orale identificate în probe de tartru de proveniență arheologică

Actynomices, *Streptococcus* și MT7

Diagnosticul malariei în populații istorice – abordare interdisciplinară

Extracție de proteină totală pentru efectuarea de teste rapide de detecție a infecției cu *Plasmodium* sp.

- Activitate de documentare-informare în vederea cunoașterii stadiului actual al cercetărilor și elaborării unui protocol de lucru necesar pentru obținerea și analiza proteinelor din surse arheologice.
- Activități practice
 - Planificarea experimentelor (adaptarea protocoalelor din bibliografia consultată la baza materială disponibilă)
 - Pentru a evita contaminarea probelor cu proteine exogene toate probele folosite (țesut osos sau dentar) au fost curățate prin spălare și iradiere cu lumină UV. Cu ajutorul unei freze dentare din aceste probe s-a obținut o pulbere care a fost folosită în toate metodele experimentale ulterioare.
 - Testarea protocoalelor de lucru

Au fost elaborate 3 protocoale de lucru pentru testare: două din ele au fost descrise de Schmidt-Schultz & Schultz (2004), respectiv Tran et al. (2011). Al treilea folosește un kit de extracție a proteinelor disponibil comercial (ProteoJET, Fermentas).

- Evaluarea cantitativă a eficienței celor trei metode prin metoda Bradford.
- Selecția și pregătirea probelor provenite de la 11 indivizi din necropolele Mireasa, jud. Constanța (9) și Capidava, jud. Constanța (2).
- Utilizarea proteinelor obținute prin extracție din pulpa dentară pentru detecția malariei folosind teste de diagnostic rapid BinaxNOW Malaria. Rezultate: 5 pozitiv (Mireasa - 4, Capidava - 1), 6 negativ (Mireasa - 5, Capidava - 1).

Confirmarea diagnosticului pozitiv prin amplificarea ADN

- Selecția amorselor folosite pentru confirmarea diagnosticului pozitiv:

Nume	Secvența	Sursa
Pif3D7F	GAAACTGTGGATAATGTAAATG	Ongagna-Yhombi, S. Y., Corstjens, P., Geva, E., Abrams, W. R., Barber, C. a, Malamud, D., & Mharakurwa, S. (2013). Improved assay to detect Plasmodium falciparum using an uninterrupted, semi-nested PCR and quantitative lateral flow analysis. <i>Malaria Journal</i> , 12(1), 74.
Pif3D7R	ATTATCCTATTGCTTAAAGGT	
Pfcrt76D1F	TGTGCTCATGTGTTTAAACTT	Schwab, U., Allouche, A, & Doherty, J. F. (2005). Multidrug-resistant malaria from South Africa. <i>Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America</i> , 40(3), 493.
Pfcrt76D2R	CAAACTATAGTTACCAATTTTG	
PlspSSUF	TCTAGGGGAAGTATTTTAGCTT	Smith, P. H., Mwangi, J. M., Afrane, Y. A, Yan, G., Obbard, D. J., Ranford-Cartwright, L. C., & Little, T. J. (2011). Alternative splicing of the <i>Anopheles gambiae</i>

PlspSSUR	CACAGTAAATGCTTTAACTGTT	Dscam gene in diverse Plasmodium falciparum infections. <i>Malaria Journal</i> , 10(1), 156.
----------	------------------------	--

- Extracția ADN din pulpa dentară provenită de la 2 indivizi din necropola Mireasa pentru care am obținut rezultate pozitive la testul de diagnostic rapid BinaxNOW Malaria.
- Optimizarea protocolului de PCR pentru amorsele descrise mai sus.
- Analiza secvențelor obținute prin amplificare folosind amorsele Plf3D7 și PlspSSU a demonstrat o amplificare nespecifică. Secvențele obținute se aliniază parțial cu mai multe secvențe, provenind de la diverse specii, din baza de date *NCBI Gene*.
- Designul unor amorse alternative folosite pentru confirmarea diagnosticului pozitiv:

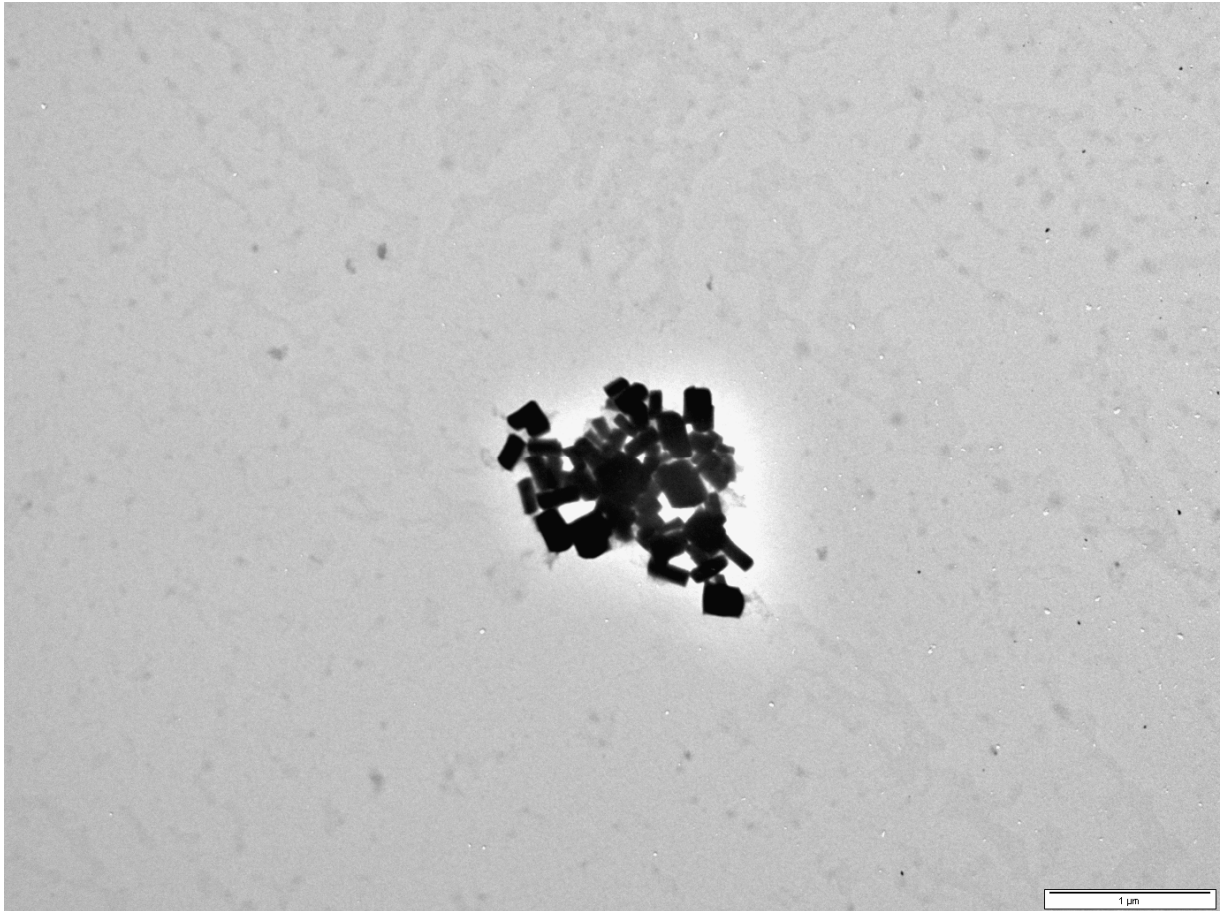
Nume	Secvența	Sursa
Minibar F	TCCACTAATCACAARGATATTGGTAC	Meusnier, I. et al. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. <i>BMC Genomics</i> , 9, 214.
Minibar R	GAAAATCATAATGAAGGCATGAGC	
Plasmodium COI F	CAGAATTAGCATAYCCWAGAAT	Proprii
Plasmodium COI R	CTTAATGGTGGATATAAAGTCC	
Plasmodium Cyt B F	TACATTTACATGGTAGCACAAAT	Proprii
Plasmodium Cyt B R	ACGATAGCATTATCAGGATGTGA	

- Analiza secvențelor obținute prin amplificare folosind amorsele universale Minibar pentru un fragment de 130 bp din gena *COI* arată că speciile predominante în ADN extras din os provine de la specii de bacterii și fungi comune în sol.
- Implementarea unui nou protocol de extracție ADN pe baza metodei descrise de Dabney et al (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), 16758-16763.
- Extracția ADN din pulpa dentară folosind protocolul menționat anterior a dat rezultate bune în sensul creșterii cantității de ADN obținute.

Confirmarea diagnosticului pozitiv prin detecția cristalelor de hemozoină

- Activitate de documentare cu scopul:
 - Elaborării unor protocoale de lucru pentru confirmarea diagnosticului de malarie obținut prin folosirea testelor de diagnostic rapid BinaxNOW Malaria.
 - Familiarizării cu metode de detecție și caracterizare a hemozoinii (produs de degradare produs de paraziții din genul *Plasmodium* ca urmare a degradării hemoglobinei).
- Activități practice:
 - Testarea unor tehnici de izolare și detecție a hemozoinii pe baza proprietăților fizico-chimice ale acesteia:
 - Microscopie optică
 - TEM (Microscopie electronică de transmisie)
 - XRD (Difracție de raze X)
 - FTIR (Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier)

- Folosirea microscopiei electronice de transmisie pentru detecția hemozinei, pentru 3 indivizi.



Imagine TEM. Cristale de hemozină recoltate de la individul M47, Mireasa, Constanța

Alte investigații de antropologie fizică

A fost continuată analiza unor noi loturi osteologice după cum urmează: Călinești (jud. Prahova) n = 188; Capidava n = 116 (în pregătire pentru publicare); Ernei n = 1 (caz special, în pregătire pentru publicare); Nădlac n = 19; Turda n = 1; Târgșor n = 4; Cripta franciscană Cluj-Napoca = nr. minim de indivizi 130.

Alte lucrări în curs de apariție

Carte

Adrian Ioniță, Beatrice Kelemen, Alexandru Simon, Prințul Negru *al Țării Românești: un voievod de la Curtea de Argeș și vremurile sale (=Minerva, III, 14)* (Cluj-Napoca: Academia Română, Centrul de Studii Transilvane, Cluj-Napoca, 2015), 216 p. [Editură **CNATDCU** (Nat-A1-A2)/ **CNCS** (B)]

Articol

Beatrice Kelemen, Adrian Ioniță, Alexandru Simon, „De la Biserica Argeș I la Biserica Argeș II: vremea Țării Românești și a Bisericii Sfântul Nicolae Domnesc”, *Anuarul Institutului de Istorie A.D.Xenopol* (Iași), LII (2015), pp. 1-58. [ERIH (Nat)/BDI (CEEOL)/**CNCS** (B)]

Concluzii

Pe baza celor raportate mai sus putem concludiona că au fost îndeplinite activitățile asumate pentru această etapă a proiectului în proporție de 100%.

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 nual , proces mastoid, margine supraorbital , glabel , i eminen 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 eaua 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.

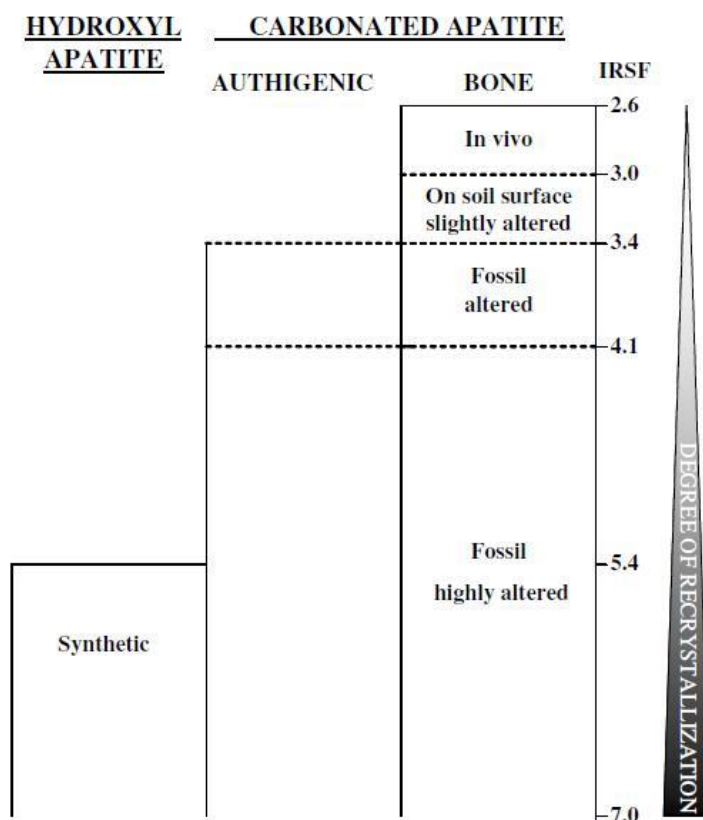


Fig.2. Valori ale IRSF i gradul de recrystalizare pentru diferite tipuri de apatite. Apatita carbonatata exogen este mineralul ce se formeaz cel mai des prin reac ia între fosfatul eliberat din degradarea materiei organice i carbonatul de calciu prezent în sedimente. (din Berna i colab., 2004)

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 .

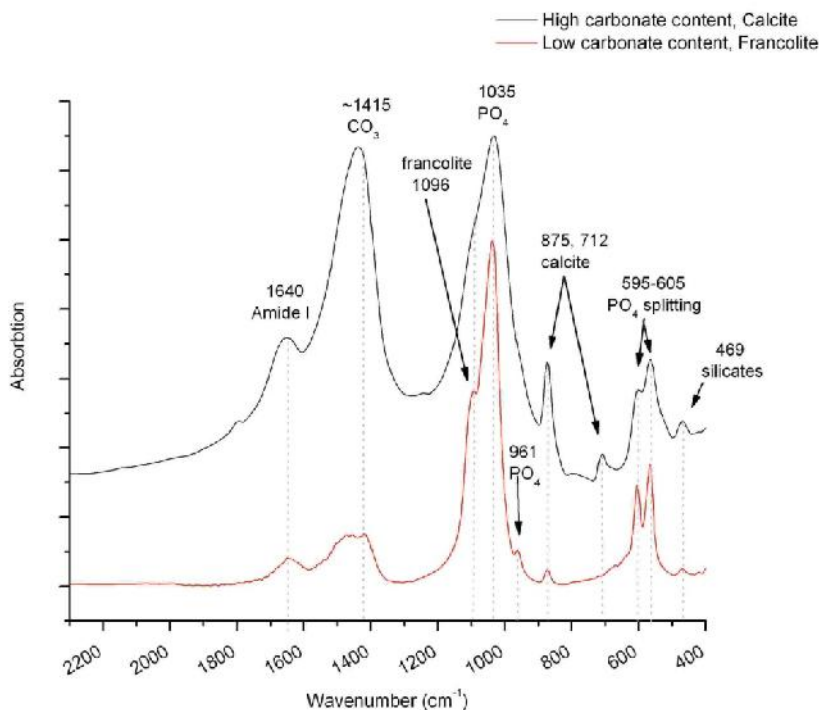


Fig.3. Exemple de spectre de absorbie FTIR ale unor oase cu tipuri de diagenez diferite (discu ie în text) (imagine proprie)

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 collagen’ – 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.

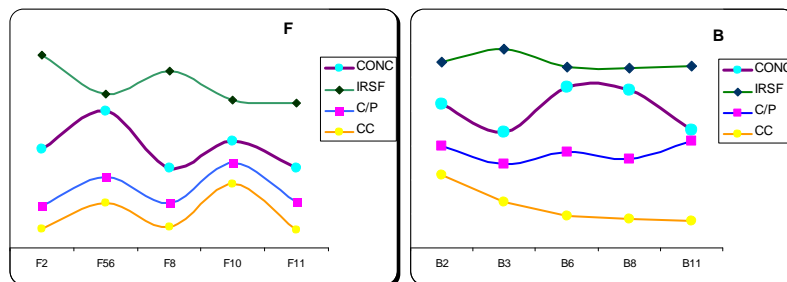


Fig.4. Corelarea direct proporțională a indicilor C/P și CC și invers proporțională a IRSF cu concentrația de ADN extras. F = individul M6, B = individul M3. Pe axa absciselor sunt probe din oase diferite. Indicii nu sunt reprezentați în valori absolute.

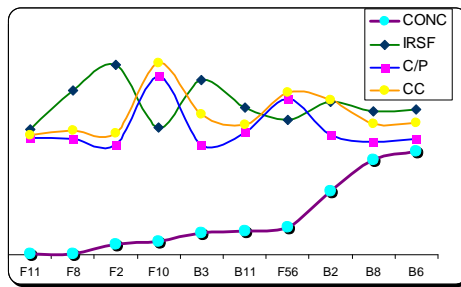


Fig.5. Corelarea indicilor cu concentrația de ADN dispăre atunci când se compar indivizi diferiți. Indicii FTIR în ipstrează relația de simetrie, dar valorile concentrației de ADN nu coincid cu modelul individual. F = individul M6, B = individul M3. Pe axa absciselor sunt probe din oase diferite. Indicii nu sunt reprezentați în valori absolute.

Corelarea indicilor FTIR cu vârsta

Metoda pantei graficului CC-ADN

Ipoteza de la care s-a pornit în studiul de față este că supravieuirea ADN în oase este proporțională cu cea a colagenului. Deci indicele CC ar trebui să fie decisiv în luarea deciziei de a aprofunda studiul unui anumit os prin extracția de ADN. Figura 6 aduce împreună toate valorile indicelui CC și concentrațiile de ADN extras. Liniile punctate sunt trendline-uri pentru câte un individ și respectă codul de culori de la legendă. La cele mai multe probe, trendline-ul arată o proporționalitate directă între valoarea CC și concentrația ADN, dar există și indivizi pentru care dreapta este înclinată invers sau este orizontală. Oricum, și la indivizii cu proporționalitate directă se observă diferite grade de corelare, liniile din grafic fiind înclinate la unghiuri foarte variate. Aadar, valoarea CC nu pare să prezică nicicum concentrația de ADN din probe.

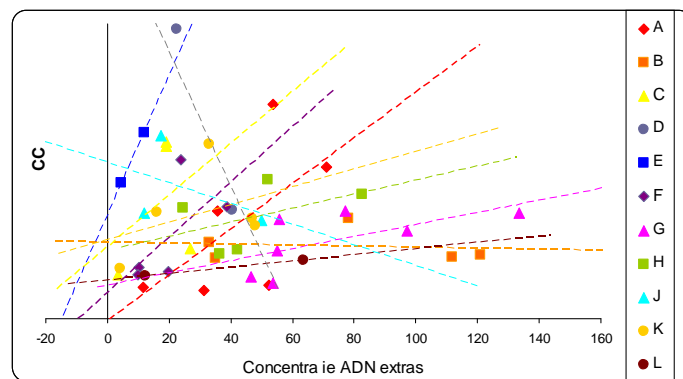


Fig.6. Slabă corelare dintre valoarea CC și concentrația de ADN obținută pentru toate probele studiate. Fiecare individ este reprezentat cu un alt simbol, iar axele de trend corespund codului de culori. Se observă o variație a unghiului dintre trendline și axa ox.

S-a observat o legătură între înclinarea axei dintre CC și concentrațiile de ADN extras per individ și vârsta acestuia. Ecuațiile axelor de trend sunt notate în tabelul 2, ordonate crescător după panta lor. Astfel, axele cele mai 'orizontale' sunt ale datelor de la indivizii M3-B și M160-L, de 26-70, respectiv 26-39 ani. La individul L, însă, graficul a fost trasat din doar două puncte, deci e probabil că unghiul trendline-ului să fie mai mare în realitate. Aadar vârsta lui de maxim 39 de ani nu ar mai contrazice teoria propusă aici. În ordinea crescătoare a unghiurilor trendline-urilor urmează indivizii M7-G și M11a-H care au vârstele cuprinse între 33-42 respectiv 21-53 ani. Următoarele drepte sunt ale indivizilor M115A-K și M2-A, aproximativ ca având 20+ și 20-23 de ani. Urcând înspre vertical, urmează dreptele indivizilor M4-C și M6-F, de 15-25 respectiv 17-19 ani. Dreapta cu cea mai mare pantă din această serie de drepte este cea a individului M5b-E, infans. Există și două axe puternic deviate, unde relația dintre CC și concentrația de ADN este inversă, dar acestea apar în tot unor copii și unghiul de înclinare 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 concentrație, legătură 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 atribuit 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 mineral și organic 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-pantă 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.

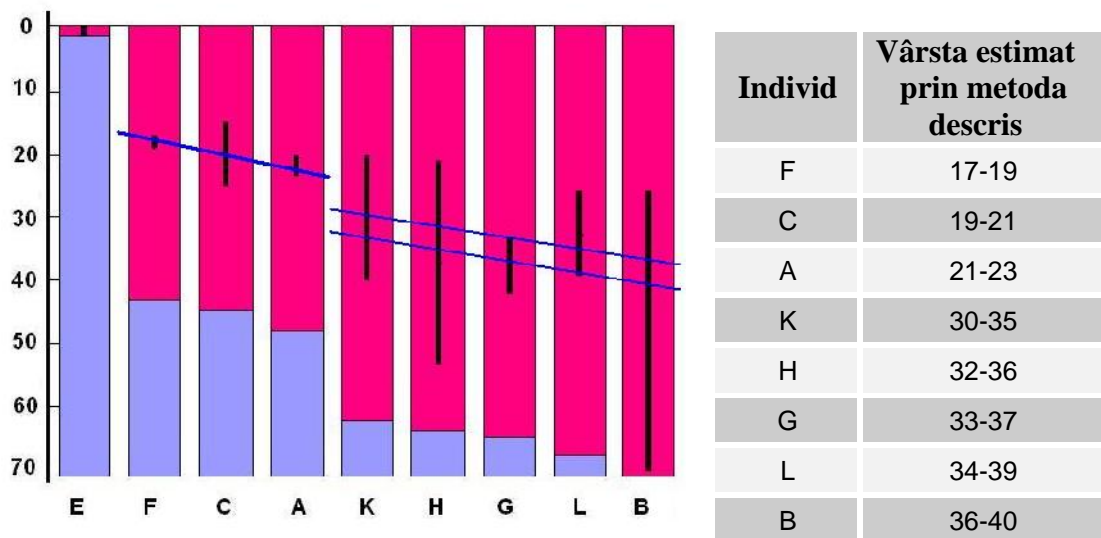


Fig.7. A. Metoda de deduc ie a vârstei indivizilor pe baza pantei func iei CC-concentra ie ADN. Cu negru sunt reprezentate intervalele de vârst deduse prin metode antropologice. Cu albastru sunt valorile pantelor func iilor corespunz toare fiec rui individ. Prin trasarea unor drepte paralele cu valorile 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.

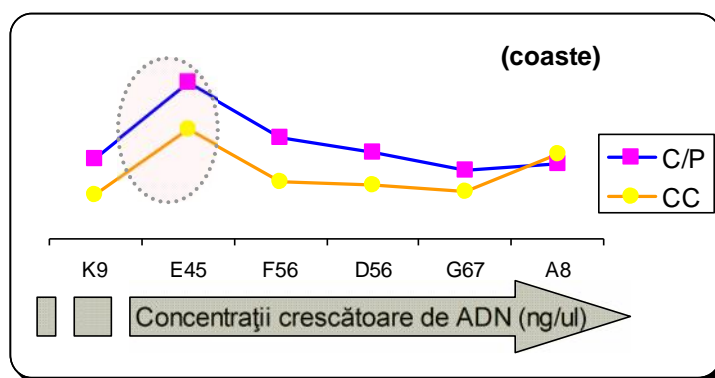


Fig.8. Indicii C/P i CC în rela ie cu concentra ia de ADN extras din coastele diferi ilor indivizi. Individul E, la care apare o abera ie în grafic, este un nou n scut.

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).

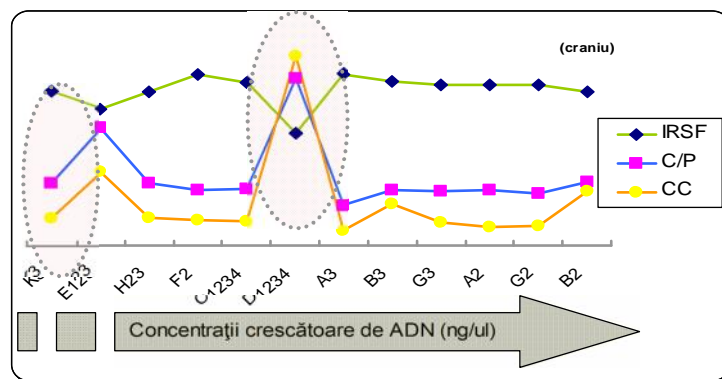


Fig.9. Indicii FTIR în relație cu concentrația de ADN extras din oasele craniilor. Probele aparținând indivizilor D (M5a) și E (M5b) prezintă abateri față de trendline.

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.

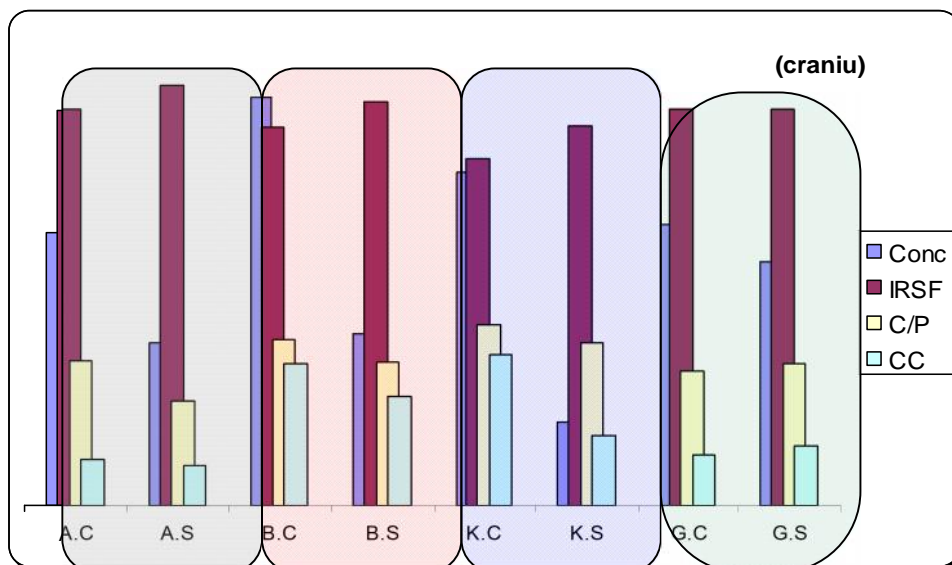


Fig.10. Corelarea directă între concentrația de ADN extrasă și indicii CC și C/P și corelarea lor inversă cu IRSF, la indivizii A, B, K. Individul G prezintă o neconcordanță cu restul rezultatelor observate. A = individul M2, B = individul M3, K = individul M115A, G = individul M7, C = os compact, S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

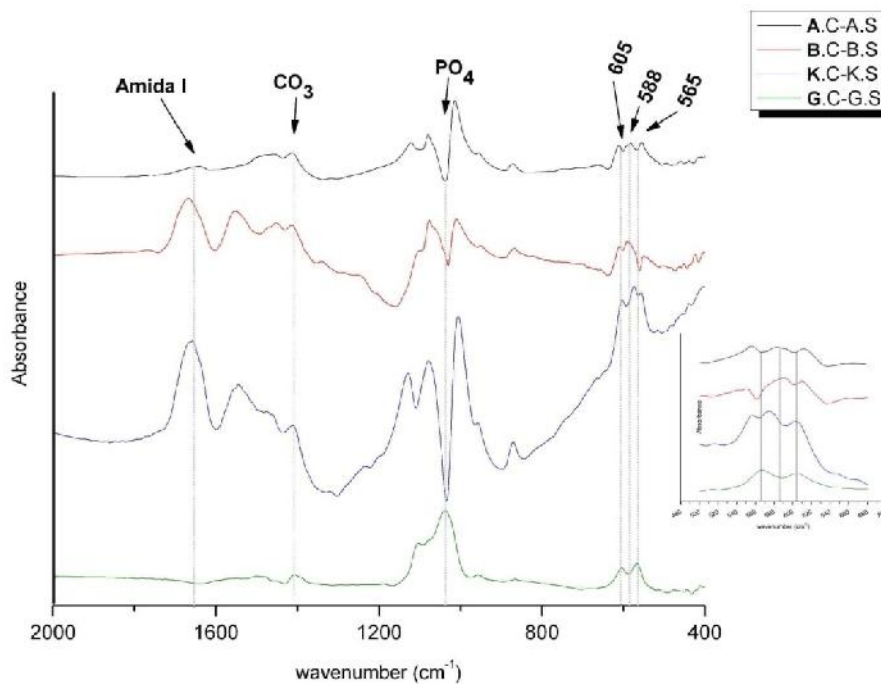


Fig.11. Diferen a dintre spectrele de absorb ie ale osului compact i spongios pentru indivizii A, B, K i G. Se observ diferen ele de la nivelul amidei I, al carbonatului i fosfatului i din zona de calcul a indicelui de cristalinitate IRSF, care se vede în detaliu în medalion.

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.

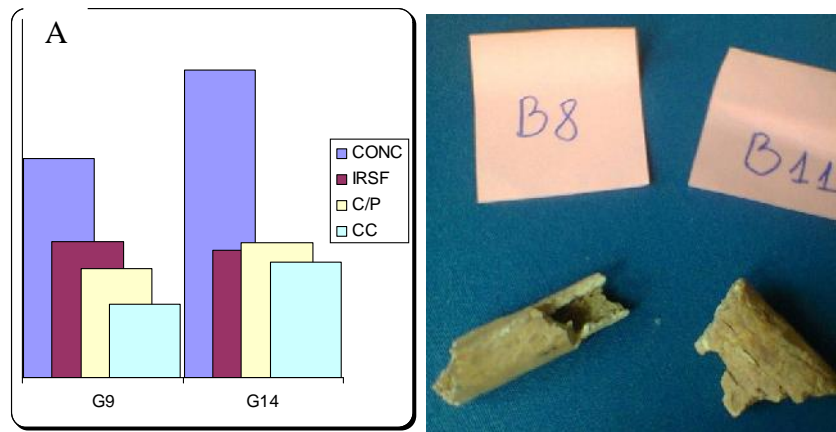


Fig.12. A. Corelarea dintre concentrația ADN extras din două diafize ale individului M7-G (proba G9 mai slab conservată decât proba G14) și indicii FTIR pentru oasele respective. B. Fotografie a probelor din individul M3-B, unde proba B8 este vizibil mai bine conservată decât proba B11.

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.

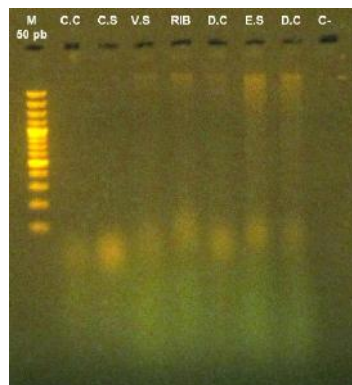


Fig.13. Gel de agaroz 2% cu ADN vechi extras din probe de os. Banda inferioară a markerului are 50 pb.

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 care rămân în extrasul de ADN și inhibă reacțiile 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.

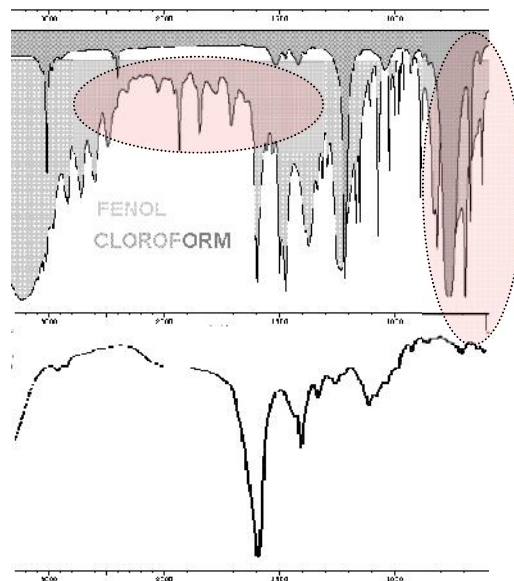


Fig.14. Evidențierea diferențelor dintre spectrele de absorbție în IR ale fenolului (gri deschis) și cloroformului (gri închis) în comparație cu spectrul specific al ADN antic extras (jos). Cu roșu sunt marcate peak-urile care infirmă prezența acestor substanțe în produsul extras.

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).

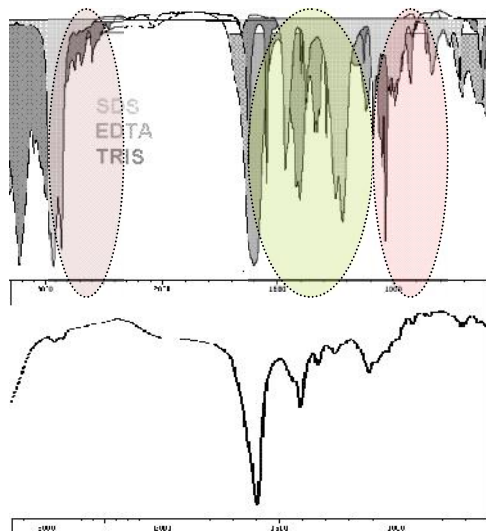


Fig.15. Compara ie a spectrelor SDS (gri pal), EDTA (gri i) i TRIS (gri i nchis) cu al ADN-ului antic extras (jos). Marcate cu ro u sunt peak-urile care dovedesc absen a SDS i TRIS i n produsul de extrac ie. Cu verde e eviden iat EDTA, cu un spectru asem n tor cu al probei.

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.

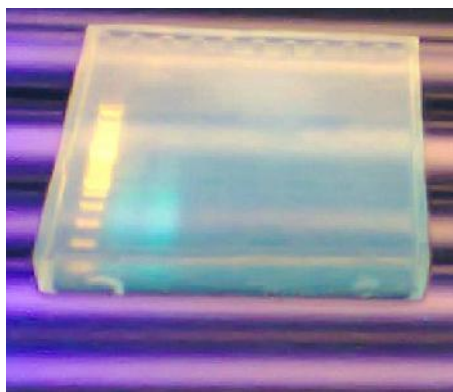


Fig.16. Gel de agaroz i n UV, pe care s-a migrat ADN antic. Se observ fluorescen a albastr .

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 .

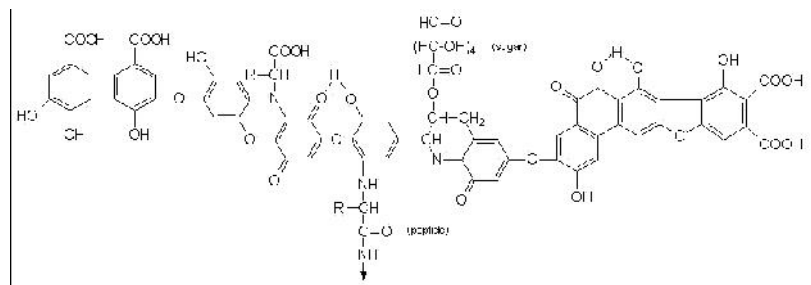


Fig.17. Formula chimic general a acizilor humici.

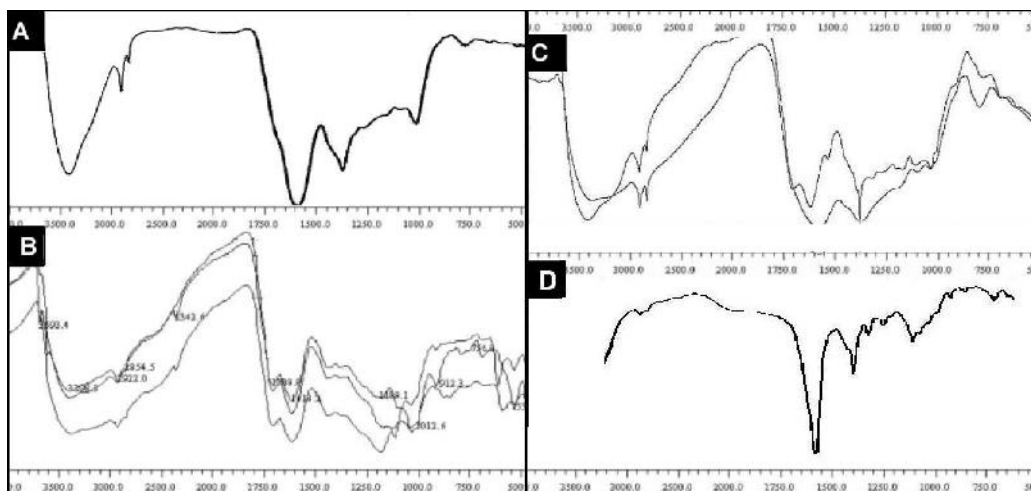


Fig.18. Spectre de absorb ie în IR ale unor acizi humici. A – dup Rodriguez i colab., 2009; B – dup Fong i colab., 2006; C – chemicalbook.com; D – proba G9 de ADN extras din os.

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.

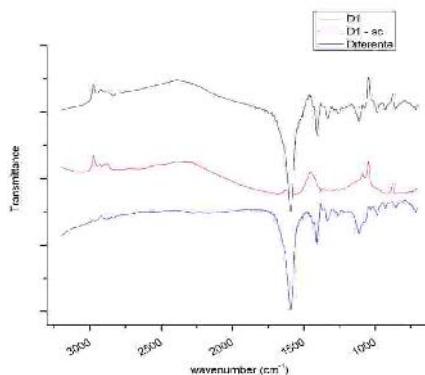


Fig.19. Spectrele de absorb ie în IR ale probei D1, înainte i dup purificarea cu kitul SureClean Plus de la Bioline® (spectrul negru, respectiv ro u) i diferen a dintre acestea (spectrul albastru). Se observ c peak-ul puternic de la 1600 cm⁻¹ i peak-urile mai mici dintre 1400 – 1100 cm⁻¹ dispar.

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.

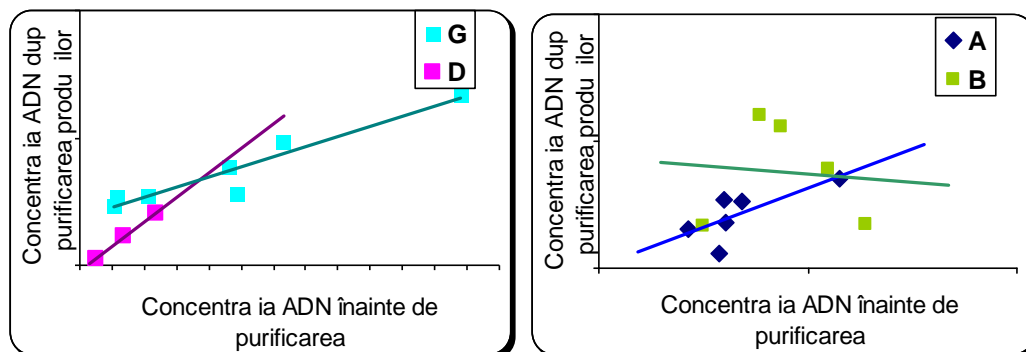


Fig 20.1. Corelarea liniar a concentra iilor de ADN înainte i dup purificarea cu kitul SureClean Plus de la Bioline®. 2. Probe pentru care corelarea liniar nu s-a p strat.

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 diageneză 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 acestora și simptomele 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 lmpile 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, mănuși. 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 cules 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 câte 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 volum 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 μL 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

Produsul PCR s-a 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 μL, H₂O - 1.5 μL și DNA Blunting Enzyme - 0.5 μL. 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 μl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/μl) și 0,5 μl 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 μL, H₂O - 70 μL, Produs de ligare - 10 μL. Celulele competente s-au scos de la -80°C și s-au dezghețat pe gheață. 100 μL 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 μL 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 μg/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 μL 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 deselexat *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.

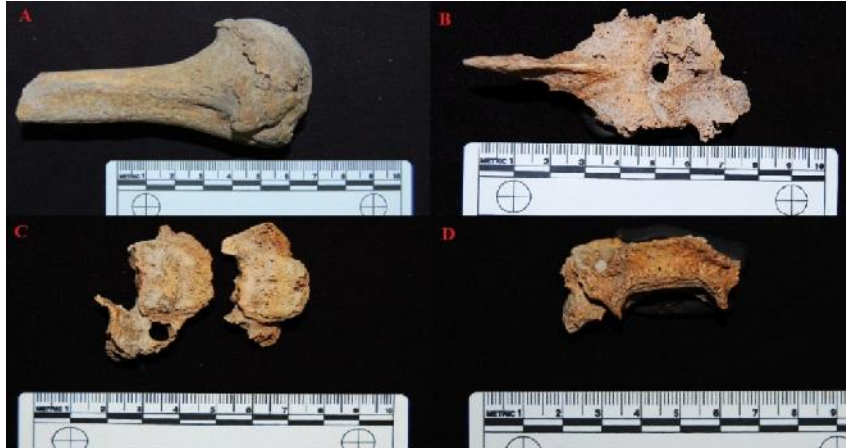


Figura 1. A. Epifiza proximală a humerusului stâng afectată de artroz; B. Apofizele spinuoase a două vertebre toracale sudate între ele; C. Platouri vertebrale afectate de artroz; D. Fața anterioară a unei vertebre cervicale afectată de artroz.

- 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).

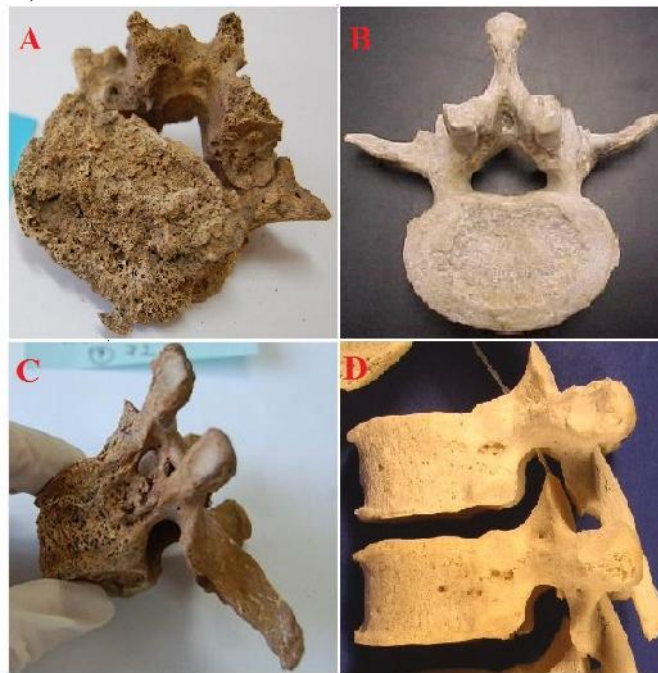


Figura 2. Probe din care s-a extras ADN pentru confirmarea diagnosticului de tuberculoză. A. Vertebra L5 cu platoul inferior distrus în comparație cu (B) o vertebră sănătoasă; C. Vertebre toracale sudate versus două vertebre dispuse anatomic.

- Individul M5
 - Reprezentarea. Din individul M5 se prelevează în mic număr 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 nuchală, 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.

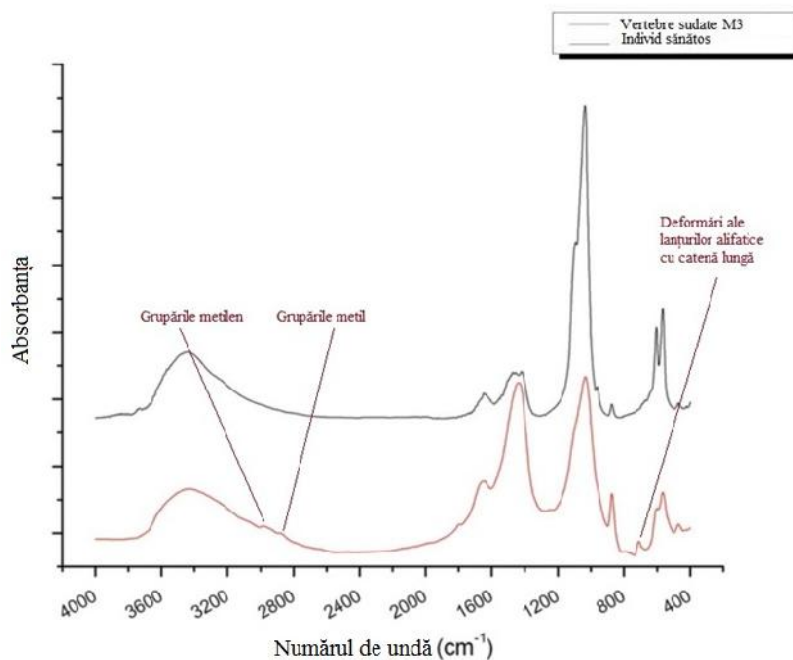


Figura 3. Spectrul FT-IR al unui individ s n tos versus M3, presupus a fi infectat cu MTBC.

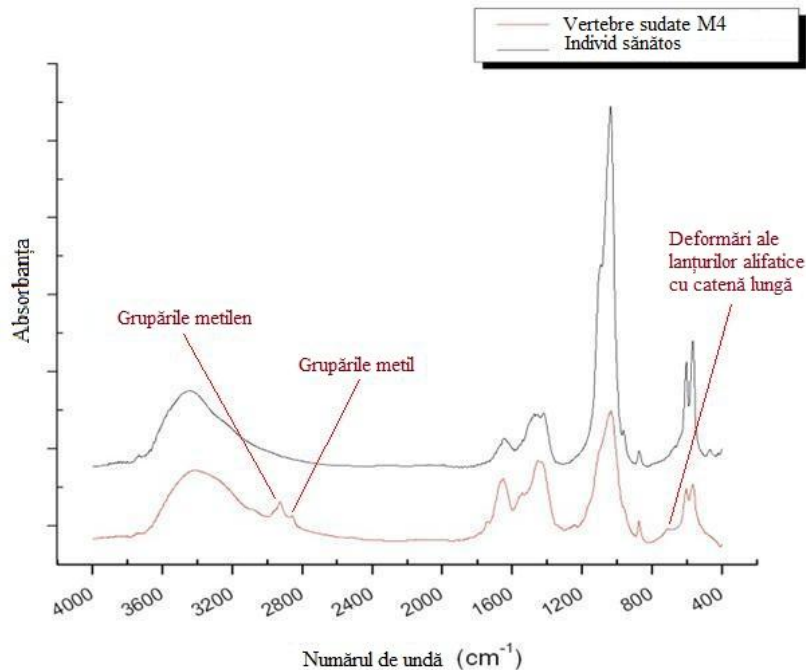


Figura 4. Spectrul FT-IR al unui individ sănătos versus M4, presupus a fi infectat cu MTBC.

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 absorbanțelor 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 colagen (C/C) este un alt indice care se poate calcula din spectrul FT-IR. Acesta reprezintă cantitatea de colagen prezent în matricea osoasă. Se calculează ca raportul dintre absorbanțele 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 colagen 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 μL apă PCR Grade, iar 8 μL au fost migrați în gel de agaroz 1,5% (Figura 5).

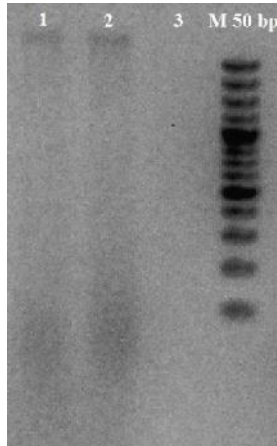


Figura 5. Electroforegrama obținută în urma migrației ADN-vechi extras din individul M4; 1. ADN extras dintr-o coastă; 2. ADN extras din vertebre sudate; 3. control negativ de extracție.

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 μL ADN-vechi la mixul de reacție, iar ca ADN matriță au pus ADN-modern. Ei au observat că acel 1 μL 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.

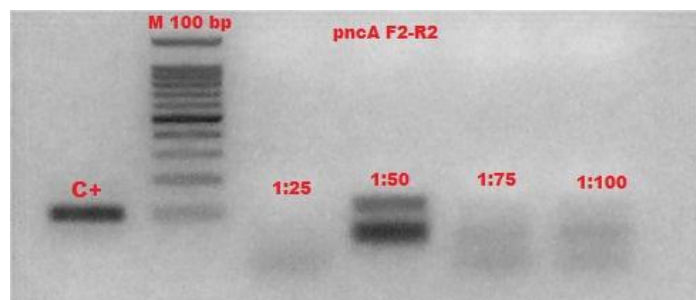


Figura 6. Amplificarea fragmentului de 117 pb din gena *pncA* cu amorsele F2-R2; se observă că diluția de 50x este suficientă pentru ca inhibiția datorată produșilor Maillard să fie depășită; se observă că diluția de 75x și 100x este prea mare, motiv pentru care ADN-matriță lipsește.

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.

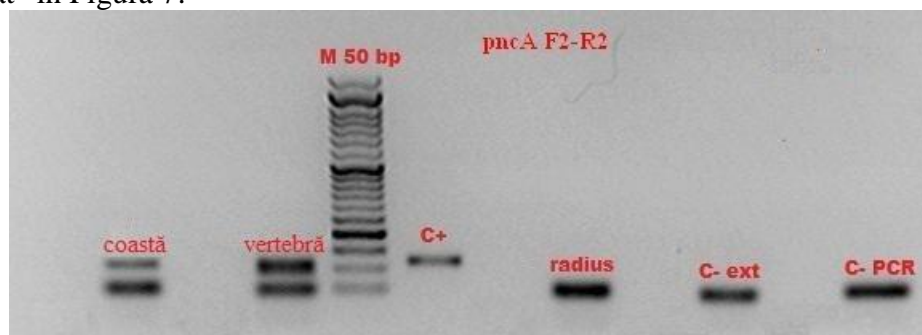


Figura 7. Produșii PCR amplificați cu amorsele *pncA* F2-R2 și cu ADN-matriță extras din individul M4; s-a obținut amplificare specifică doar din oase afectate de tuberculoză (coastă și vertebră); a fost testat și ADN extras din radius, dar nu s-a obținut amplificare; controalele de extracție și de PCR 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.

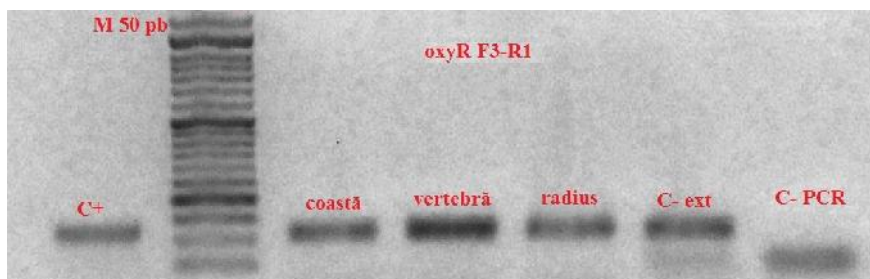


Figura 8. Electroforegrama produilor de PCR *oxyR* F3-R1 pentru individul M3; se observă cea mai bună amplificare a rezultat din ADN provenit din vertebra afectată diluat de 50x; există amplificare și în controlul de extracție, dar controlul de PCR este curat, ca urmare se exclude posibilitatea contaminării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

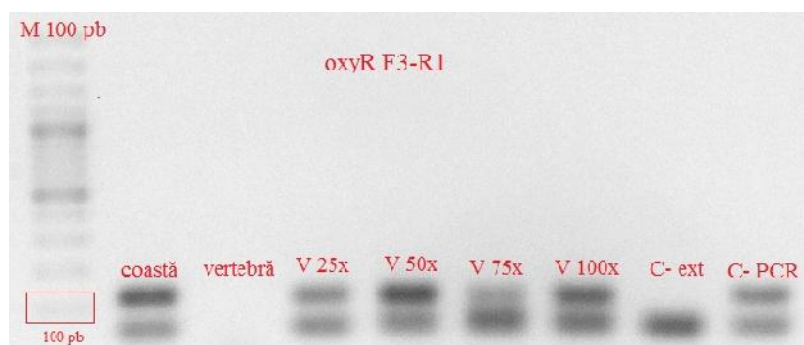


Figura 9. Electroforegrama produilor de PCR *oxyR* F3-R1 pentru individul M4; v - vertebră; s-a obținut amplificare specifică pentru probe din coastă, vertebre, dar și în controlul de PCR. Deoarece nu există amplificare în controlul de extracție, se consideră că nu a existat contaminare cu ADN-modern,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

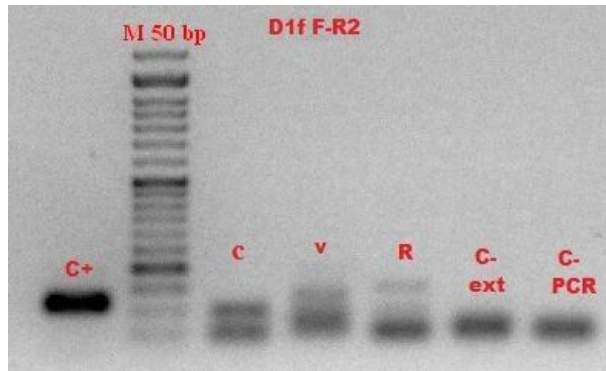


Figura 10. Electroforegrama ampliconilor D1f F-R2 pentru individul M3; c - coast , v - vertebr , r - radius; se observ c s-au obținut trei ampliconi de marimi diferite; fiecare bandă a fost purificată din gel, urmând a fi clonat ; controalele de extracție și de PCR sunt curate, de aceea se elimină posibilitatea 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-DINA, 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 US603, complete genome	38.5	38.5	66%	5.3	73%	G2003073.1
<input type="checkbox"/>	Tuber melanosporum Ve20 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 sensu stricto, CFM 2508 truncated pncA gene (pncA2) 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:anox250 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 bacteriophage phi-Beta-241-241-241, complete cds, strain JCM 1254	37.0	37.0	69%	1b	73%	AF142711.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis sensu stricto, Z2AR149 multiple drug resistant (MDR) clone, complete sequence	37.0	37.0	100%	15	68%	EU51180.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium eudimorphum Bv. 1103 (W32/2104), complete genome	37.0	37.0	42%	15	78%	G2001191.1
<input type="checkbox"/>	Rhizobium lotum bacteriophage phi-Beta-241-241-241, complete cds	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 (k=MEVLUHA-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).

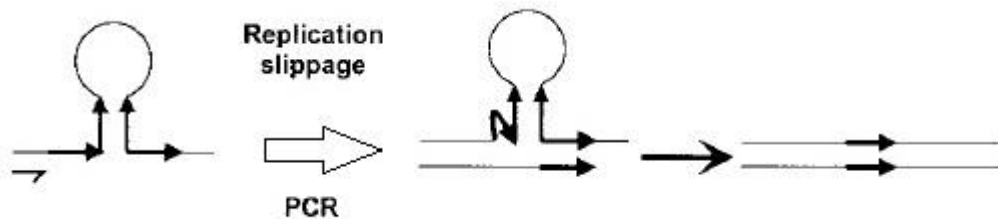


Figura 13. Reprezentarea schematic a modelului prin care *Taq*-polimeraza induce la locul de formare a unei bucle apariția unei deleții în molecula de ADN (după Viguera și colab., 2001)

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

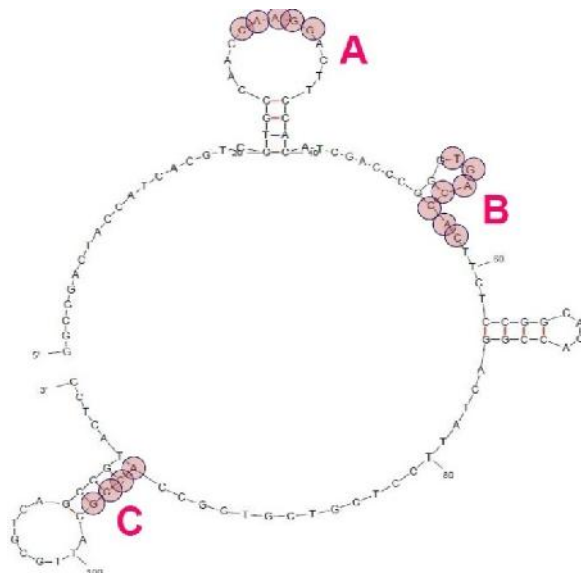


Figura 14. Modelarea 2D a fragmentul de 117 pb al genei *pncA* de la *M. tuberculosis* folosind aplicația *DNA Folding Form a The Mfold Web Server*.

Datorit divergenței observate în alinierea multiplă între secvențele de ADN-vechi i cele moderne, încadrarea secvențelor de ADN-vechi în MTBC are nevoie de dovezi suplimentare. Astfel s-a formulat ipoteza c dac 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 diagenzei și nu este datorată apartenenței lor la o specie diferit .

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 - parameter cu distribuție discret Gamma) cu cel mai mic scor BIC (Bayesian Information Criterion). Un scor BIC mic implic existența unui număr scăzut de variabile explicative necesare pentru justificarea datelor obținute (Baxevanis i Ouellette, 2001).

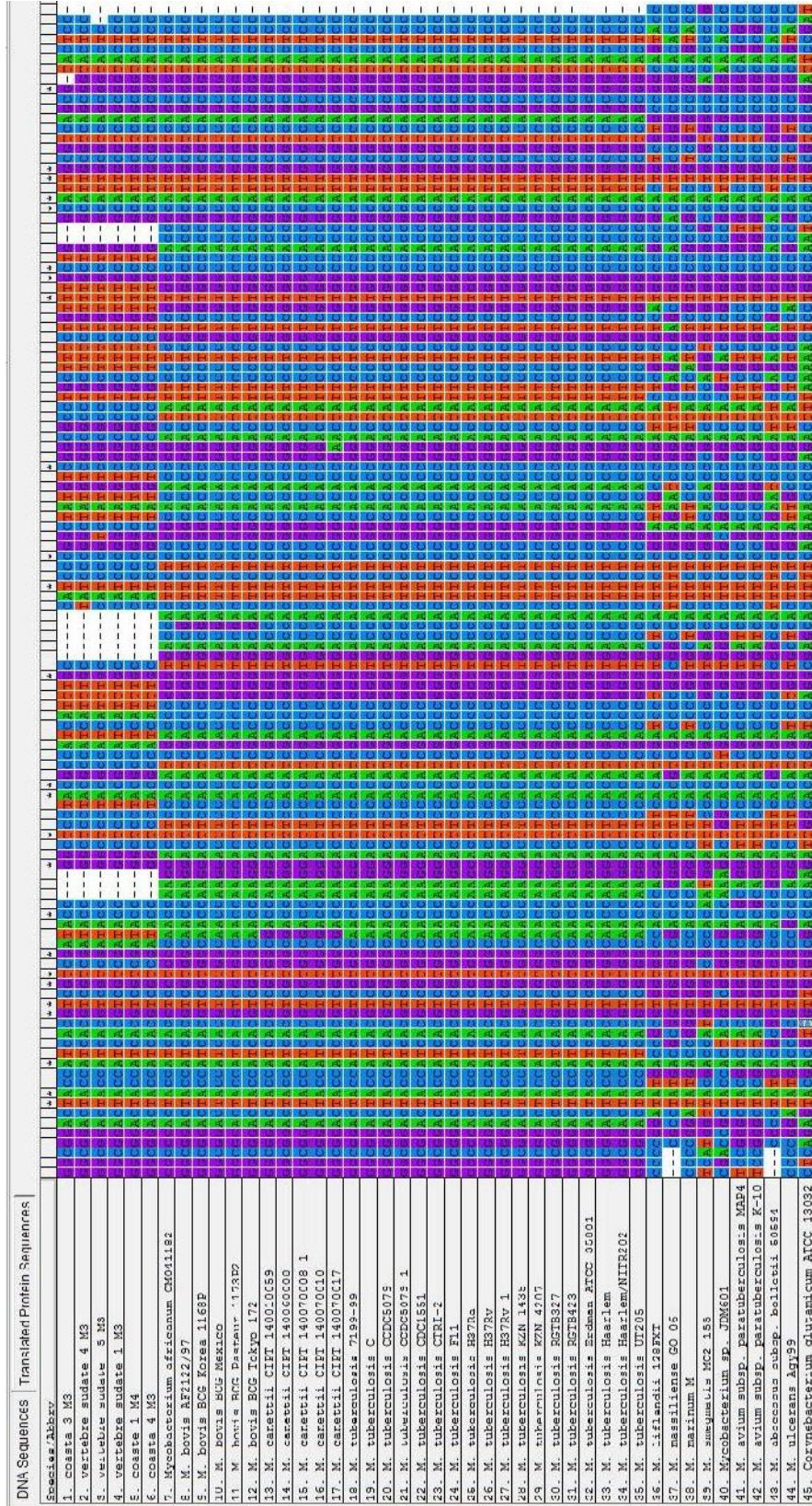


Figura 12. Alinierea multiplă a secvențelor *pncA* obținute de noi și a celor din baza de date ale genului *Mycobacterium*.

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 influența secvenței proteice. 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.

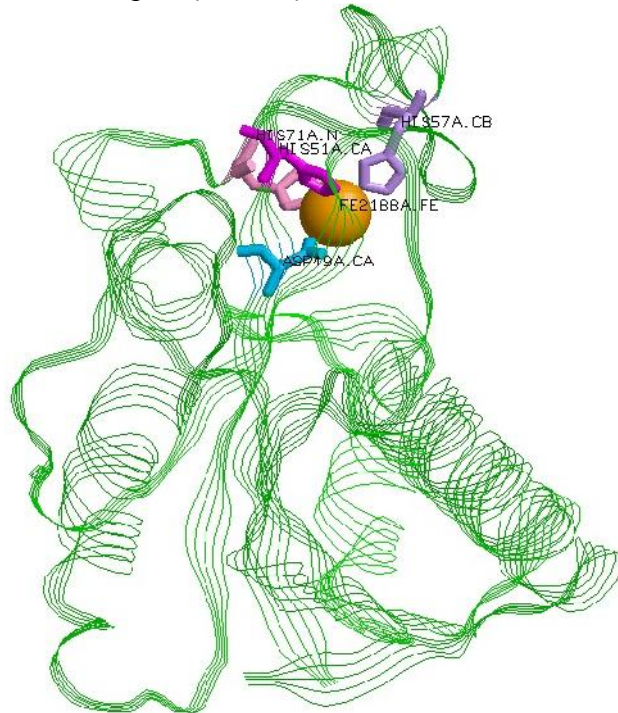


Figura 15. Structura 3D a pirazinamidazei de la *Mycobacterium tuberculosis* prelucrată în Rastop 2.2; se observă buzunarul catalitic și cei patru aminoacizi implicați în susținerea Fe^{2+} .

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 că 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.

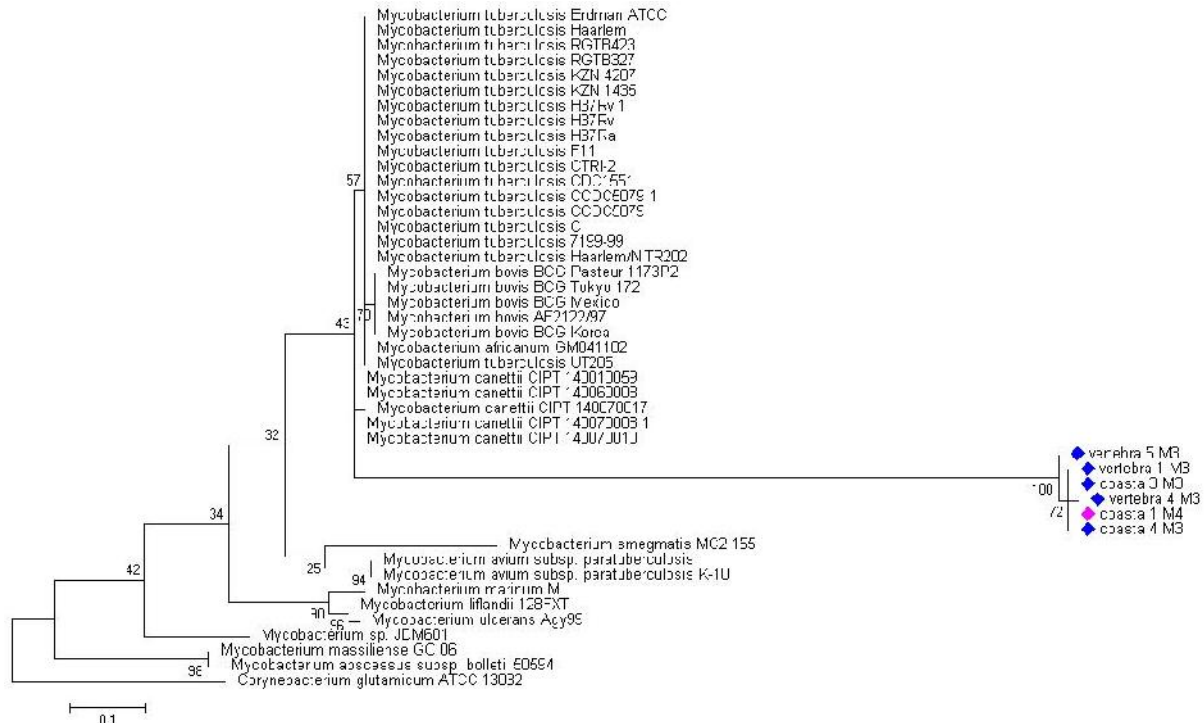


Figura 16. Arborele filogenetic realizat prin Maximul Likelihood: Bootstrap 100, modelul evolutiv Tamura 3 cu distribuție discretă Gamma, pozițiile cu gap-uri s-a eliminat din analiză.

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 catena 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 conchizi că divergența observată se datorează diagenezei și nu unei amplificări PCR nespecifice.

Pseudosena oxyR

La bacterii, *oxyR* codifică principala proteină reglatoare a răspunsului la stresul oxidativ, dar surprinzător, la speciile din MTBC această a fost inactivată. La *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium* proteina este un factor de transcriere cu rol în activarea transcrierii proteinelor implicate în răspunsul la stresul oxidativ, dar la speciile din MTBC secvența *oxyR* omoloagă conține numeroase deleții și inserții – frame shift mutations (Figura 17).

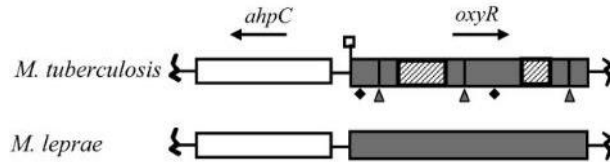


Figura 17. Organizarea genetică a regiunii *oxyR-ahpC* la *M. tuberculosis* comparativ cu *M. leprae*; segmentele în dungă - zone unde au avut loc deleții masive; triunghiurile - mutații care au schimbat cadrul direct de citire; romburi - inserții; p-tratamentul - mutație în codonul start (după Pagán-Ramos și colab., 2006).

Una dintre genele aflate sub controlul OxyR este *ahpC*, care codifică alchilhidroperoxid-reductaza, implicată în metabolizarea peroxidului de hidrogen și a acidului azotic (Springer și colab., 2001). S-a observat că la speciile care nu mai au gena *oxyR* funcțională, nivelul expresiei *ahpC* este foarte scăzut, dar nefiind complet inactivată, se presupune că ea ar avea un rol funcțional. Deoarece *oxyR* nu se mai exprimă în MTBC, și deci nu mai este supus selecției naturale, ea a putut acumula mutații și astfel, pe baza polimorfismului din poziția 285 a pseudogenei se poate face diferența dintre *M. tuberculosis* și *M. bovis* (Sreetvansan și colab., 1996). Noi am amplificat o porțiune adiacentă acestui SNP, cu amorcele F3-R1 prezentate în Tabelul 1, cu scopul de a obține un amplicon pe baza căruia să stabilim specia din MTBC care a cauzat boala.

După ce am purificat și clonat produsele de PCR, acestea au fost secvențiate. Secvențele obținute au fost comparate cu toate celelalte secvențe din baza de date GenBank (NCBI) și s-a obținut o similaritate de 99-100% cu secvența omologă modernă (Figura 18).

Figura 18. Alinierea multiplă a secvențelor *oxyR* de ADN-vechi și a fragmentului omolog de la *M. tuberculosis* CCDC5180 realizată în Mega 5.1 cu ClustalW.

Species/Abbrv	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1. CC2 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G													
2. CC3 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G																
3. CC4 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G																
4. CC6 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G																
5. VC1 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G																
6. VC2 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G																
7. VC3 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G																
8. VC4 pJET1.2E	CT	TC	GC	GA	AAT	CAG	TG	T	C	AC	CC	CC	A	G	CC	C	G	CC	G	T	C	A	C	G	C	A	C	T	G	C	A	C	A	C	G	G	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	C	G	G	T	G	T	G	G	C	A	G	C	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	G	G	T	C	G	T	A	G	G	C	A	G	T	G																

Secvențele au fost obținute până acum doar de la individul M3 și așa cum se observă în Figura 8, controlul negativ de PCR este curat, de aceea, deși similaritatea cu ADN-modernă este surprinzătoare, contaminarea este puțin probabilă. Aceasta demonstrează prezența lui *M. tuberculosis* în oasele cu remodelări asociate tuberculozei. Fragmentele obținute din M4, și observate în Figura 9, urmează să fi clonate și secvențiate.

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 conținând 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, acestea au fost curățate 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 conținând: 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 Fenol:Cloroform: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

uscă 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 50-70 μl 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 procesat 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)

Frâgm. 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).

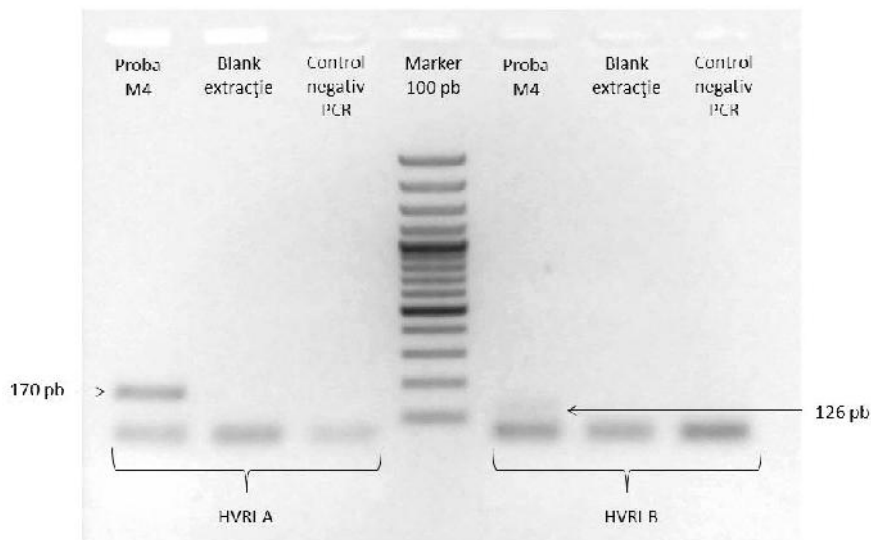


Fig. 1. Electroforeza în gel de agaroz

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 inserul 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 făcută. 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 rămășiile 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.

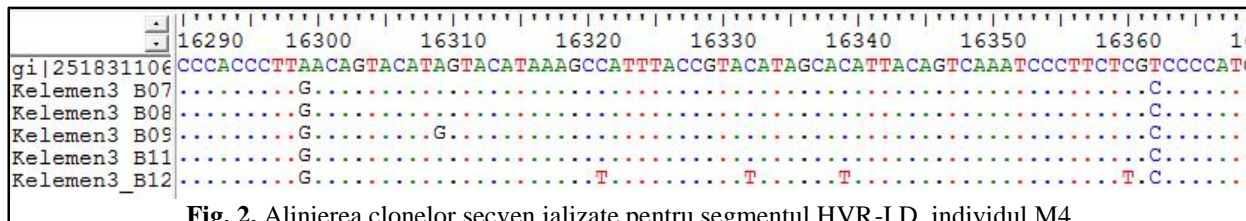


Fig. 2. Alinierea clonelor secvențializate pentru segmentul HVR-I D, individul M4

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 ce conține informația genetică mitocondrială 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 genetică a 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

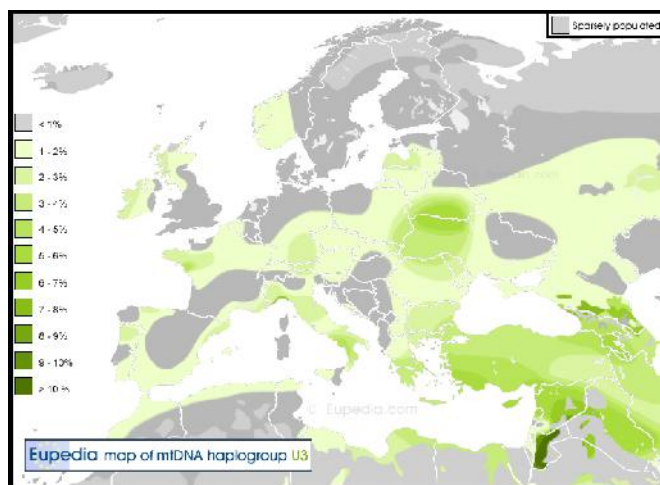


Fig. 3. Distribuția haplogrupului mitocondrial U3 în Europa, Orientul Apropiat și Nordul Africii (http://www.eupedia.com/europe/maps_mtdna_haplogroups.shtml#U3)

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.

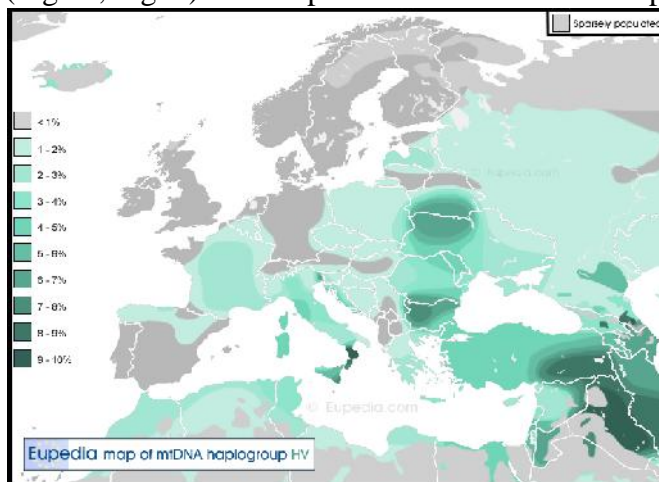


Fig. 4. Distribu ia haplogupului mitocondrial R0 (HV) în Europa, Orientul Apropiat i Nordul http://www.eupedia.com/europe/maps_mtdna_haplogroups.shtml#HV

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 infime 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. Aadar, 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).

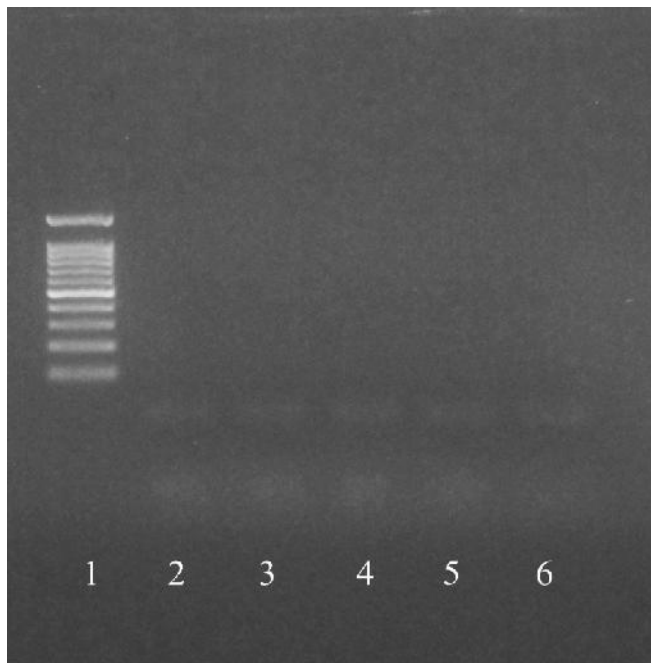


Figura 1. Gel de agaroz conținând produse PCR din probe extrase cu fenol-cloroform din individul I7 descoperit la Histria. Au fost utilizate amorsele propuse de Faerman. Godeuri: 1-marker 100pb, 2- amplificare ADN extras din os scurt, 3- amplificare ADN extras diafiza unui os lung, 4- amplificare ADN 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.

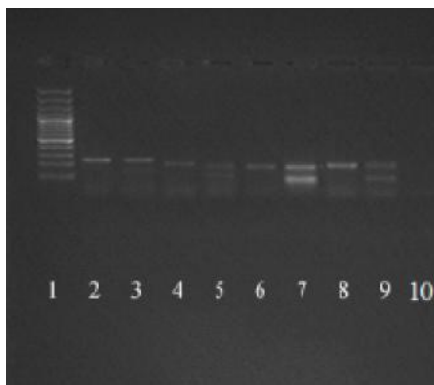


Figura 2. Gel de agaroz care ilustrează modalitatea de funcționare a amorselor nou concepute când ADN-ul modern este folosit ca matrice. Godeuri: 1. marker 100pb, 2. fragment de 243pb obținut prin amplificarea de ADN feminin (cromozom X), 3. fragmente de 243pb și 131pb obținut prin amplificarea de ADN 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.

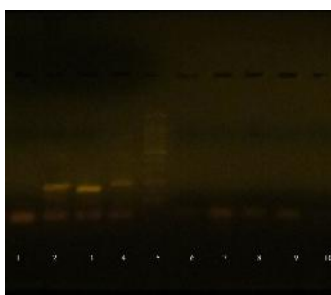


Figura 3. Gel de agaroz în care de găsim produse PCR obținute prin analiza ADN-ului extras din individul I3. Godeuri: 1. amplificarea probei utilizând amorsa NP_1, 2. amplificarea probei utilizând amorsa NP_2, 3. amplificarea probei utilizând amorsa NP_3, 4. amplificarea probei utilizând amorsa NP_4, 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 probe și controlul de extracție au fost înregistrate spectrofotometric (probe: 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

s aib dimensiuni comparabile cu cele ale fragmentelor scurte de 69 sau 92pb amplificabile de pe cromozomul Y. Astfel de segmente s-au ob inut în încercarea de determinare a sexului pentru individul I4, amplificarea dovedindu-se un e ec atunci când au fost analizate secven ele (Figura 5.).



Figura 4. Gel de agaroz care ilustreaz presupuii produ ii de PCR în cazul amplificării ADN-ului extras din individul I4. Godeuri: 1. marker 50pb, 2. amplificare ADN din prob utilizând amorsa NP_1, 3. amplificare ADN din controlul de extrac ie utilizând amorsa NP_1, 4. amplificare ADN din prob utilizând amorsa NP_2, 5. amplificare ADN din controlul de extrac ie utilizând amorsa NP_2, 6. amplificare ADN din prob utilizând amorsa NP_3, 7. amplificare ADN din controlul de extrac ie utilizând amorsa NP_3, 8. Amplificare ADN din prob utilizând amorsa NP_4, 9. amplificare ADN din controlul de extrac ie utilizând amorsa NP_4, 10. Control negativ de PCR. Reac ia de amplificare a fost realizat utilizândMangoTaq™ DNA Polymerase asociat cu aditivul PolyMate. Cantitatea de ADN extras i puritatea acestuia a fost înregistrat spectrofotometric (prob : conc ADN- 8.8, 260/280-1.6, 260/230-0.54; control de extrac ie: conc ADN- -0.7, 260/280- -0.91, 260/230- -0.9). Valorile indicelui 260/280, respectiv a celui 260/230 sunt comparabile cu valorile ob inute în extrac iile anterior men ionate, semnând prezen a inhibitorilor PCR. Totodat concentra ia de ADN înregistrat este mult mai sc zut . Absen a amplificării segmentului specific cromozomului X, folosit ca i control pozitiv în PCR-ul multiplex de determinare a sexului poate fi un indiciu c reac ia de amplificare nu a func ionat. Totu i este plauzibil i varianta ca doar segmentul specific cromozomului Y s fie amplificat având în vedere faptul c fragmentul intit este mai mic.

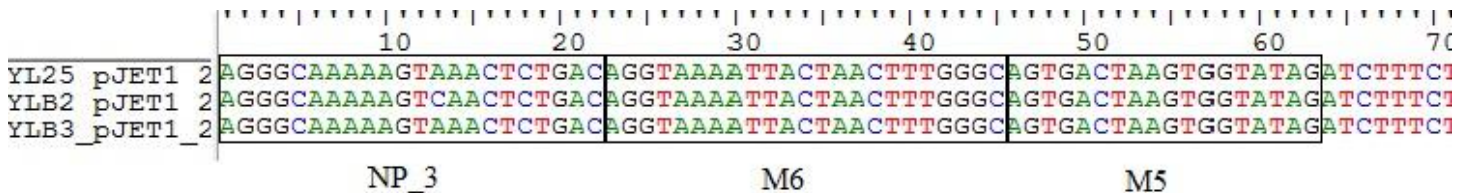


Figura 5. Analiza secven elor presupuse ca fiind fragmentele ob inute utilizând amorsa NP_3 caracteristice cromozomului Y pentru individul I4. Lungimea segmentelor se apropie de lungimea a teptat de 69pb, dar ele sunt de fapt dimeri ai amorselor folosite NP_3, M6 i M5.

Pentru a se evita situa ia analiz rii dimerilor în locul segmentelor scurte potrivite de altfel studiului ADN-ului vechi, pentru investigarea cromozomului Y se va folosi în continuare amorsa NP_1 care permite amplificarea segmentului cel mai lung de 131pb. Deoarece NP_1 ar conduce la amplificarea unui fragment de 243pb pe cromozomul X, sistemul multiplex de PCR nu va mai fi folosit. Amplific rile vor fi realizate în tuburi separate, pentru cromozomul X folosindu-se ca amors forward NP_3, a teptându-se s fie amplificat un fragment de 181pb.

În ceea ce prive te extrac ia cu coloane cu membran e de siliciu, s-a reu it amplificarea fragmentelor de interes în toate probele analizate (Figura 6.).

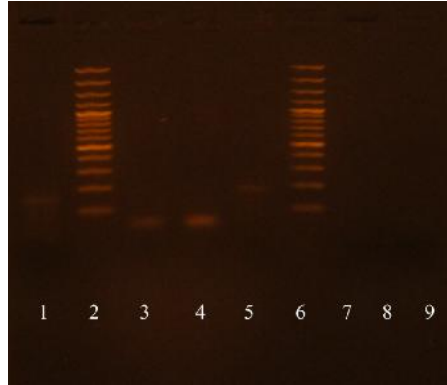


Figura 6. Gel de agaroz care conține produșii de PCR în cazul amplificării ADN-ului extras cu coloane cu membrană de siliciu din individul I8. Godeuri: 1. amplificare specifică cromozomului Y din probă, 2. marker 100pb, 3. amplificare specifică cromozomului Y din control de extracție, 4. control negativ 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 matriță mai bună în reacția de PCR.

Autentificarea rezultatelor presupune validarea secvențelor obținute ca fiind amplificate de pe matriță 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 secvențializat 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 matriță de ADN vechi prezentă în probă.

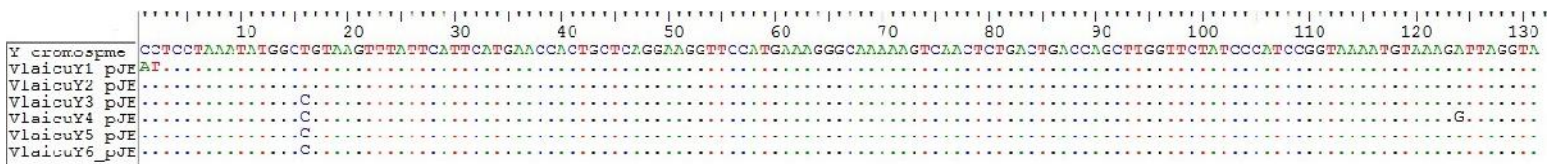


Figura 7. Alinierea secvențelor fragmentelor caracteristice cromozomului Y obținute în cazul individului I8.

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, MangoTaq™ 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 apare în cazul extracției cu coloane cu membrană de siliciu, cu siguranță îmbunătățirea cantității 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-Corcu 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 patologiei 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 apurinice 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 amorțelor

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 caucazieni. 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 maternă
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 ștelor 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: CATCCTCACCAAGTCAAGGCT	

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.

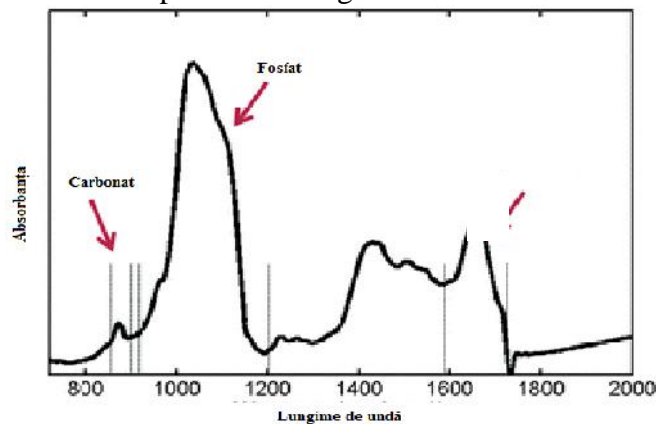


Fig.2. Spectru FT-IR tipic pentru os. (dup Kobrina et al., 2010)

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 urmat 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 făcut 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.

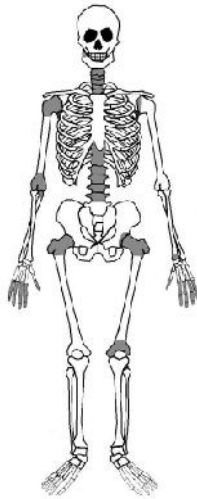


Fig.4. Distribuția proceselor degenerative

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

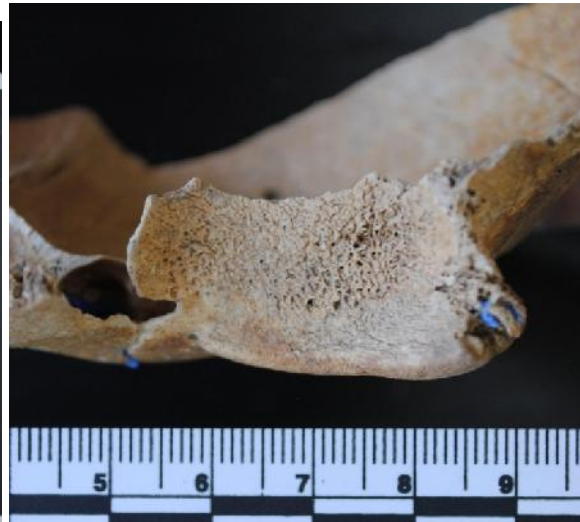


Fig. 6. *Cribra orbitalia*

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 calcaneu. 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 calcaneu

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

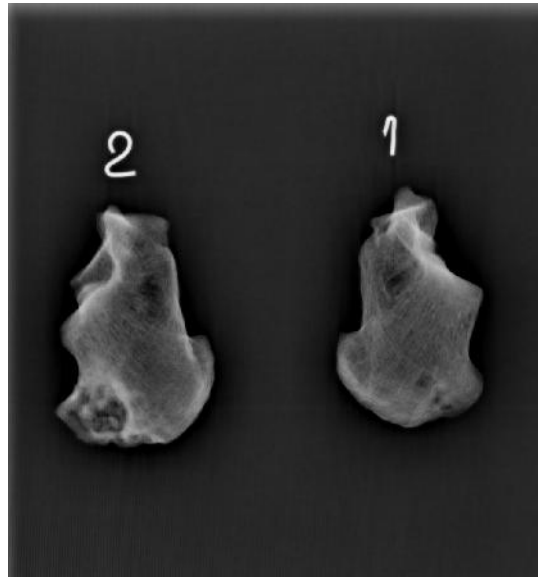


Fig. 8. Radiografiile cu raze X ale oaselor calcaneee.

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.

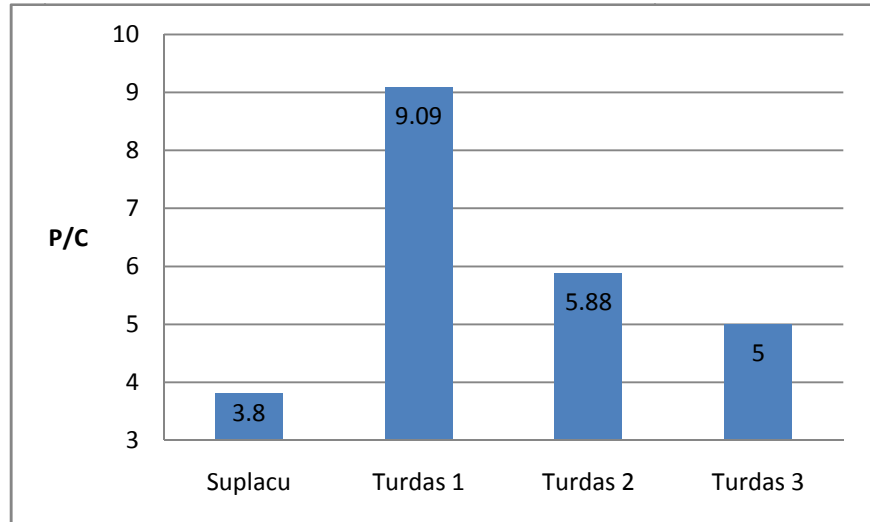
Spectroscopie în infraro u cu transformat Fourier (FT-IR)

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

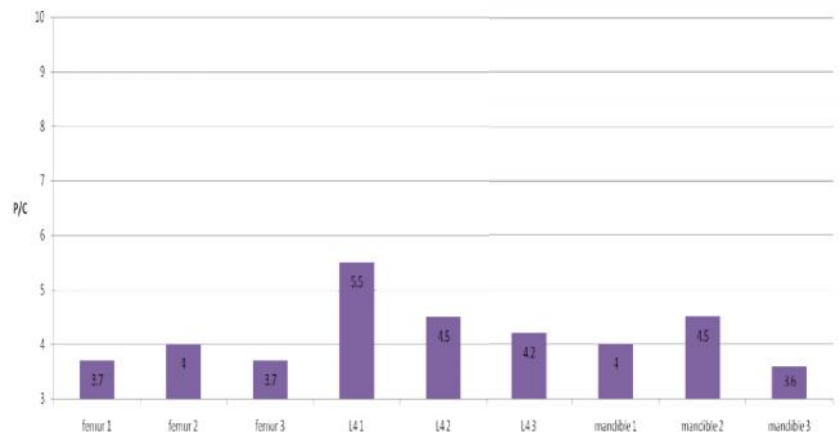


Grafic 1. Comparația raportului fosfat/carbonat între individul de la Suplacu și indivizii aparent sănătoși.

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).

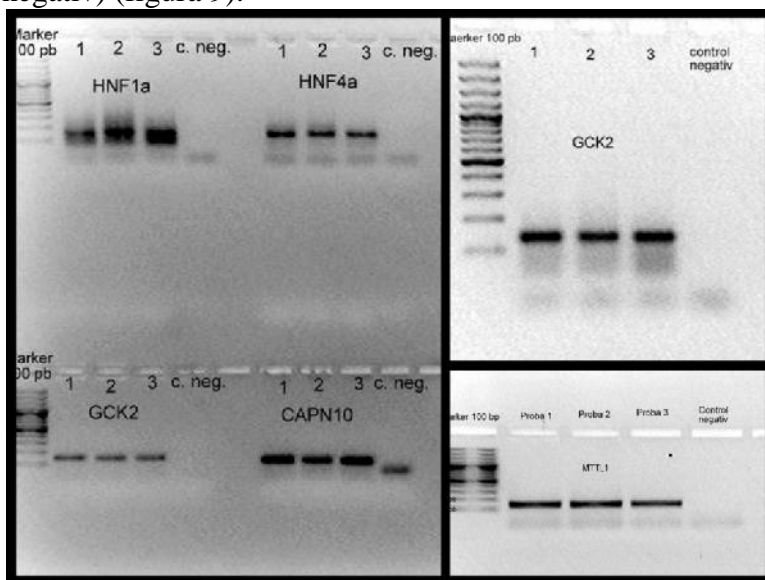


Fig. 9. Testarea amorselor cu ADN modern.

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

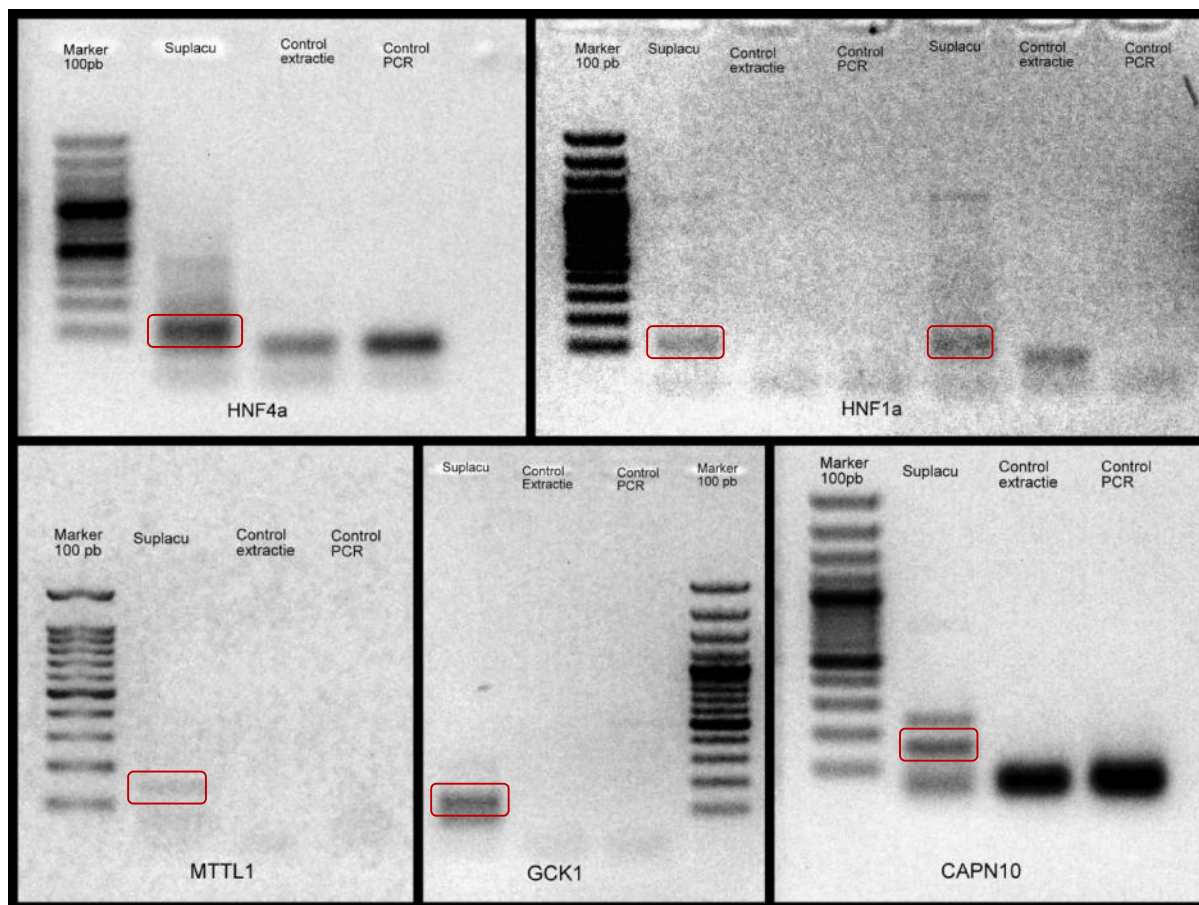


Fig. 10. PCR cu ADN vechi.

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 acelei 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).

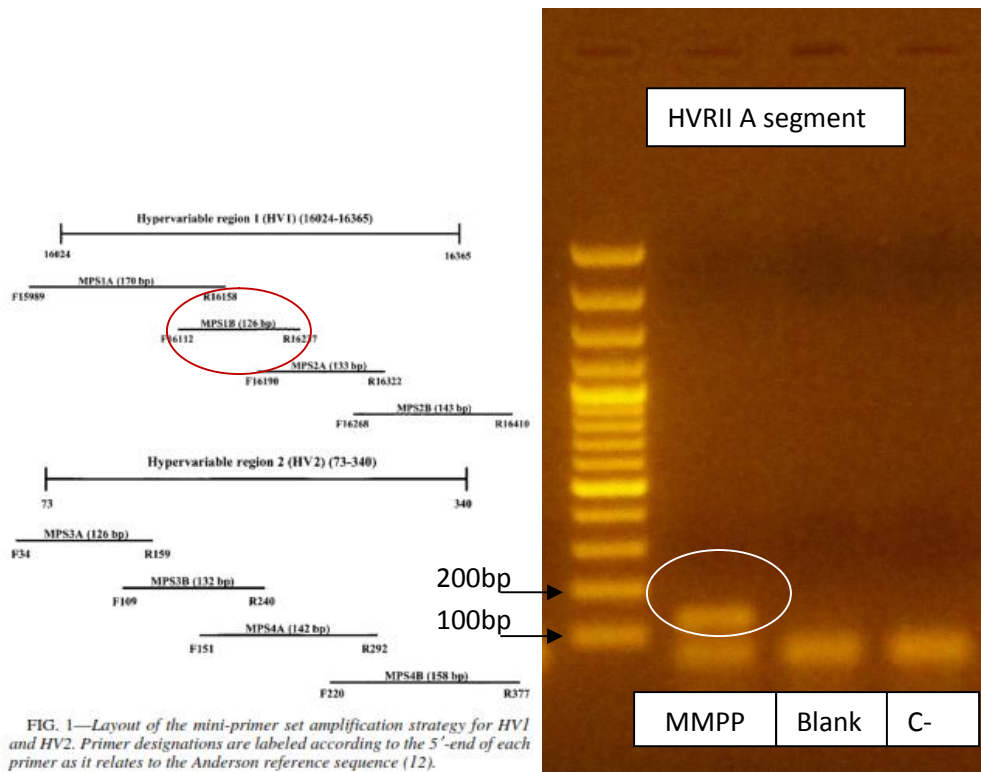


Figura 2. Amorsele Gabriel et al, 2002 i exemplu de rezultat al amplificării pentru fragmentul HVRIIA.

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).

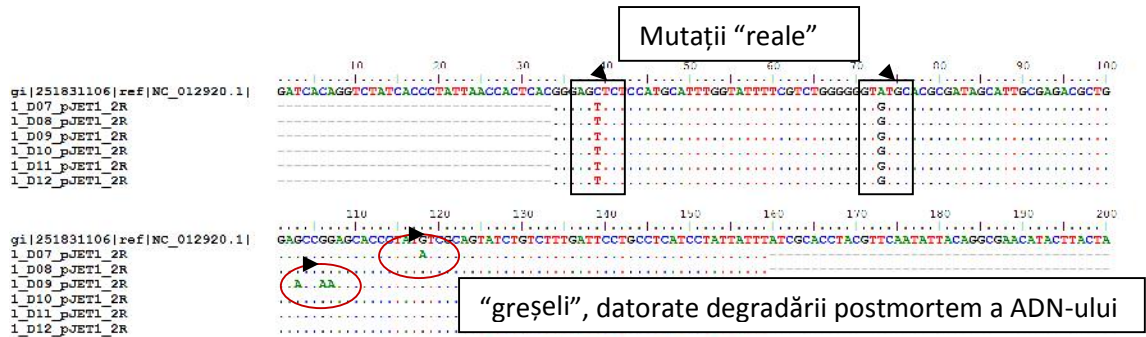


Figure 3. Example of multiple alignment of HVRII clones versus rCRS

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).

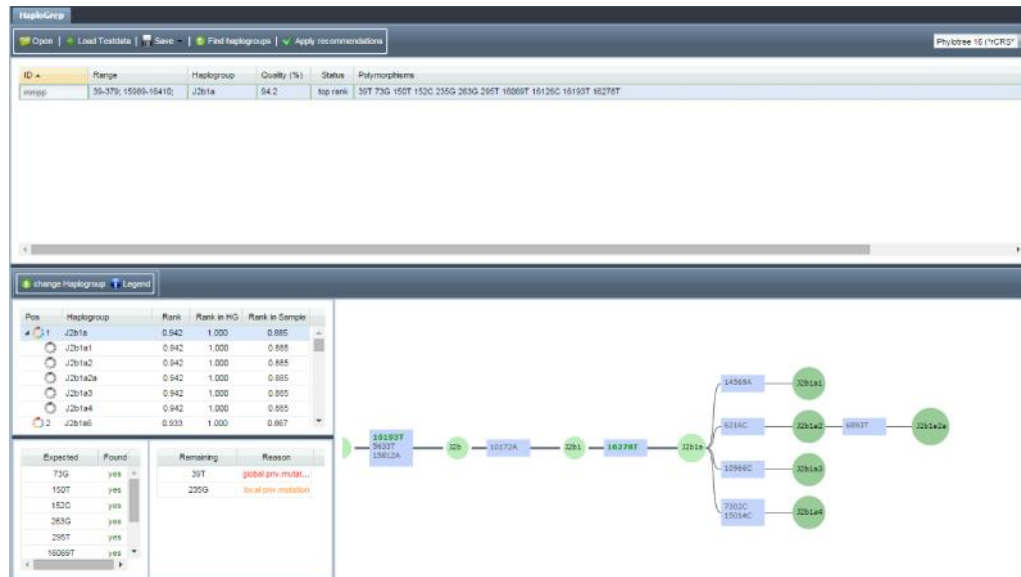


Figura 4. Predicția haplogrupului în platform Haplogrep.

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 populaționale 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).

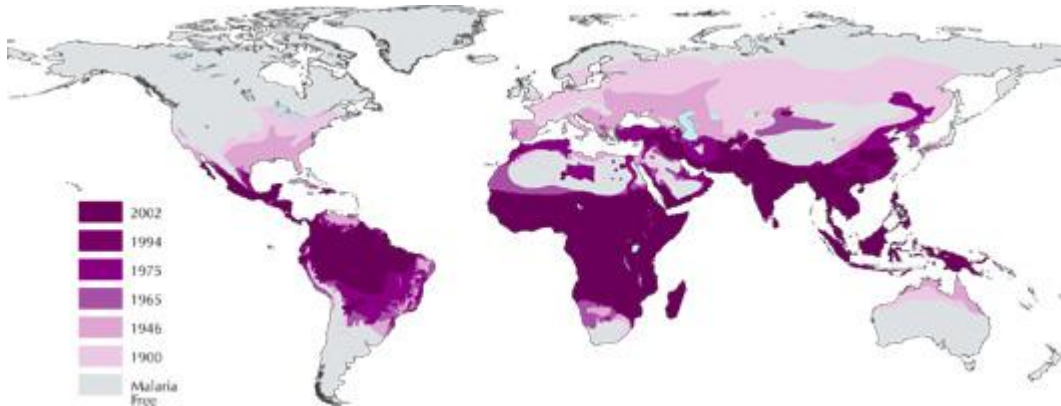


Figura 5. Harta incidenței malariei în perioada 1900-2002 (https://www.koshland-science-museum.org/sites/all/exhibits/exhib_infectious/malaria_vector_control_05.jsp).

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).

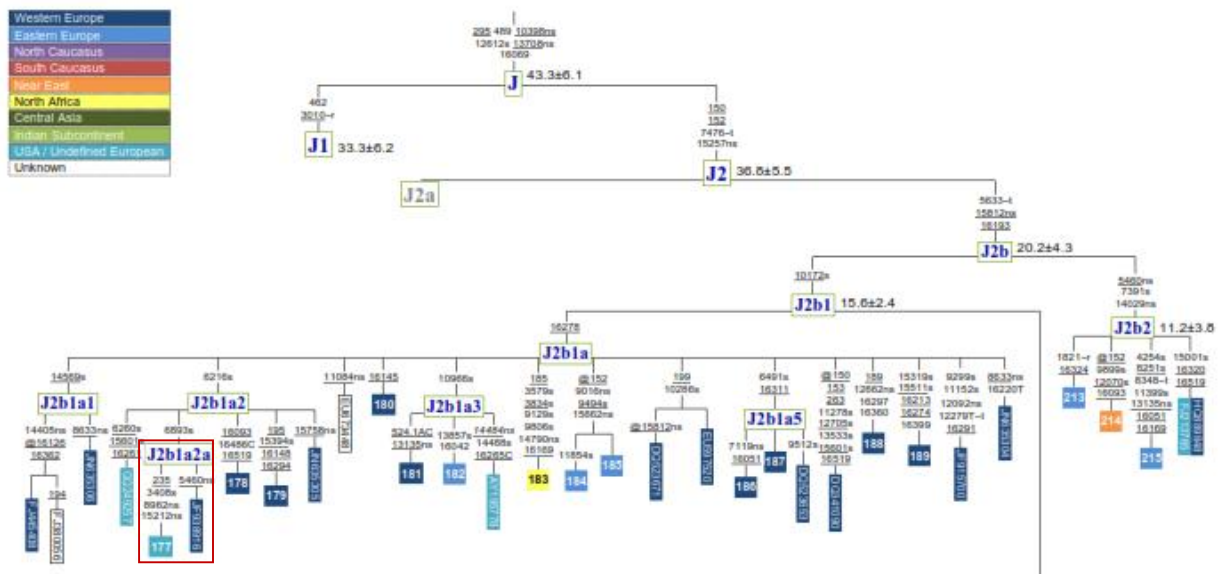


Figura 6. Arbore MP pentru haplogrupul J2 publicat de Pala et al (2012). Sunt marcați cei doi indivizi similari genetic cu MMPP.

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 (diafiză 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 inferiori.

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 % (Tabel 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 voită a scheletului; la nivelul apofizelor spinose 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 putut spune 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

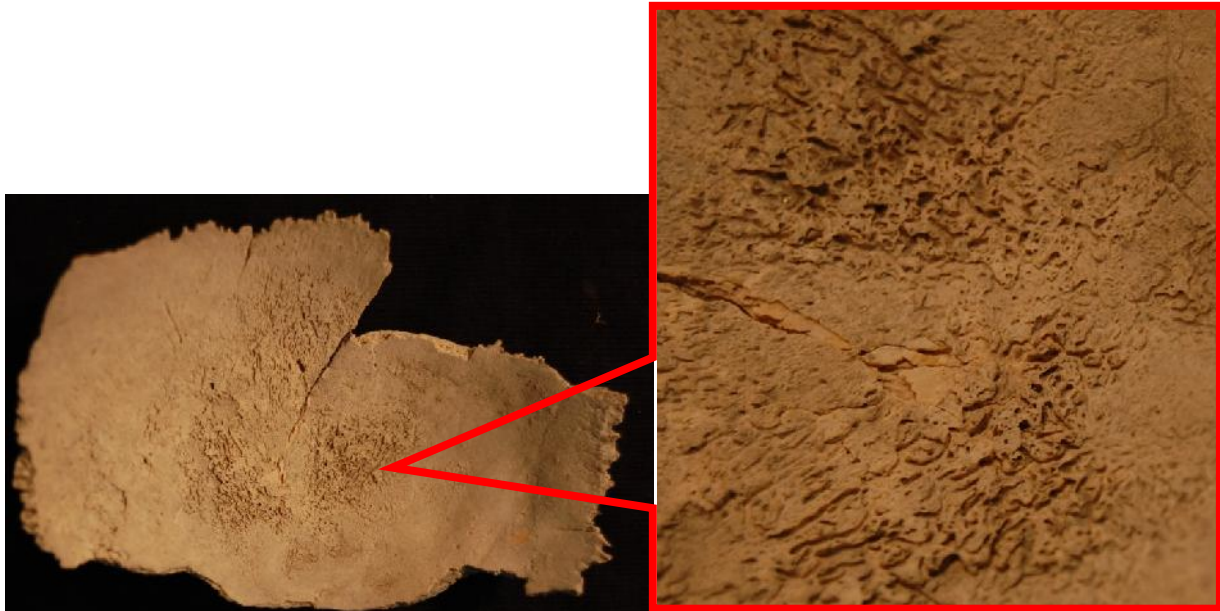


Fig. 1. Individul M13A. „Hair-on-end lesions” pe suprafața endocraniană.

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).

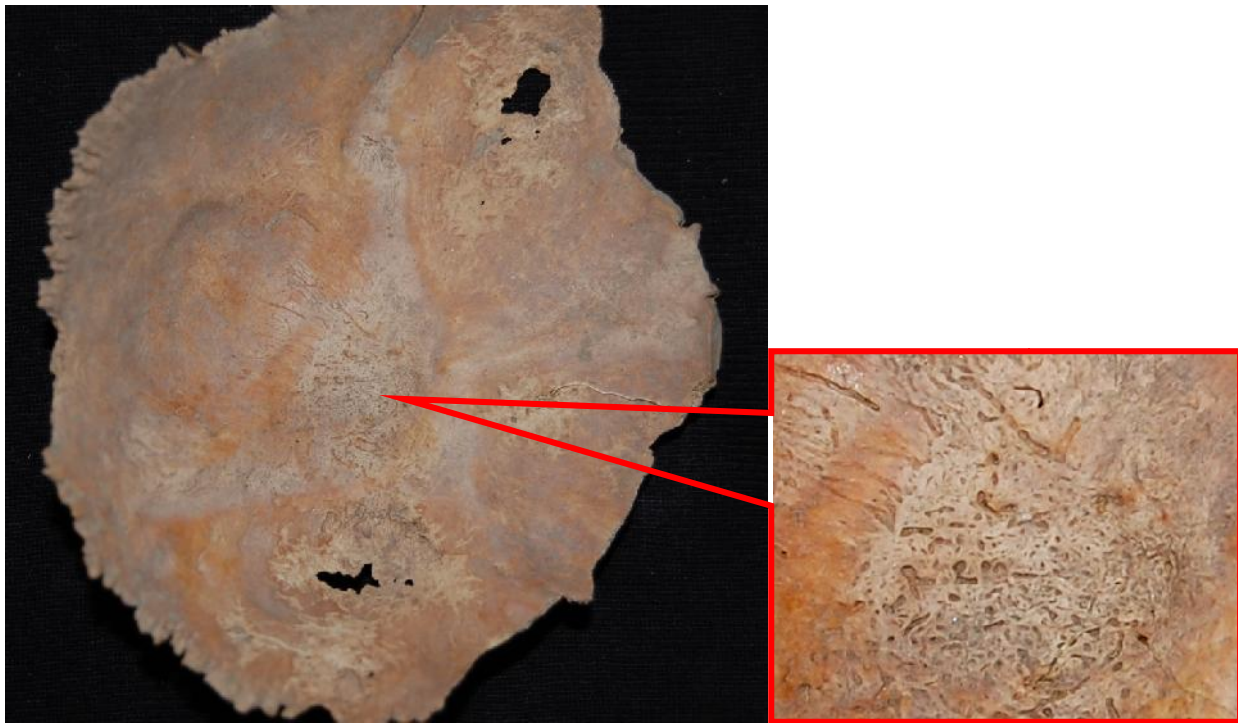


Fig. 5. Individul M14. Leziuni endocraniene (cu detaliu).

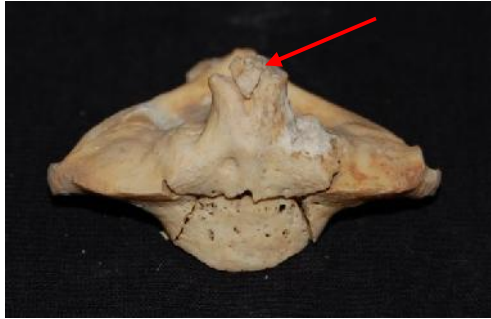


Fig. 6. Individul M15A. Axis.



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).

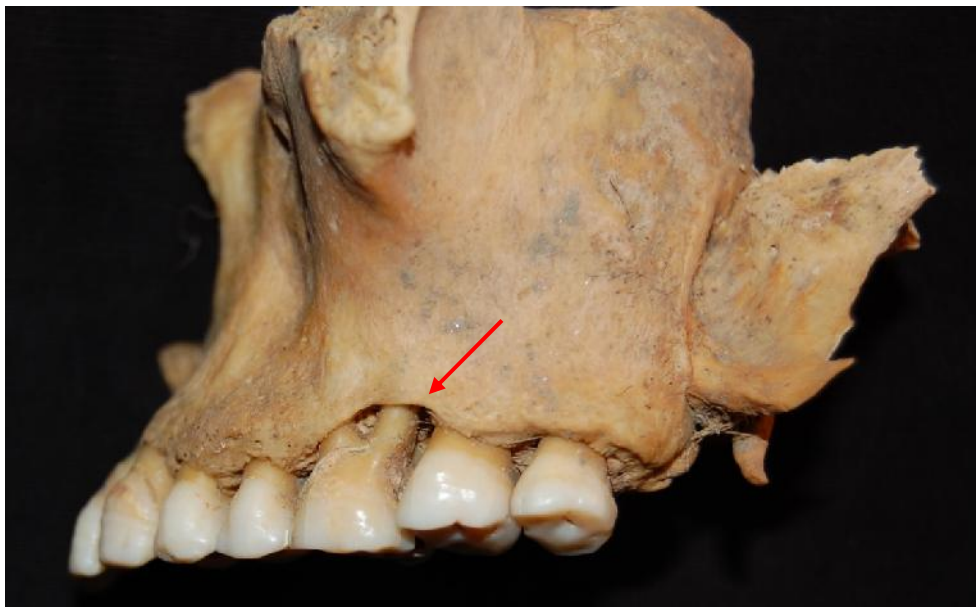


Fig. 9. Individul M17. Abces dentar (s geat) pe maxilar în zona primului molar.

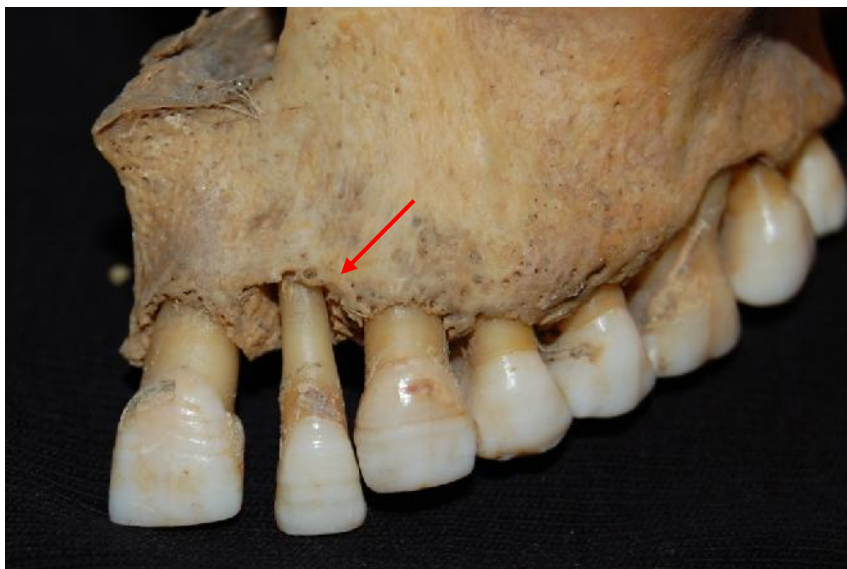


Fig. 10. Individul M17. Jum tatea stâng a maxilarului. Se observ periodontita avansat (s geat) și liniile hipoplazice pe smalțul dinților (detaliu mai jos).

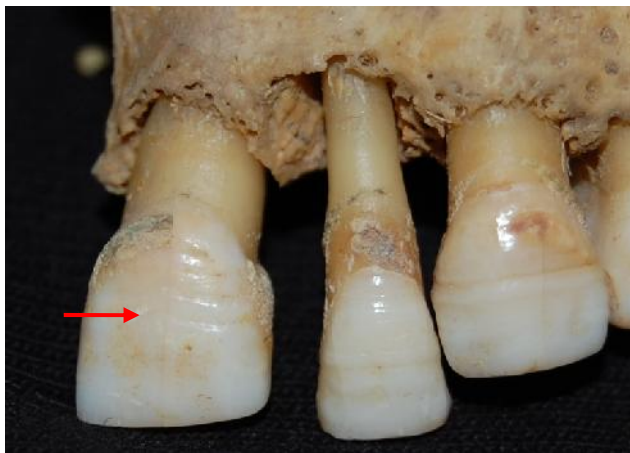


Fig. 11. (detaliu)



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 spălare.



Fig. 2. Craniul individului M1 înainte de spălare. Lângă mandibulă se observă diafiza unui humerus (în secțiune).



Fig. 3. Hiperostoz porotic pe craniul individului M1.

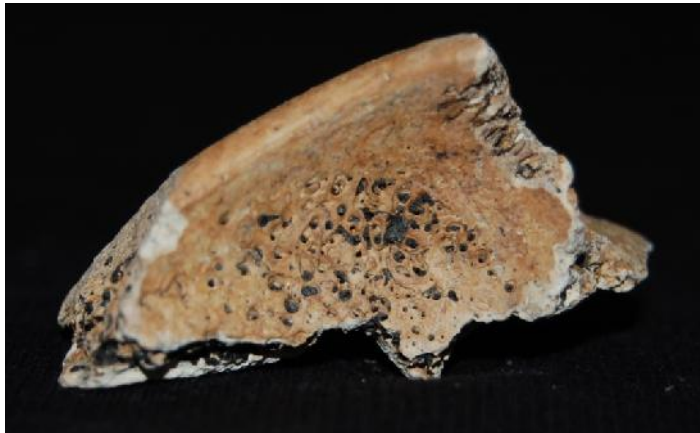


Fig. 4. *Cribră orbitalia* (individul M1).



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).

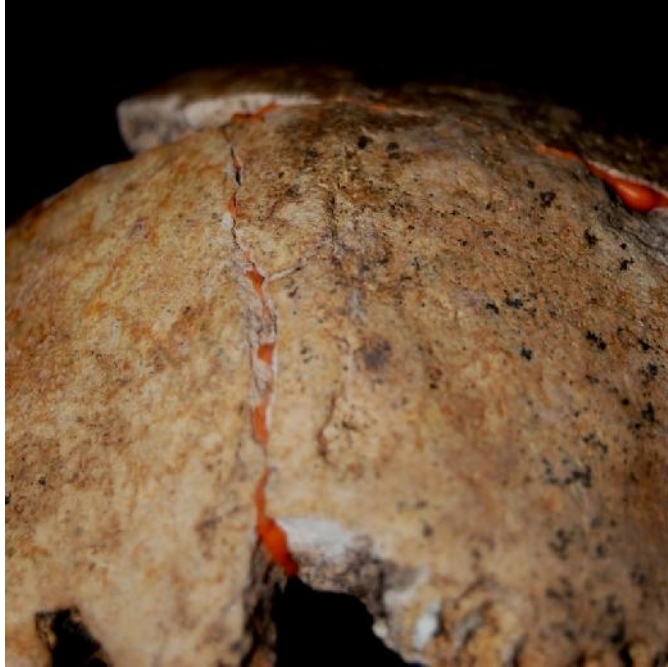


Fig. 8. Detaliu cu fractura radial de pe parietalul stâng al individului M2.

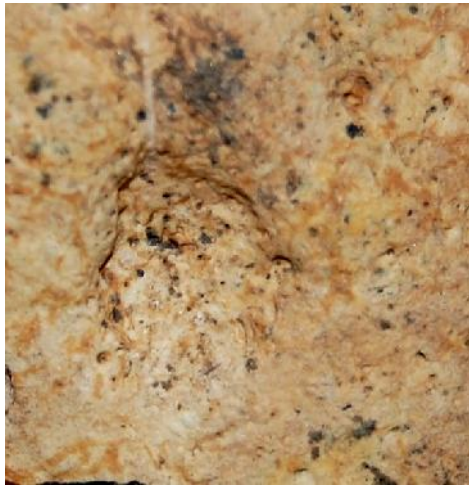


Fig. 9. Detaliu cu trauma circular identificat pe parietalul stâng al individului M2.



Fig. 10. Occipitalul individului M2. Se observă creasta nuchală 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 (_i) 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).

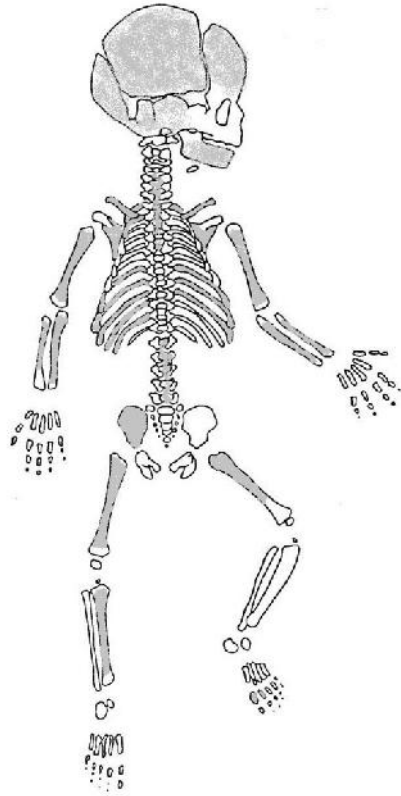


Fig. 2. Starea de reprezentare a scheletului (cu gri sunt colorate oasele prezente iar cu alb cele absente).

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, arcul ventral, arcul 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 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 (SM_1). 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 mari toraci sunt necesare nu s-au păstrat întregește. 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 (încluzându-se mai observabile 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 (SM_1). 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 fără 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.

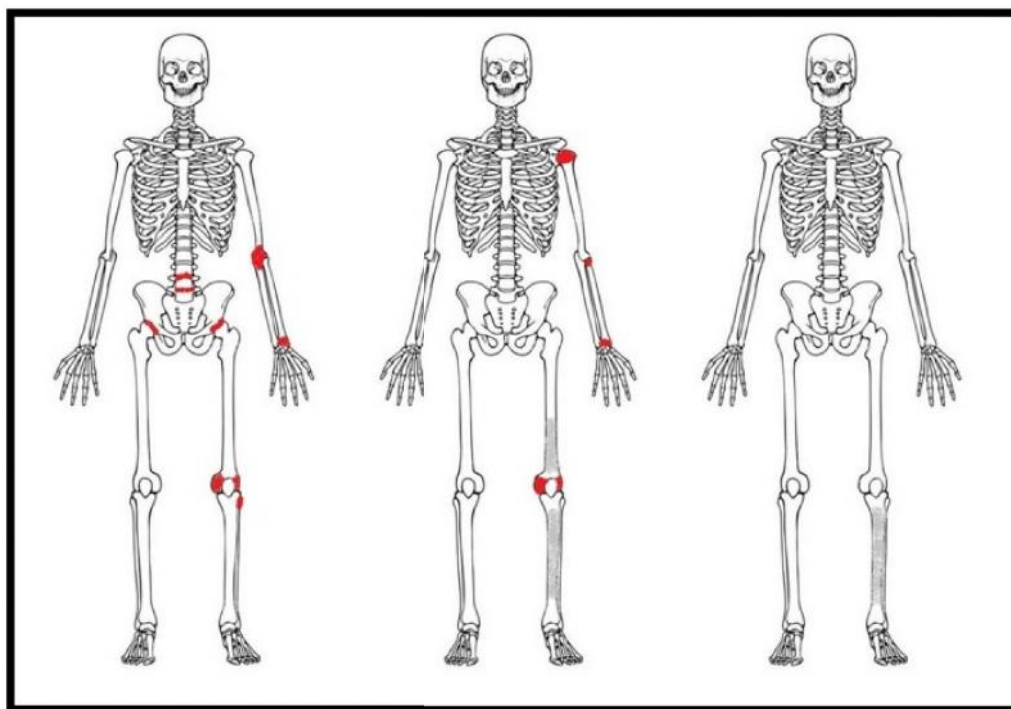
³Numerele reprezintă articulațiile afectate iar în paranteză este dat numărul total al articulațiilor observabile.

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-specifici 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, ase 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 streza 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 pe baza 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 mân 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 nicio 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 mică. 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

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

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

Rezumat

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

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

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

Obiective propuse

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

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

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

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

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

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

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

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

Situri arheologice și necropole investigate:

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

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

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

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

Echipe P2 – Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași

Lotul investigat de echipa 2 este reprezentat de 8 schelete.

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

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

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

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

Markerii moleculari investigați în cadrul acestui studiu sunt:

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

Alegerea acestora se datorează:

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

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

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

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

Investigații moleculare (aspecte metodologice):

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

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

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



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

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

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

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

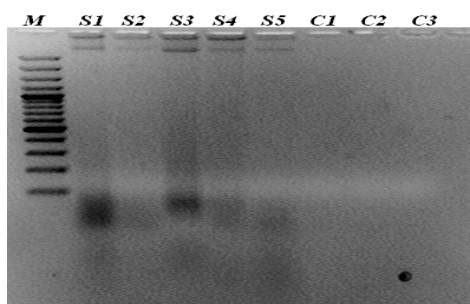


Figura 2. Verificarea cantității și calității ADN-ului vechi extras pe gel de agaroză.

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

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

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

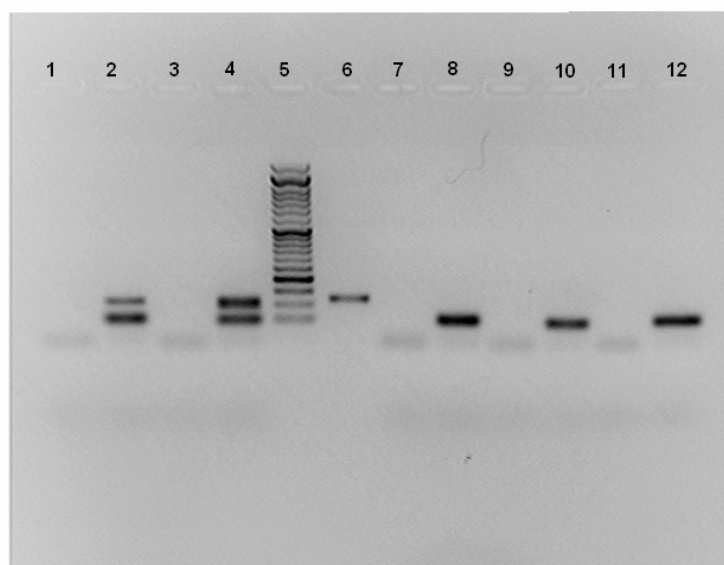


Figura 3. Amplificare pncA la individul M3 Gherăseni (presupusă infecție cu *Micobacterium tuberculosis*)

Individul testat: Gherăseni M3.

ADN a fost amplificat prin tehnica PCR folosind amorsele pncA F2 și pncA R2 (gena pentru pirazinamidaza / nicotinamidaza). Am folosit 3μl ADN genomic. S-au realizat 2 reacții succesive. În primul amestec de reacție s-a adăugat 1mg/ml BSA. În a doua reacție s-a adăugat 1μl din produsul primei reacții. S-a folosit polimeraza MangoTaq (Bioline) 1unitate/reacție și MgCl₂ 2mM. Fragmentul amplificat are 117 pb.

Program PCR:

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

72°C - 10 min

4°C - ∞

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

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

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

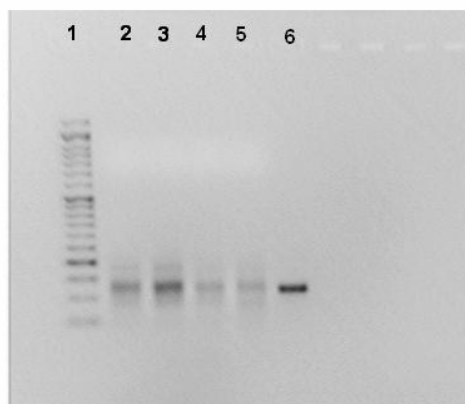


Figura 4. Amplificare pncA la individul M4 Gherăseni (presupusă infecție cu *Micobacterium tuberculosis*) – optimizarea metodei

Individul testat: Gherăseni M4 (optimizare metodă)

PCR folosind amorsele pncA F2 - pncA R2. Am încercat 2 amestecuri cu MgCl₂ de 1mM și 1,5mM. Am folosit ADN extras dintr-o coastă ce prezenta leziuni tipice tuberculozei. S-au folosit 1μl respectiv 1μl diluat de 10X de ADN genomic (s-a realizat anterior un alt PCR cu aceleași amorse, iar banda corespunzătoare controlului pozitiv a fost purificată din gelul de agaroză). S-a folosit polimeraza MangoTaq (Bioline) 1unitate/reacție. Fragmentul amplificat are 117 pb.

Program PCR:

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

} 30X

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

1. Marker 50 pb
2. MgCl₂ 1,5mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl diluat de 10X
3. MgCl₂ 1,5mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl nediluat
4. MgCl₂ 1mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl diluat de 10X
5. MgCl₂ 1mM, ADN genomic extras din coastă, 1μl nediluat
6. Control negativ de PCR

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

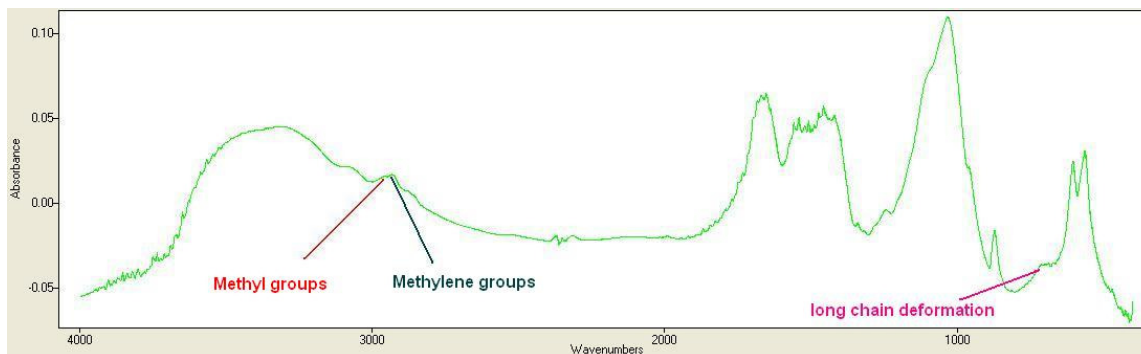


Figura 5. Utilizarea spectroscopiei IR (FTIR) pentru identificarea probelor cu anumite patologii – în acest caz tuberculoza) – se observă semnalul pentru grupările metil și metilen, absente în probele fără patologii.

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

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

GCK (Glucokinaza) → MODY 2

Forward: CACATCCTAGCCTGCTTCCC
 Reverse: TGGTCACCATGACAACCACA
 Product length: 132

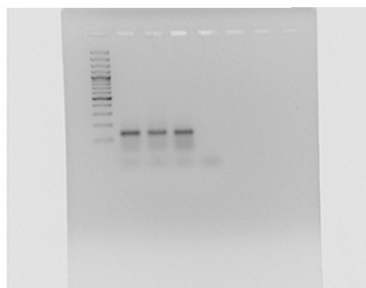


Figura 6. Teste amorse GCK (Glucokinaza) – probe moderne

HNF1A (hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A) → MODY3

Forward CCCTGTGGCAGCCGAG
 Reverse TTCTCCAGCCAGGAGGTAGG
 Product length 141

HNF4A →MODY1

Forward CCGTGGGGAACAAGGATGTAA
Reverse TAGAGTCAGGAGATCAGGCC
Product length 131

CAPN10 (Calpain 10) →Insulin resistance

Forward ACACCGGATGCCAGAGAGTT
Reverse CATCCTACCAAGTCAAGGCT
Product length 111

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

Forward TTATACCCACACCCACCCAAG
Reverse GGTACAATGAGGAGTAGGAGGT
Product length 143

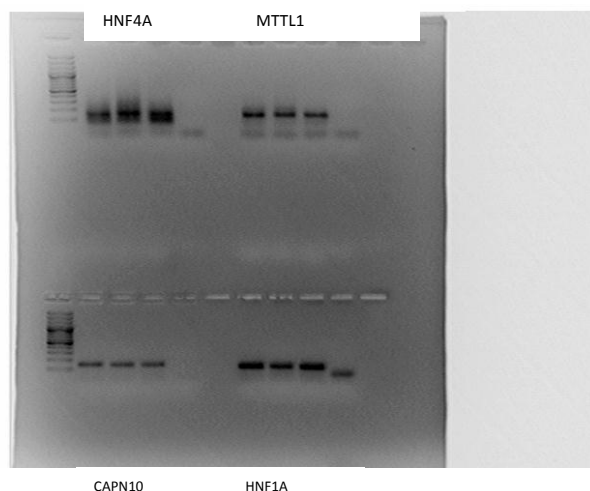


Figura 7. Teste amorse loci HNF4A, MTTL1, CAPN10, HNF1A – probe moderne

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

Obiective:

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

Plan de lucru:

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

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

Stadiu actual al studiului:

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

D. Datarea probelor cu radiocarbon

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

E. Analize de izotopi stabili C și N

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

Participări conferințe:

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

Alte conferințe la care participarea a fost acceptată

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

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

Organizare workshop:

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

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

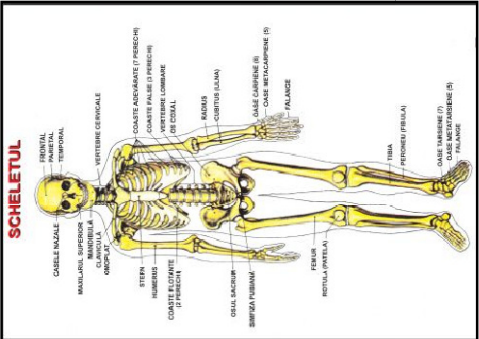
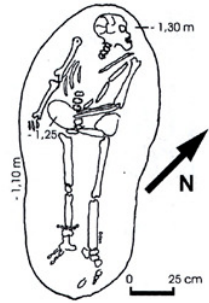

Deplasările membrilor echipei proiectului în țară și străinătate au vizat documentarea în instituții cu activitate recunoscută în domeniul de activitate al proiectului, stabilirea de contacte internaționale, identificarea unor potențiale loturi populaționale cu conexiuni cu populațiile aflate deja în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

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

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

Anexa 1 Analize de Antropologie Fizică

a) Fișa de preluare a scheletului uman (model)

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

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

PROTOCOLUL DE LUCRU AL LABORATORULUI DE ANTROPOLOGIE FIZICĂ

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

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

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

CLUJ-NAPOCA
2013

CUPRINS

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

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

Anexa 2 – Protocol optimizat de extracție ADN vechi

Extracția aDNA din oase umane și animale

1. PROTOCOL PCI

1. Tampon pentru decalcifiere și digestie:

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

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

2. Soluții stoc:

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

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

- se corectează pH-ul la 8 cu *HCl*;

- se autoclavează.

3. Soluție *NaOH* 10N (100ml):

- se cântăresc 40g *NaOH*

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

- se aduce volumul la 100ml;

- nu se autoclavează.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Material:

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

Protocol:

Incubare la 56°C peste noapte

Centrifugare 6000xg – 5 min (transfer supernatant)

Supernatant + 1 volum PCI (vortex)

Centrifugare 6000xg – 15 min (transfer faza superioară)

Faza superioară + 1 volum PCI (vortex)

Centrifugare 6000xg – 15 min (transfer faza superioară)

Faza superioară + 1 volum C (vortex)

Centrifugare 6000xg – 15 min (transfer faza superioară)

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

Incubare 3°C 30 min

Centrifugare 12000xg – 15 min

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

Centrifugare 12000xg – 15 min

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

Centrifugare 12000xg – 15 min

Uscare pelet la temperatura camerei 37°C 12 min

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

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

Listă participanți

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

Materiale de prezentare oferite participanților



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

contact

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

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

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

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

stabilirea relațiilor genealogice în necropole/cimitirele relevante

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

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

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

descriere	echipa	obiective
-----------	--------	-----------

Anexa 4 – Publicații în anul 2013

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

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

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

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

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

1. Raport: antropologie fizică

Campania: **Capidava 2013**

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

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

Pentru fiecare schelet au fost analizați următorii parametri:

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

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

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

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

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

Sex: indeterminabil prin metode de antropologie fizică.

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

Artroza articulațiilor: nu e cazul.

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

Patologii: nu există.

Traume: nu există.

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

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

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

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

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

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

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

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

Patologii: nu există.

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

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

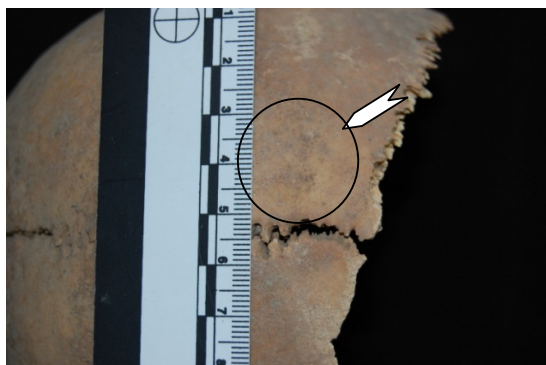


Fig. 1 – traumă craniană, parietal stâng

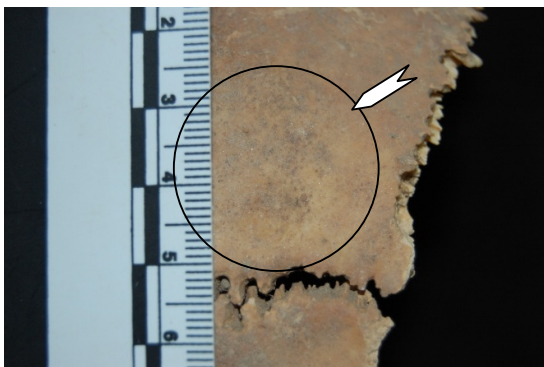


Fig. 2 – traumă craniană,
parietal stâng - detaliu

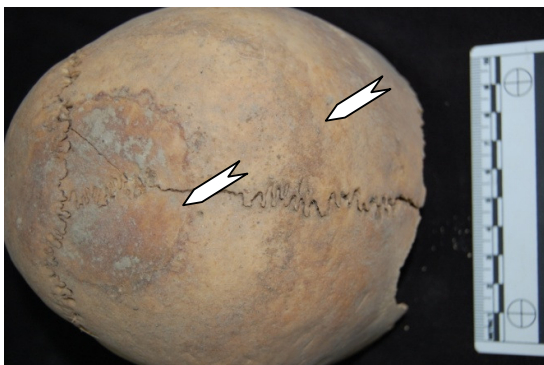


Fig. 3 – urmele colorate,
concentrice din
apropierea suturii
lambdoide



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

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

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

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

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

Sex: indeterminabil prin metode de antropologie fizică.

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

Artoza articulațiilor: nu e cazul.

Leziuni periostitice: pe oasele prezente nu există.

Patologii: nu există.

Traume: nu există.

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

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

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

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

Sex: indeterminabil prin metode de antropologie fizică.

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

Artroza articulațiilor: nu e cazul.

Leziuni periostitice: pe oasele prezente nu există.

Patologii: nu există.

Traume: nu există.

U1

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

U2

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

Reprezentarea grupului pe clase de vârstă:

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

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

Observator 1: Claudia Radu _____

Observator 2: Ioana Rusu _____

Observator 3: Cristina Mircea _____

Responsabil proiect PCCA_1153/2011/P1-UBB

Dr. Beatrice Kelemen

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

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

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

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

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

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

Tab. 1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*DPPAM- dinți permanenți pierduți antemortem.

*DC- dinți cariati.

*PERIO- periodontită.

*HLE- hipoplazia lineară a enamelului.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IMAGINI



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



Fig. 2. Craniul nr. 1.



Fig. 3. Hiperostoza porotică.



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



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

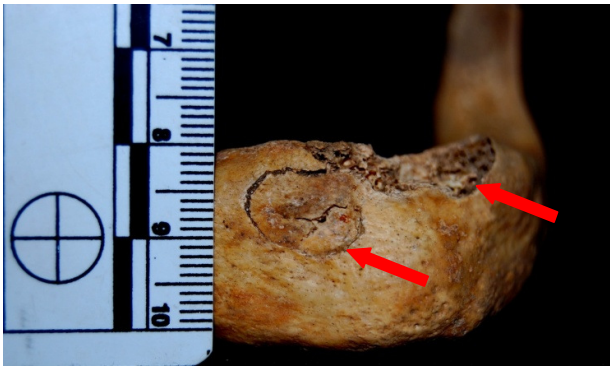


Fig. 6. Mandibula nr. 2.

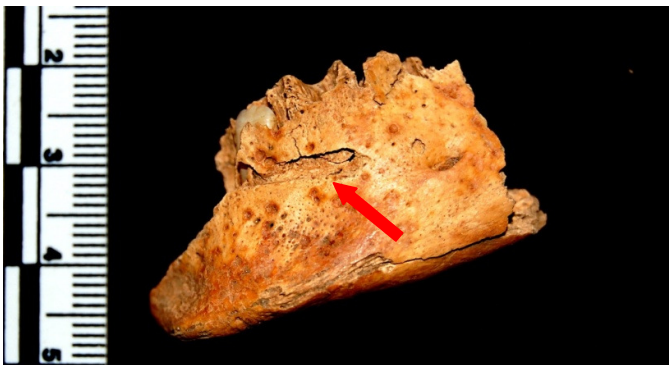


Fig. 7. Mandibula nr. 46.



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



Fig. 9. Osteofite pe o vertebră toracică.



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

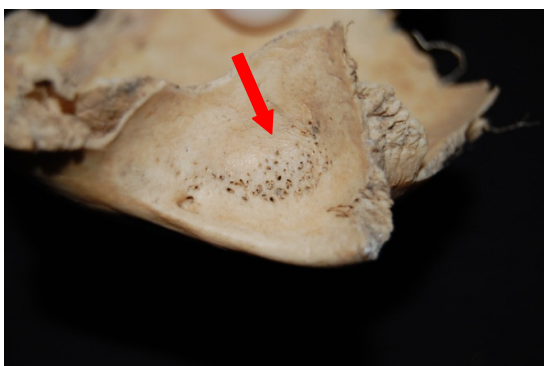


Fig. 11. *Cribră orbitalia*.



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

Anexa 6 - Extras Chestionar ereditate maternă – aplicat lotului modern

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

RAPORT STIINTIFIC

Programul: Parteneriate in domenii prioritare

Domeniul: 9: Cercetare socio-economica si umanista

Contract nr: 227/2012

Cod proiect: PCCA_1153/2011, proiect tip 1

Titlul proiectului: „Genetic Evolution: New Evidences for the Study of Interconnected Structures. A Biomolecular Journey around the Carpathians from Ancient to Medieval Times”

Acronim proiect: GENESIS

Director de proiect: Acad. Prof. Dr. Octavian POPESCU

Semnatura:



Obiective si activitati

Etapa I: 2012, unica

Perioada: 01.10.2012-15.12.2012

Obiectiv: Documentare, teste si selectia probelor

- Activitati:**
- I.1. Documentare si schimburi stiintifice
 - I.2. Investigatii paleo-osteologice preliminare
 - I.3. Analize complementare (SEM, spectroscopie etc.)
 - I.4. Procesarea inventarului material
 - I.5. Studii de arhiva

In aceasta prima faza a proiectului, echipa extinsa a acestuia a urmarit:

1. actualizarea informatiilor privind metodologia de lucru: tehnici de analiza, protocoale de lucru, standardizarea si optimizarea acestora in laboratoarele de analiza antropologica, laboratoarele de bioarheologie moleculara si laboratoarele de analize fizice complementare. In cadrul acestui pachet de lucru sunt incluse activitatile I.1. – I.4.

2. selectia probelor biologice si materiale pentru teste (in anul 2012) si analize (in anul 2013). In cadrul acestui pachet de lucru sunt incluse activitatile I.1., I.4. si I.5.

I.1. Documentare si schimburi stiintifice:

Deplasari si schimburi stiintifice:

In perioada 11-21 noiembrie 2012, cercetatorii Radu Bajenaru, Adrian Ionita, Alexandru Simon si Vlad Zirra (echipa CO – Academia Romana) s-au deplasat in Bulgaria pentru cercetari de teren la Sofia (Academia Bulgara de Stiinte, Institutele de Arheologie si Antropologie) si la principalele santiere arheologice de epoca medievala (secolele VII-XIII) coordonate de Academia Bulgara de Stiinte (la Preslav si Pliska). Deplasarea a avut ca scop dezvoltarea legaturilor existente cu colegii din Bulgaria si conturarea unui orizont relevant de probe pentru analizele ADN (ADN-ul bulgar „de Bulgaria” urmand a fi comparat si cu ADN-ul extras din osemintele identificate ca fiind bulgare, de secol VIII-IX, descoperite la Alba Iulia si Aiud). Totodata, in cadrul deplasarii au fost explorate posibilitatile prelevarii de probe din osemintele de epoca bronzului si epoca fierului (perioada La Tène), descoperite la linia Dunarii de Jos. In urma vizitei, au fost identificati de comun acord cu colegii bulgari, un numar de 30 de indivizi medievali (secolele IX-XII), pentru analiza ADN. Extragerea ADN-ului va avea loc in urmatoarea etapa a proiectului (2013), cu implicarea echipei Partenerului 1 din proiectul Genesis (Universitatea *Babeş-Bolyai*, Cluj-Napoca), specializata pe aceste proceduri stiintifice.

In perioada 23 noiembrie-2 decembrie, cercetatorii Radu Bajenaru, Tudor Salagean si Vlad Zirra (echipa CO – Academia Romana) au efectuat o deplasare in Ungaria la Budapesta, Szeged si Pécs pentru cercetari de teren si de arhiva (activitatea I.5.) la Arhiva Naționala Maghiara, la Institutul de Arheologie al Academiei Ungare de Stiinte si la principalele santiere arheologice coordonate de catre acesta (cu accent pe aria Kunság-ului dintre Gyula si Szeged). Scopul deplasarii este identificarea surselor pentru recoltare de material biologic in vederea compunerii unui lot extins (acoperind – de preferinta prin minimum 20 de probe distincte pentru fiecare epoca studiată – epoca celtica, romana, huno-avara si maghiara timpurie de pe teritoriul Ungariei de astazi) pentru posibile probe ADN. De asemenea, prin aceasta deplasare se urmareste un schimb de bune practici cu colegii maghiari, care au inceput deja analize de acest tip. In acest context, un rol important il va juca discutarea si eventuala cooperare in jurul descoperirilor de la Alba Iulia (precum ar fi cea mai veche biserica de zid de rit grec de la nord de Dunare) realizate de catre Daniela Marcu Istrate, membră a echipei proiectului Genesis (partener CO – Academia Romana).

Documentare bibliografica:

In cadrul acestei activitati a fost desfasurata o intensa activitate de interogare a bazelor de date bibliografice internationale si identificarea ultimelor descoperiri metodologice de interes pentru activitatile practice ale acestui proiect. In urma acestui efort, prezentam urmatoarea bibliografie (selectiva) continand cele mai relevante articole stiintifice in domeniile abordate in cadrul proiectului: paleodemografie (ADN vechi), antropologie biologica (atribuirea sexului, determinarea varstei la momentul mortii, estimarea staturii, patologii si traumatisme), reconstructia dietei cu ajutorul izotopilor stabili, tafonomie (procese de diagenaza) etc.

1. Agarwal, S.C., Dumitriu, M., Tomlinson, G.A. and Grynopas, M.D. (2004), Medieval trabecular bone architecture: The influence of age, sex, and lifestyle. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 124: 33–44. doi: 10.1002/ajpa.10335
2. Alesan, A., Malgosa, A. and Simó, C. (1999), Looking into the demography of an Iron Age population in the Western Mediterranean. I. Mortality. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 110: 285–301. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199911)110:3<285::AID-AJPA3>3.0.CO;2-2
3. Alzualde, A., Izagirre, N., Alonso, S., Alonso, A., Albarrán, C., Azkarate, A. and de la Rúa, C. (2006), Insights into the “isolation” of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (6th–7th centuries AD). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 130: 394–404. doi: 10.1002/ajpa.20375
4. Belcastro, M. G., Rastelli, E. and Mariotti, V. (2008), Variation of the degree of sacral vertebral body fusion in adulthood in two European modern skeletal collections. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 135: 149–160. doi: 10.1002/ajpa.20716
5. Bernstein, R. M. (2010), The big and small of it: How body size evolves. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 143: 46–62. doi: 10.1002/ajpa.21440
6. Bierry, G., Le Minor, J.-M. and Schmittbuhl, M. (2010), Oval in males and triangular in females? A quantitative evaluation of sexual dimorphism in the human obturator foramen. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 141: 626–631. doi: 10.1002/ajpa.21227
7. Black, T. K. (1978), A new method for assessing the sex of fragmentary skeletal remains: Femoral shaft circumference. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 48: 227–231. doi: 10.1002/ajpa.1330480217
8. Black, T. K. (1978), A new method for assessing the sex of fragmentary skeletal remains: Femoral shaft circumference. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 48: 227–231. doi: 10.1002/ajpa.1330480217
9. Bolnick, D. A., Bonine, H. M., Mata-Míguez, J., Kemp, B. M., Snow, M. H. and LeBlanc, S. A. (2012), Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 147: 293–300. doi: 10.1002/ajpa.21647
10. Bonneau, N., Bouhallier, J., Simonis, C., Baylac, M., Gagey, O. and Tardieu, C. (2012), Technical note: Shape variability induced by reassembly of human pelvic bones. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 139–147. doi: 10.1002/ajpa.22040
11. Bouwman, A. S., Chilvers, E. R., Brown, K. A. and Brown, T. A. (2006), Brief communication: Identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone contaminated with modern DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 131: 428–431. doi: 10.1002/ajpa.20411
12. Bruzek, J. (2002), A method for visual determination of sex, using the human hip bone. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 117: 157–168. doi: 10.1002/ajpa.10012
13. Buzon, M. R. and Judd, M. A. (2008), Investigating health at Kerma: Sacrificial versus nonsacrificial individuals. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 136: 93–99. doi: 10.1002/ajpa.20781
14. Calce, S. E. (2012), A new method to estimate adult age-at-death using the acetabulum. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 11–23. doi: 10.1002/ajpa.22026
15. Coquerelle, M., Bookstein, F. L., Braga, J., Halazonetis, D. J., Weber, G. W. and Mitteroecker, P. (2011), Sexual dimorphism of the human mandible and its association with dental development. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 145: 192–202. doi: 10.1002/ajpa.21485
16. Cowal, L. S. and Pastor, R. F. (2008), Dimensional variation in the proximal ulna: Evaluation of a metric method for sex assessment. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 135: 469–478. doi: 10.1002/ajpa.20771
17. Craig, O. E., Biazzo, M., O’Connell, T. C., Garnsey, P., Martinez-Labarga, C., Lelli, R., Salvadei, L., Tartaglia, G., Nava, A., Renò, L., Fiammenghi, A., Rickards, O. and Bondioli, L. (2009), Stable isotopic evidence for diet at the Imperial Roman

- coastal site of Velia (1st and 2nd Centuries AD) in Southern Italy. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 139: 572–583. doi: 10.1002/ajpa.21021
18. Cucina, A. and Tiesler, V. (2003), Dental caries and antemortem tooth loss in the Northern Peten area, Mexico: A biocultural perspective on social status differences among the Classic Maya. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 122: 1–10. doi: 10.1002/ajpa.10267
 19. De Mendonça, M.C. (2000), Estimation of height from the length of long bones in a Portuguese adult population. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 112: 39–48. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(200005)112:1<39::AID-AJPA5>3.0.CO;2-#
 20. Deguilloux, M.-F., Soler, L., Pemonge, M.-H., Scarre, C., Jousaume, R. and Laporte, L. (2011), News from the west: Ancient DNA from a French megalithic burial chamber. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 144: 108–118. doi: 10.1002/ajpa.21376
 21. DeWitte, S. N. (2009), The effect of sex on risk of mortality during the Black Death in London, A.D. 1349–1350. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 139: 222–234. doi: 10.1002/ajpa.20974
 22. DeWitte, S. N. (2009), The effect of sex on risk of mortality during the Black Death in London, A.D. 1349–1350. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 139: 222–234. doi: 10.1002/ajpa.20974
 23. DeWitte, S. N. (2010), Sex differentials in frailty in medieval England. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 143: 285–297. doi: 10.1002/ajpa.21316
 24. DeWitte, S. N. (2012), Sex differences in periodontal disease in catastrophic and attritional assemblages from medieval london. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 405–416. doi: 10.1002/ajpa.22138
 25. DeWitte, S. N. (2012), Sex differences in periodontal disease in catastrophic and attritional assemblages from medieval london. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 405–416. doi: 10.1002/ajpa.22138
 26. Disotell, T. R. (2012), Archaic human genomics. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 24–39. doi: 10.1002/ajpa.22159
 27. Drusini, A. G., Toso, O. and Ranzato, C. (1997), The coronal pulp cavity index: A biomarker for age determination in human adults. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 103: 353–363. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199707)103:3<353::AID-AJPA5>3.0.CO;2-R
 28. Eshed, V., Gopher, A., Gage, T. B. and Hershkovitz, I. (2004), Has the transition to agriculture reshaped the demographic structure of prehistoric populations? New evidence from the Levant. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 124: 315–329. doi: 10.1002/ajpa.10332
 29. Falys, C. G., Schutkowski, H. and Weston, D. A. (2006), Auricular surface aging: Worse than expected? A test of the revised method on a documented historic skeletal assemblage. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 130: 508–513. doi: 10.1002/ajpa.20382
 30. Flander, L. B. (1978), Univariate and multivariate methods for sexing the sacrum. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 49: 103–110. doi: 10.1002/ajpa.1330490116
 31. France, D. L. (1988), Osteometry at muscle origin and insertion in sex determination. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 76: 515–526. doi: 10.1002/ajpa.1330760411
 32. Gamba, C., Fernández, E., Tirado, M., Pastor, F. and Arroyo-Pardo, E. (2011), Brief communication: Ancient nuclear DNA and kinship analysis: The case of a medieval burial in San Esteban Church in Cuellar (Segovia, Central Spain). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 144: 485–491. doi: 10.1002/ajpa.21451
 33. Gapert, R., Black, S. and Last, J. (2009), Sex determination from the occipital condyle: Discriminant function analysis in an Eighteenth and Nineteenth Century British sample. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 138: 384–394. doi: 10.1002/ajpa.20946
 34. Garvin, H. M. and Ruff, C. B. (2012), Sexual dimorphism in skeletal browridge and chin morphologies determined using a new quantitative method. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 147: 661–670. doi: 10.1002/ajpa.22036
 35. Geber, J. and Murphy, E. (2012), Scurvy in the Great Irish Famine: Evidence of vitamin C deficiency from a mid-19th century skeletal population. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 512–524. doi: 10.1002/ajpa.22066
 36. Gibbon, V. E., Penny, C. B., Štrkalj, G. and Ruff, P. (2009), Brief communication: Minimally invasive bone sampling method for DNA analysis. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 139: 596–599. doi: 10.1002/ajpa.21048
 37. Gilmore, C. C. and Grote, M. N. (2012), Estimating age from adult occlusal wear: A modification of the miles method. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 181–192. doi: 10.1002/ajpa.22106
 38. Haas, C. J., Zink, A., Molnár, E., Szeimies, U., Reischl, U., Marcsik, A., Ardagna, Y., Dutour, O., Pálfi, G. and Nerlich, A. G. (2000), Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 113: 293–304. doi: 10.1002/1096-8644(200011)113:3<293::AID-AJPA2>3.0.CO;2-6
 39. Harris, E. F. and Lease, L. R. (2005), Mesiodistal tooth crown dimensions of the primary dentition: A worldwide survey. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 128: 593–607. doi: 10.1002/ajpa.20162
 40. Harris, E. F., Hicks, J. D. and Barcroft, B. D. (2001), Tissue contributions to sex and race: Differences in tooth crown size of deciduous molars. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 115: 223–237. doi: 10.1002/ajpa.1077
 41. Hassett, B. (2011), Technical note: Estimating sex using cervical canine odontometrics: A test using a known sex sample. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 146: 486–489. doi: 10.1002/ajpa.21584

42. Holman, D. J. and Bennett, K. A. (1991), Determination of sex from arm bone measurements. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 84: 421–426. doi: 10.1002/ajpa.1330840406
43. Jacobs, K. (1994), Human dento-gnathic metric variation in mesolithic/neolithic Ukraine: Possible evidence of demic diffusion in the Dnieper Rapids region. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 95: 1–26. doi: 10.1002/ajpa.1330950102
44. Jaouen, K., Balter, V., Herrscher, E., Lamboux, A., Telouk, P. and Albarède, F. (2012), Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 334–340. doi: 10.1002/ajpa.22053
45. Jurmain, R., Bartelink, E. J., Leventhal, A., Bellifemine, V., Nechayev, I., Atwood, M. and DiGiuseppe, D. (2009), Paleoepidemiological patterns of interpersonal aggression in a prehistoric central California population from CA-ALA-329. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 139: 462–473. doi: 10.1002/ajpa.21002
46. Kaestle, F. A. and Horsburgh, K. A. (2002), Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 119: 92–130. doi: 10.1002/ajpa.10179
47. Kaestle, F. A. and Smith, D. G. (2001), Ancient mitochondrial DNA evidence for prehistoric population movement: The numic expansion. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 115: 1–12. doi: 10.1002/ajpa.1051
48. Kerley, E. R. (1965), The microscopic determination of age in human bone. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 23: 149–163. doi: 10.1002/ajpa.1330230215
49. Kim, K., Kim, K.-Y., Jeon, E., Togloom, A., Cho, Y.-O., Lee, M.-S., Lkhagvasuren, G., Choi, J.-H., Tumen, D., Ja Park, A., Kim, K.-C., Park, K.-W., Kim, J.-H., Noh, M., Yoo, K.-J. and Lee, K.-H. (2008), Technical note: Improved ancient DNA purification for PCR using ion-exchange columns. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 136: 114–121. doi: 10.1002/ajpa.20782
50. Kindschuh, S. C., Dupras, T. L. and Cowgill, L. W. (2010), Determination of sex from the hyoid bone. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 143: 279–284. doi: 10.1002/ajpa.21315
51. Klaes, A. R., Ousley, S. D. and Vollner, J. M. (2012), A revised method of sexing the human innominate using Phenice's nonmetric traits and statistical methods. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 104–114. doi: 10.1002/ajpa.22102
52. Kolman, C. J. and Tuross, N. (2000), Ancient DNA analysis of human populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 111: 5–23. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(200001)111:1<5::AID-AJPA2>3.0.CO;2-3
53. Konigsberg, L. W. and Hens, S. M. (1998), Use of ordinal categorical variables in skeletal assessment of sex from the cranium. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 107: 97–112. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199809)107:1<97::AID-AJPA8>3.0.CO;2-A
54. Kuch, M., Gröcke, D. R., Knyf, M. C., Gilbert, M. T. P., Younghusband, B., Young, T., Marshall, I., Willerslev, E., Stoneking, M. and Poinar, H. (2007), A preliminary analysis of the DNA and diet of the extinct Beothuk: A systematic approach to ancient human DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 132: 594–604. doi: 10.1002/ajpa.20536
55. Lee, E. J., Makarewicz, C., Renneberg, R., Harder, M., Krause-Kyora, B., Müller, S., Ostritz, S., Fehren-Schmitz, L., Schreiber, S., Müller, J., von Wurmb-Schwark, N. and Nebel, A. (2012), Emerging genetic patterns of the European Neolithic: Perspectives from a late Neolithic bell beaker burial site in Germany. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 571–579. doi: 10.1002/ajpa.22074
56. Lertrit, P., Poolsuwan, S., Thosarat, R., Sanpachudayan, T., Boonyarit, H., Chinpaisal, C. and Suktitipat, B. (2008), Genetic history of Southeast Asian populations as revealed by ancient and modern human mitochondrial DNA analysis. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 137: 425–440. doi: 10.1002/ajpa.20884
57. Lieverse, A. R., Weber, A. W., Bazaliiskiy, V. I., Goriunova, O. I. and Savel'ev, N. A. (2007), Osteoarthritis in Siberia's Cis-Baikal: Skeletal indicators of hunter-gatherer adaptation and cultural change. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 132: 1–16. doi: 10.1002/ajpa.20479
58. Loth, S. R. and Henneberg, M. (2001), Sexually dimorphic mandibular morphology in the first few years of life. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 115: 179–186. doi: 10.1002/ajpa.1067
59. Lovejoy, C. O., Meindl, R. S., Mensforth, R. P. and Barton, T. J. (1985), Multifactorial determination of skeletal age at death: A method and blind tests of its accuracy. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 1–14. doi: 10.1002/ajpa.1330680102
60. Maggiano, I. S., Schultz, M., Kierdorf, H., Sosa, T. S., Maggiano, C. M. and Tiesler Blos, V. (2008), Cross-sectional analysis of long bones, occupational activities and long-distance trade of the Classic Maya from Xcambó—Archaeological and osteological evidence. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 136: 470–477. doi: 10.1002/ajpa.20830
61. Mays, S. (2012), An investigation of age-related changes at the acetabulum in 18th–19th century adult skeletons from Christ Church Spitalfields, London. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 485–492. doi: 10.1002/ajpa.22146
62. McCormick, W. F., Stewart, J. H. and Langford, L. A. (1985), Sex determination from chest plate roentgenograms. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 173–195. doi: 10.1002/ajpa.1330680205
63. McIntyre, M. H., Cohn, B. A. and Ellison, P. T. (2006), Sex dimorphism in digital formulae of children. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 129: 143–150. doi: 10.1002/ajpa.20240
64. Meindl, R. S. and Lovejoy, C. O. (1985), Ectocranial suture closure: A revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 57–66. doi: 10.1002/ajpa.1330680106
65. Meindl, R. S., Lovejoy, C. O., Mensforth, R. P. and Carlos, L. D. (1985), Accuracy and direction of error in the sexing of the skeleton: Implications for paleodemography. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 79–85. doi: 10.1002/ajpa.1330680108

66. Meindl, R. S., Lovejoy, C. O., Mensforth, R. P. and Walker, R. A. (1985), A revised method of age determination using the os pubis, with a review and tests of accuracy of other current methods of pubic symphyseal aging. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 29–45. doi: 10.1002/ajpa.1330680104
67. Melchior, L., Gilbert, M.T.P., Kivisild, T., Lynnerup, N. and Dissing, J. (2008), Rare mtDNA haplogroups and genetic differences in rich and poor Danish Iron-Age villages. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 135: 206–215. doi: 10.1002/ajpa.20721
68. Mensforth, R. P. (1990), Paleodemography of the Carlston Annis (Bt-5) Late Archaic skeletal population. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 82: 81–99. doi: 10.1002/ajpa.1330820110
69. Molnar, P. (2008), Dental wear and oral pathology: Possible evidence and consequences of habitual use of teeth in a Swedish Neolithic sample. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 136: 423–431. doi: 10.1002/ajpa.20824
70. Mulhern, D. M. and Jones, E. B. (2005), Test of revised method of age estimation from the auricular surface of the ilium. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 126: 61–65. doi: 10.1002/ajpa.10410
71. Mutolo, M. J., Jenny, L. L., Buszek, A. R., Fenton, T. W. and Foran, D. R. (2012), Osteological and molecular identification of brucellosis in ancient Butrint, Albania. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 147: 254–263. doi: 10.1002/ajpa.21643
72. Nagaoka, T. and Hirata, K. (2007), Reconstruction of paleodemographic characteristics from skeletal age at death distributions: Perspectives from Hitotsubashi, Japan. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 134: 301–311. doi: 10.1002/ajpa.20670
73. Nagy, D., Tömöry, G., Csányi, B., Bogács-Szabó, E., Czibula, Á., Priskin, K., Bede, O., Bartosiewicz, L., Downes, C. S. and Raskó, I. (2011), Comparison of lactase persistence polymorphism in ancient and present-day Hungarian populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 145: 262–269. doi: 10.1002/ajpa.21490
74. Nicklisch, N., Maixner, F., Ganslmeier, R., Friederich, S., Dresely, V., Meller, H., Zink, A. and Alt, K. W. (2012), Rib lesions in skeletons from early neolithic sites in Central Germany: On the trail of tuberculosis at the onset of agriculture. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 391–404. doi: 10.1002/ajpa.22137
75. Nicklisch, N., Maixner, F., Ganslmeier, R., Friederich, S., Dresely, V., Meller, H., Zink, A. and Alt, K. W. (2012), Rib lesions in skeletons from early neolithic sites in Central Germany: On the trail of tuberculosis at the onset of agriculture. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 391–404. doi: 10.1002/ajpa.22137
76. Norén, A., Lynnerup, N., Czarnetzki, A. and Graw, M. (2005), Lateral angle: A method for sexing using the petrous bone. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 128: 318–323. doi: 10.1002/ajpa.20245
77. Novak, M. and Šlaus, M. (2011), Vertebral pathologies in two early modern period (16th–19th century) populations from Croatia. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 145: 270–281. doi: 10.1002/ajpa.21491
78. Oelze, V. M., Koch, J. K., Kupke, K., Nehlich, O., Zäuner, S., Wahl, J., Weise, S. M., Rieckhoff, S. and Richards, M. P. (2012), Multi-isotopic analysis reveals individual mobility and diet at the early iron age monumental tumulus of magdalenenberg, germany. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 406–421. doi: 10.1002/ajpa.22063
79. Oettlé, A. C., Becker, P. J., de Villiers, E. and Steyn, M. (2009), The influence of age, sex, population group, and dentition on the mandibular angle as measured on a South African sample. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 139: 505–511. doi: 10.1002/ajpa.21009
80. Owers, S. K. and Pastor, R. F. (2005), Analysis of quantitative methods for rib seriation using the Spitalfields documented skeletal collection. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 127: 210–218. doi: 10.1002/ajpa.20038
81. Pechenkina, E. A., Benfer, R. A. and Zhijun, W. (2002), Diet and health changes at the end of the Chinese neolithic: The Yangshao/Longshan transition in Shaanxi province. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 117: 15–36. doi: 10.1002/ajpa.10014
82. Plomp, K. A., Roberts, C. A. and Viðarsdóttir, U. S. (2012), Vertebral morphology influences the development of Schmorl's nodes in the lower thoracic vertebrae. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 572–582. doi: 10.1002/ajpa.22168
83. Pretorius, E., Steyn, M. and Scholtz, Y. (2006), Investigation into the usability of geometric morphometric analysis in assessment of sexual dimorphism. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 129: 64–70. doi: 10.1002/ajpa.20251
84. Prowse, T. L., Schwarcz, H. P., Garnsey, P., Knyf, M., Macchiarelli, R. and Bondioli, L. (2007), Isotopic evidence for age-related immigration to imperial Rome. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 132: 510–519. doi: 10.1002/ajpa.20541
85. Redfern, R. C. and DeWitte, S. N. (2011), A new approach to the study of Romanization in Britain: A regional perspective of cultural change in late Iron Age and Roman Dorset using the Siler and Gompertz–Makeham models of mortality. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 144: 269–285. doi: 10.1002/ajpa.21400
86. Redfern, R. C. and DeWitte, S. N. (2011), Status and health in Roman Dorset: The effect of status on risk of mortality in post-conquest populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 146: 197–208. doi: 10.1002/ajpa.21563
87. Reitsema, L. J. and Vercellotti, G. (2012), Stable isotope evidence for sex- and status-based variations in diet and life history at medieval Trino Vercellese, Italy. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 589–600. doi: 10.1002/ajpa.22085
88. Ricaut, F.-X., Keyser-Tracqui, C., Cammaert, L., Crubézy, E. and Ludes, B. (2004), Genetic analysis and ethnic affinities from two Scytho-Siberian skeletons. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 123: 351–360. doi: 10.1002/ajpa.10323
89. Rogan, P. K. and Salvo, J. J. (1990), Study of nucleic acids isolated from ancient remains. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 33: 195–214. doi: 10.1002/ajpa.1330330509
90. Rogers, T. L. (2009), Sex determination of adolescent skeletons using the distal humerus. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 140: 143–148. doi: 10.1002/ajpa.21060

91. Ruff, C. B., Holt, B. M., Niskanen, M., Sládek, V., Berner, M., Garofalo, E., Garvin, H. M., Hora, M., Maijanen, H., Niinimäki, S., Salo, K., Schuplerová, E. and Tompkins, D. (2012), Stature and body mass estimation from skeletal remains in the European Holocene. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 601–617. doi: 10.1002/ajpa.22087
92. Safont, S., Malgosa, A. and Subirà, M. E. (2000), Sex assessment on the basis of long bone circumference. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 113: 317–328. doi: 10.1002/1096-8644(200011)113:3<317::AID-AJPA4>3.0.CO;2-J
93. Saunders, S., DeVito, C., Herring, A., Southern, R. and Hoppa, R. (1993), Accuracy tests of tooth formation age estimations for human skeletal remains. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 92: 173–188. doi: 10.1002/ajpa.1330920207
94. Scheuer, L. (2002), A blind test of mandibular morphology for sexing mandibles in the first few years of life. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 119: 189–191. doi: 10.1002/ajpa.10098
95. Schmidt, D., Hummel, S. and Herrmann, B. (2003), Brief communication: Multiplex X/Y-PCR improves sex identification in aDNA analysis. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 121: 337–341. doi: 10.1002/ajpa.10172
96. Schwartz, G. T. and Dean, M. C. (2005), Sexual dimorphism in modern human permanent teeth. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 128: 312–317. doi: 10.1002/ajpa.20211
97. Shin, D. H., Oh, C. S., Kim, Y.-S. and Hwang, Y.-i. (2012), Ancient-to-modern secular changes in Korean stature. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 147: 433–442. doi: 10.1002/ajpa.22011
98. Simón, M., Jordana, X., Armentano, N., Santos, C., Díaz, N., Solórzano, E., López, J. B., González-Ruiz, M. and Malgosa, A. (2011), The presence of nuclear families in prehistoric collective burials revisited: The bronze age burial of montanissell cave (Spain) in the light of aDNA. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 146: 406–413. doi: 10.1002/ajpa.21590
99. Sládek, V., Berner, M., Sosna, D. and Sailer, R. (2007), Human manipulative behavior in the Central European Late Eneolithic and Early Bronze Age: Humeral bilateral asymmetry. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 133: 669–681. doi: 10.1002/ajpa.20551
100. Šlaus, M. (2000), Biocultural analysis of sex differences in mortality profiles and stress levels in the late medieval population from Nova Rača, Croatia. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 111: 193–209. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(200002)111:2<193::AID-AJPA6>3.0.CO;2-0
101. Šlaus, M. (2008), Osteological and dental markers of health in the transition from the Late Antique to the Early Medieval period in Croatia. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 136: 455–469. doi: 10.1002/ajpa.20829
102. Šlaus, M., Novak, M., Bedić, Ž. and Strinović, D. (2012), Bone fractures as indicators of intentional violence in the eastern adriatic from the antique to the late medieval period (2nd–16th century AD). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149: 26–38. doi: 10.1002/ajpa.22083
103. Sparacello, V. and Marchi, D. (2008), Mobility and subsistence economy: A diachronic comparison between two groups settled in the same geographical area (Liguria, Italy). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 136: 485–495. doi: 10.1002/ajpa.20832
104. Sparacello, V.S., Pearson, O.M., Coppa, A. and Marchi, D. (2011), Changes in skeletal robusticity in an iron age agropastoral group: The samnites from the Alfedena necropolis (Abruzzo, Central Italy). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 144: 119–130. doi: 10.1002/ajpa.21377
105. Sterling, R., Miranda, J. J., Gilman, R. H., Cabrera, L., Sterling, C. R., Bern, C. and Checkley, W. (2012), Early anthropometric indices predict short stature and overweight status in a cohort of peruvians in early adolescence. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 148: 451–461. doi: 10.1002/ajpa.22073
106. Stevenson, J. C., Mahoney, E. R., Walker, P. L. and Everson, P. M. (2009), Technical note: Prediction of sex based on five skull traits using decision analysis (CHAID). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 139: 434–441. doi: 10.1002/ajpa.21042
107. Stojanowski, C. M. and Schillaci, M. A. (2006), Phenotypic approaches for understanding patterns of intracemetery biological variation. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 131: 49–88. doi: 10.1002/ajpa.20517
108. Stojanowski, C. M., Seidemann, R. M. and Doran, G. H. (2002), Differential skeletal preservation at Windover Pond: Causes and consequences. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 119: 15–26. doi: 10.1002/ajpa.10101
109. Stone, A. C., Milner, G. R., Pääbo, S. and Stoneking, M. (1996), Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 99: 231–238. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199602)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1
110. Stone, A. C., Milner, G. R., Pääbo, S. and Stoneking, M. (1996), Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 99: 231–238. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199602)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1
111. Sullivan, A. (2004), Reconstructing relationships among mortality, status, and gender at the Medieval Gilbertine Priory of St. Andrew, Fishergate, York. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 124: 330–345. doi: 10.1002/ajpa.10271
112. Sullivan, A. (2005), Prevalence and etiology of acquired anemia in Medieval York, England. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 128: 252–272. doi: 10.1002/ajpa.20026
113. Sulzmann, C.E., Buckberry, J.L. and Pastor, R.F. (2008), The utility of carpals for sex assessment: A preliminary study. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 135: 252–262. doi: 10.1002/ajpa.20738
114. Tague, R. G. (1994), Maternal mortality or prolonged growth: Age at death and pelvic size in three prehistoric Amerindian populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 95: 27–40. doi: 10.1002/ajpa.1330950103
115. Tague, R. G. (2000), Do big females have big pelvises?. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 112: 377–393. doi: 10.1002/1096-8644(200007)112:3<377::AID-AJPA8>3.0.CO;2-O

116. Tague, R. G. (2007), Costal process of the first sacral vertebra: Sexual dimorphism and obstetrical adaptation. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 132: 395–405. doi: 10.1002/ajpa.20531
117. Templeton, A. R. (2005), Haplotype Trees and Modern Human Origins. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 128: 33–59. doi: 10.1002/ajpa.20351
118. Thayer, Z. M. and Dobson, S. D. (2010), Sexual dimorphism in chin shape: Implications for adaptive hypotheses. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 143: 417–425. doi: 10.1002/ajpa.21330
119. Tömöry, G., Csányi, B., Bogácsi-Szabó, E., Kalmár, T., Czibula, Á., Csósz, A., Priskin, K., Mende, B., Langó, P., Downes, C. S. and Raskó, I. (2007), Comparison of maternal lineage and biogeographic analyses of ancient and modern Hungarian populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 134: 354–368. doi: 10.1002/ajpa.20677
120. Velasco-Vázquez, J., González-Reimers, E., Arnay-De-La-Rosa, M., Barros-López, N., Martín-Rodríguez, E. and Santolaria-Fernández, F. (1999), Bone histology of prehistoric inhabitants of the Canary Islands: Comparison between El Hierro and Gran Canaria. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 110: 201–213. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199910)110:2<201::AID-AJPA6>3.0.CO;2-N
121. Veroni, A., Nikitovic, D. and Schillaci, M. A. (2010), Brief communication: Sexual dimorphism of the juvenile basicranium. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 141: 147–151. doi: 10.1002/ajpa.21156
122. Viciano, J., Alemán, I., D'Anastasio, R., Capasso, L. and Botella, M. C. (2011), Odontometric sex discrimination in the herculaneum sample (79 AD, Naples, Italy), with application to juveniles. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 145: 97–106. doi: 10.1002/ajpa.21471
123. Vlak, D., Roksandic, M. and Schillaci, M. A. (2008), Greater sciatic notch as a sex indicator in juveniles. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 137: 309–315. doi: 10.1002/ajpa.20875
124. Walker, P. L. (2005), Greater sciatic notch morphology: Sex, age, and population differences. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 127: 385–391. doi: 10.1002/ajpa.10422
125. Walker, P. L. (2008), Sexing skulls using discriminant function analysis of visually assessed traits. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 136: 39–50. doi: 10.1002/ajpa.20776
126. Walker, R. A. and Lovejoy, C. O. (1985), Radiographic changes in the clavicle and proximal femur and their use in the determination of skeletal age at death. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 67–78. doi: 10.1002/ajpa.1330680107
127. Walrath, D. E., Turner, P. and Bruzek, J. (2004), Reliability test of the visual assessment of cranial traits for sex determination. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 125: 132–137. doi: 10.1002/ajpa.10373
128. Waters-Rist, A., Bazaliiskii, V. I., Weber, A., Goriunova, O. I. and Katzenberg, M. A. (2010), Activity-induced dental modification in holocene siberian hunter-fisher-gatherers. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 143: 266–278. doi: 10.1002/ajpa.21313
129. Weiss, E. (2003), Understanding muscle markers: Aggregation and construct validity. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 121: 230–240. doi: 10.1002/ajpa.10226
130. Weiss, K. M. (1972), On the systematic bias in skeletal sexing. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 37: 239–249. doi: 10.1002/ajpa.1330370208
131. Wiechmann, I. and Grupe, G. (2005), Detection of *Yersinia pestis* DNA in two early medieval skeletal finds from Aschheim (Upper Bavaria, 6th century A.D.). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 126: 48–55. doi: 10.1002/ajpa.10276
132. Williams, S. R., Chagnon, N. A. and Spielman, R. S. (2002), Nuclear and mitochondrial genetic variation in the Yanomamö: A test case for ancient DNA studies of prehistoric populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 117: 246–259. doi: 10.1002/ajpa.10035
133. Wittwer-Backofen, U., Buckberry, J., Czarnetzki, A., Doppler, S., Grupe, G., Hotz, G., Kemkes, A., Larsen, C. S., Prince, D., Wahl, J., Fabig, A. and Weise, S. (2008), Basics in paleodemography: A comparison of age indicators applied to the early medieval skeletal sample of Lauchheim. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 137: 384–396. doi: 10.1002/ajpa.20881
134. Wittwer-Backofen, U., Gampe, J. and Vaupel, J. W. (2004), Tooth cementum annulation for age estimation: Results from a large known-age validation study. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 123: 119–129. doi: 10.1002/ajpa.10303
135. Zink, A. R., Grabner, W. and Nerlich, A. G. (2005), Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 126: 32–47. doi: 10.1002/ajpa.10409

Imbunatatirea continua a tehnicilor de analiza transforma rapid bioarheologia. Un volum impresionant de noi informatii este publicat in fiecare an, in toate subdomeniile acestei stiinte. Acest aspect induce nevoia unei constante monitorizari a ultimelor publicatii aparute in revistele de specialitate, de aici, si nevoia unui obiectiv dedicat documentarii continue.

I.2. Investigatii paleo-osteologice preliminare,

I.3. Analize complementare (SEM, spectroscopie etc.)

si I.4. Procesarea inventarului material

Anticipand analizele propriu-zise ale loturilor de studiu propuse in cadrul acestui proiect, in aceasta prima faza au fost investigate resturi umane arheologice din cateva regiuni si din diverse perioade istorice, in vederea standardizarii si optimizarii protocoalelor de lucru (atat intra cat si intre laboratoare), a identificarii celor mai adecvate tehnici de analiza in vederea caracterizarii diferitelor tipuri de resturi bioarheologice si anticiparii potentialelor probleme de natura metodologica ce pot aparea pe parcursul studiului.

Loturile experimentale implicate in aceasta etapa sunt:

1. Necropola I BC – I AC din Hunedoara, Gradina Castelului Platou

Este vorba despre o necropola birituala cu indivizi incinerati (adulti) si inhumati (copii si adulti) reunind aproximativ 40 de subiecti cu varste cuprinse intre nou-nascuti si adulti de varsta mijlocie, acest sit a permis testarea metodelor fizice complementare in vederea caracterizarii procesului de incinerare in contextul in care izvoarele istorice nu transmit nici un fel de detalii despre acesta (tipul de rug, temperaturile de ardere etc.).

Analize ca XRD (X-Ray Diffraction), FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) si SEM (Scanning Electron Microscopy) permit evaluarea temperaturii si duratei procesului de incinerare (XRD), gradul de supravietuire a materiei organice in resturile incinerate (FT-IR), observarea modificarilor structurale suferite de resturile osoase in timpul procesului de ardere (SEM – modificarea observata la nivelul suprafetelor; FT-IR – modificari observate la nivel molecular). In plus, teste de incinerare efectuate pe oase de porc ofera posibilitatea compararii rezultatelor obtinute prin metodele de analiza enumerate mai sus, pentru diferite intervale de temperatura, ajutand la extrapolari privind incinerarile resturilor umane. Prin aceste metode, vom incerca de asemenea sa decelam modificarile de structura ale oaselor induse de crematie si cele induse de diagenaza osului dupa depozitare in sol, apoi stocarea in depozite arheologice. Estimarea gradului de supravietuire a materiei organice in oasele de analizat, va contribui la selectia probelor pentru analize ulterioare mai costisitoare cum sunt analizele de ADN si de izotopi stabili.

Tot in cazul acestei necropole, dominate de resturi osoase apartinand unor copii de varste mici, s-a testat importanta utilizarii radiografiilor dentare in vederea stabilirii cat mai precise a varstei la

momentul decesului, precum și utilizarea lor în vederea sporirii gradului de siguranță la atribuirea sexului (proces cunoscut ca fiind dificil în cazul copiilor).

2. Resturi umane arheologice provenite de sub pavimentul Bisericii Ortodoxe din Feleac, Cluj

Acest lot experimental conține exclusiv resturi umane înhumate din intervalul sec 13 – secol 18. Și în acest grup au fost descoperite resturi de copii și adolescenți ceea ce a contribuit la standardizarea metodelor de înregistrare a datelor de antropologie fizică pentru aceste clase de vârstă. Au fost selectate cele mai relevante caractere non-metrice ce trebuie urmărite pentru stabilirea sexului și vârstei la momentul morții, iar pentru caracterele metrice au fost alcătuite tabele unice ce vor fi utilizate pe parcursul studiului, atât pentru copii, cât și pentru adulți.

Starea proastă de conservare a resturilor umane din acest sit a reprezentat o provocare pentru investigațiile prin metode de antropologie fizică, dar prin teste fizice complementare (FT-IR, XRD, RAMAN) permit caracterizarea proceselor de diagenză în condiții de mediu diferite (comparații cu celelalte loturi).

Din cadrul acestui lot experimental au fost datate cu ^{14}C 5 probe, ce vor fi descrise în continuarea acestui raport. Concomitent cu datarea cu radiocarbon au fost efectuate și măsurători pentru izotopii stabili de C și N în vederea reconstrucțiilor dietare pentru indivizii analizați. Rezultatele preliminare sunt încurajatoare. Datarile rafinează concluziile privind perioadele în care pavimentul lacasului mai sus amintit a fost folosit pentru înhumări, iar datele furnizate de analiza izotopilor stabili sugerează atât distincția dintre dieta copiilor și adulților, dar și cea dintre alimentația femeilor și bărbaților și a indivizilor din perioade istorice diferite.

Subiecți suplimentari analizați cu ajutorul unora sau tuturor metodelor descrise mai sus sunt:

- Copii și adulți de secol X din Capidava (*extra muros*), Constanța
 - o Analize de antropologie fizică, radiografii dentare, XRD, FT-IR;
- Scheletul izolat al unei femei aparținând intervalului I BD – I AD din Miercurea Sibiului
 - o Analize de antropologie fizică, radiografii ale scheletului postcranian, XRD, FT-IR;
- Resturi umane de sec XIV – XV din Coconi, Calarasi
 - o Analize de antropologie fizică;
- Scheletul din mormantul din interiorul Bisericii Domnești din Curtea de Argeș

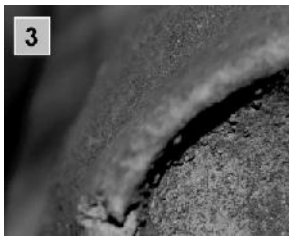
- Analize de antropologie fizica (pentru comparatie cu datele anterior publicate), datare cu ^{14}C , analize de izotopi stabili, analize privind compozitia elementala a obiectelor de inventar;

Rezultate preliminare:

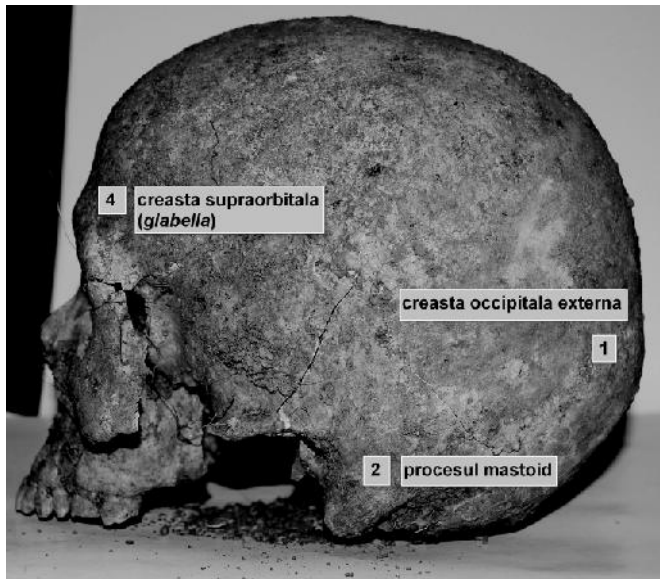
Documentarea caracterelor morfometrice observate in cadrul analizei antropologice fizice:

- Exemple pentru atribuirea sexului:

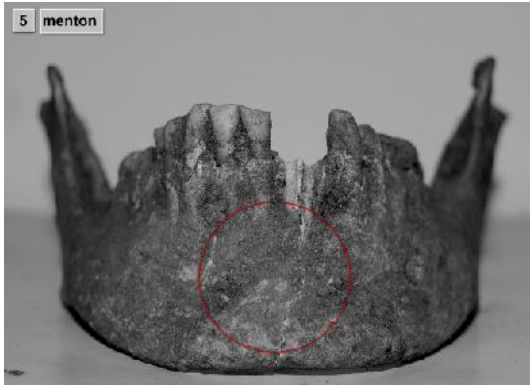
- Diversi markeri morfometrici primesc scoruri intre 1-5 pe baza analizei vizuale efectuate de minim doi observatori.
- Scorurile mici indica sexul feminin, iar scorurile mari pe cel masculin
- Un scor intermediar de 3 nu permite identificarea sexului



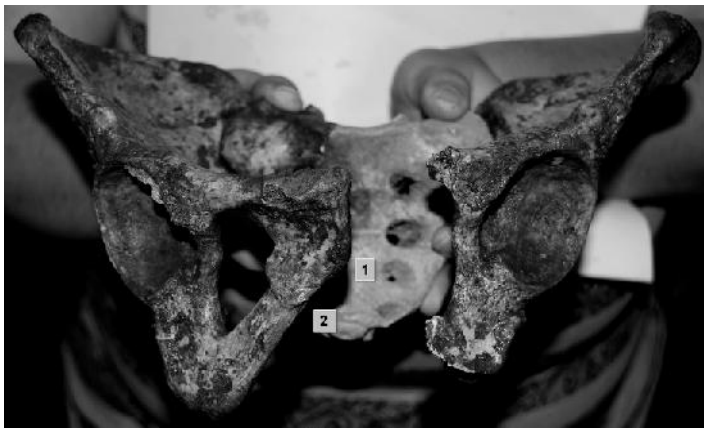
Marginea supraorbitala (scor 1)



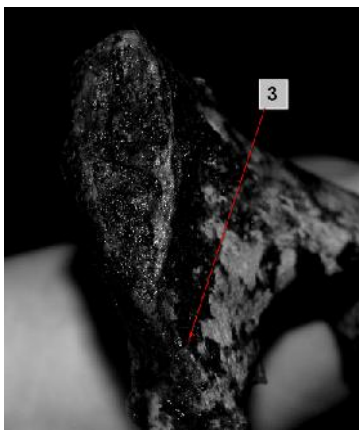
Glabella (scor 1), creasta occipitala externa (scor 1) si procesul mastoid (scor 2)



Mentonul (scor 1)



Arcul ventral, concavitatea subpubiana, documentarea traumelor
(fractura antemortem de ram ischiopubic drept)



Cresta ramurii ischiopubiene (scor 1)

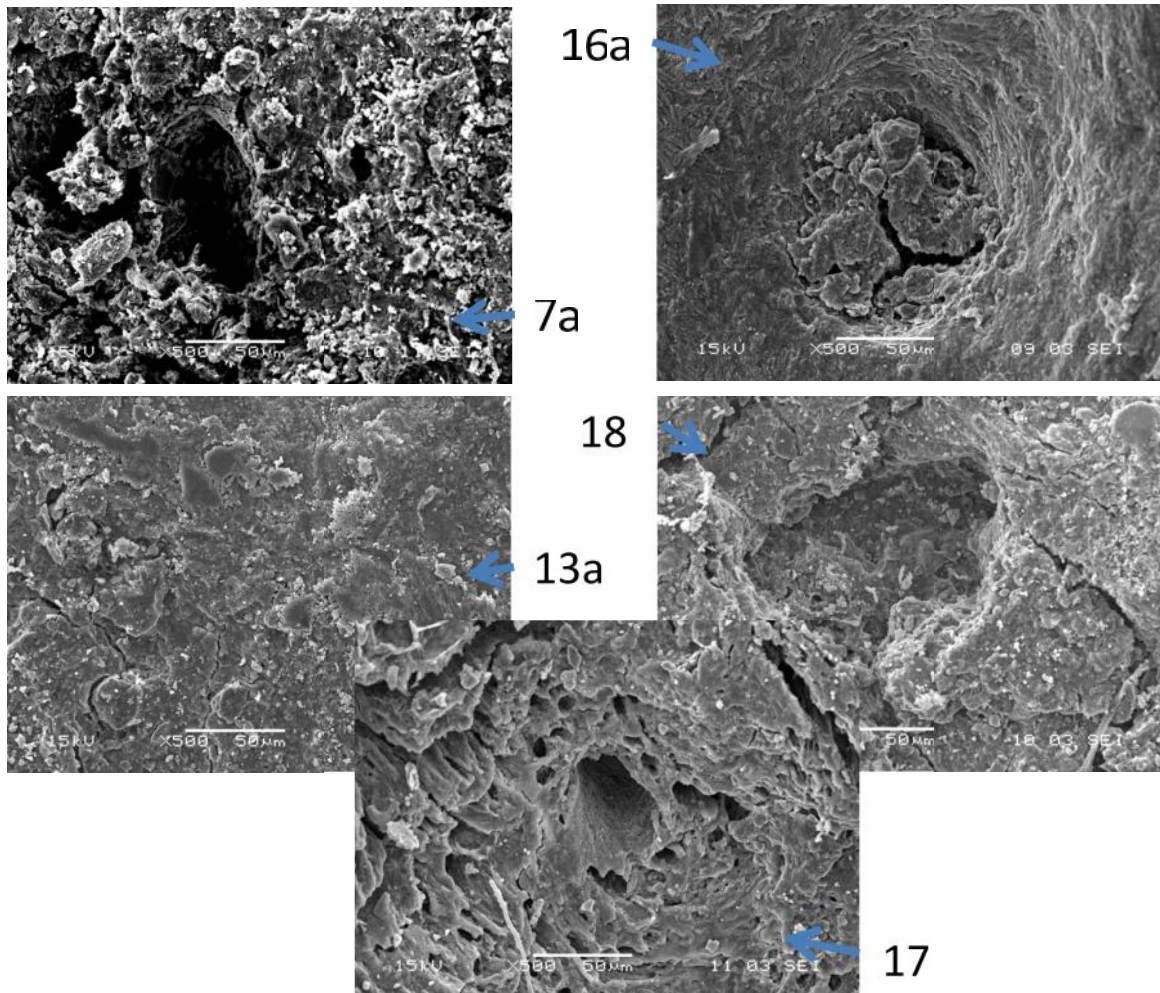


Marea scobitura sciatica, larga (scor 1)

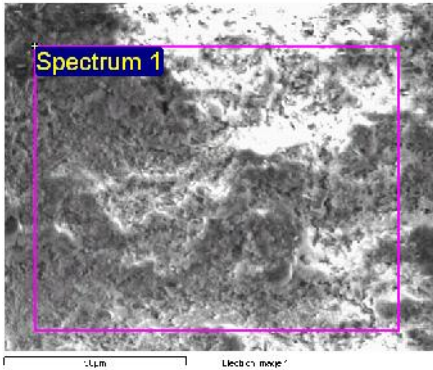
Radiografii dentare: - contribuie la rafinarea datelor privind varsta la momentul decesului



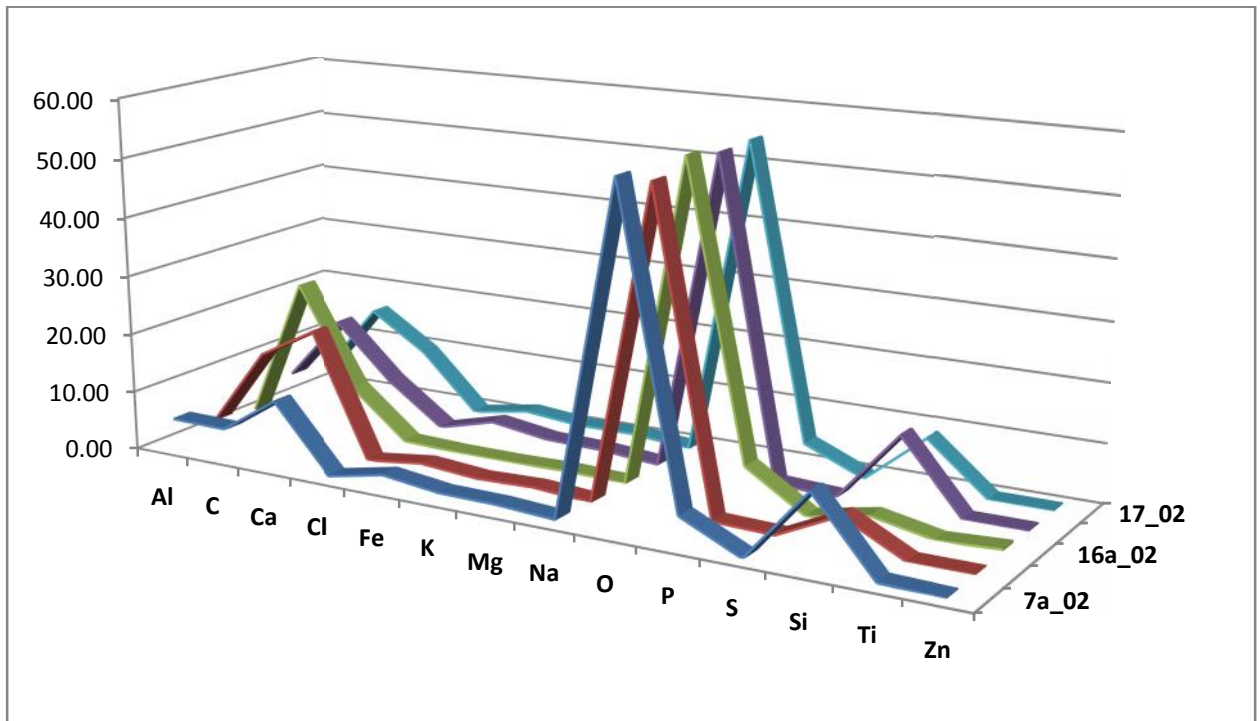
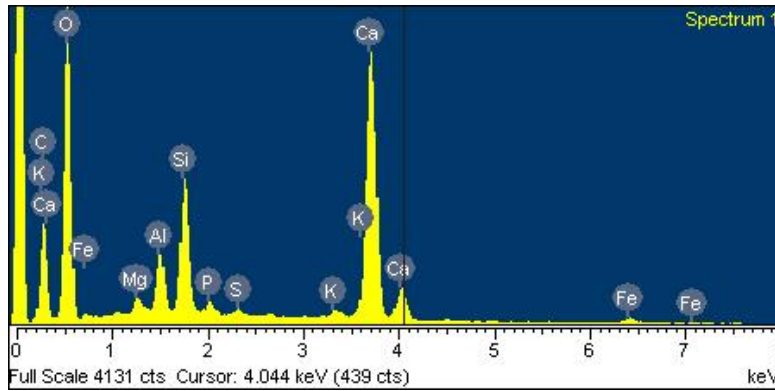
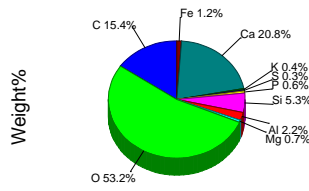
Analizele SEM/EDX permit investigarea imagistica a suprafetelor si analiza elementala a acestora. Pot contribui la caracterizarea modificarilor oaselor in timpul procesului de incinerare, pot da detalii despre structura unor materiale (textile, metale) cu implicatii in caracterizarea structurii acestora si proceselor lor de prelucrare.



Suprafata unor oase arheologice inhumate (17) si incinerate la diverse temperaturi (7a si 13a – temperaturi mari; 16a si 18 – temperaturi sub 600° C).

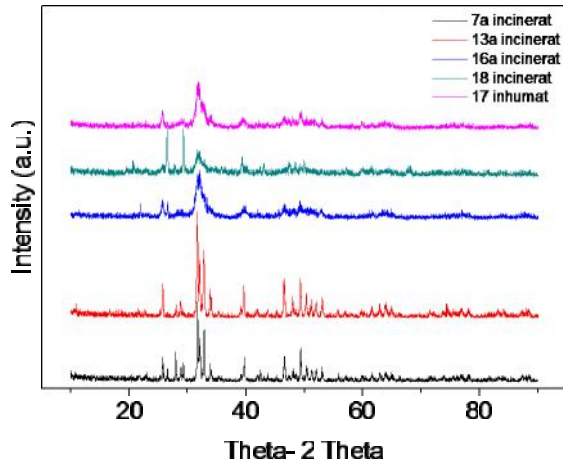


Quantitative results



Analiza elementara SEM/EDX a unui fragment osos incinerat (permite estimarea semicantitativa preliminara a raportului Ca/P, si concluzii privind procesul de diagenaza osoasa corelata cu incinerarea).

Analiza XRD - permite identificarea substantelor cristaline din fractiunea minerala a osului si determinarea dimensiunilor cristalitelor care la randul ei permite estimarea temperaturilor de ardere.



Determinarea temperaturilor de ardere prin XRD (7a si 13 a – temperaturi ridicate de ardere; 16a, 18 – temperaturi scazute de ardere; 17 – inhumat)

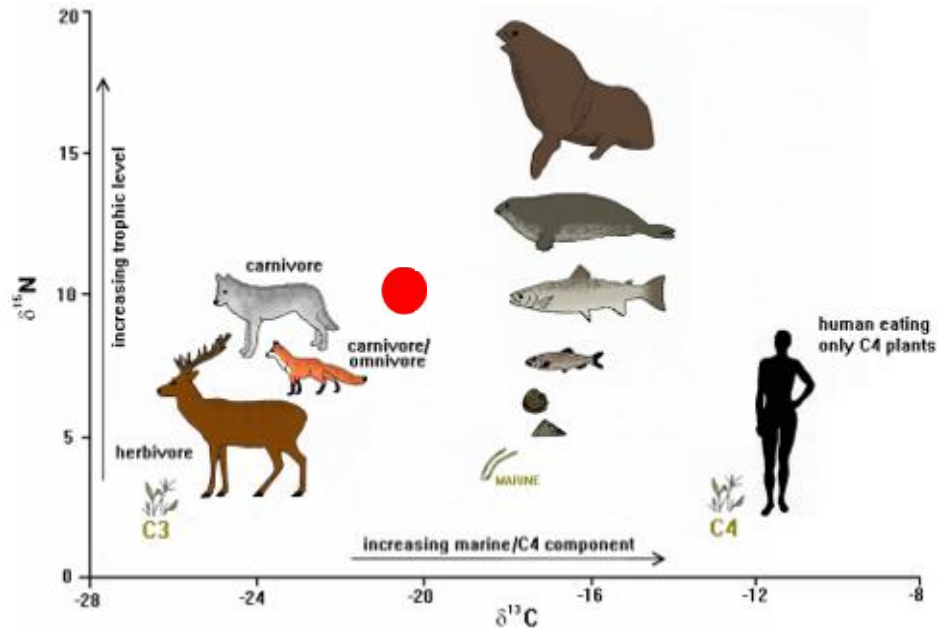
Datare cu ^{14}C si reconstructia dietei cu ajutorul analizelor de fractionare a izotopilor stabili de C si N

Probele analizate:

Proba	Locatie	Sex	Varsta biologica (ani)	Varsta conventi onala +/- 30 ani	C	N
"Vlaicu"	Curtea de Arges	barbat	adult	610	-18.90	11.00
M7	Feleac	femeie	copil	580	-19.60	9.40
M9	Feleac	barbat	copil	330	-19.30	8.90
M10	Feleac	femeie	adult	670	-19.00	10.20
M11	Feleac	nedeterminat	copil	340	-19.50	9.10
M15	Feleac	barbat	adult	210	-19.40	11.00

Rezultatele analizelor de izotopi stabili de C si N permit estimarea dietei indivizilor analizati. Fractionarea izotopilor stabili de C indica ponderea de sursa vegetala cu fotosinteza de tip C3 si C4 in

alimentatie, in timp ce valoarea raportului dintre izotopii stabili de N indica nivelul trofic al individului pentru care au fost obtinute masuratori.

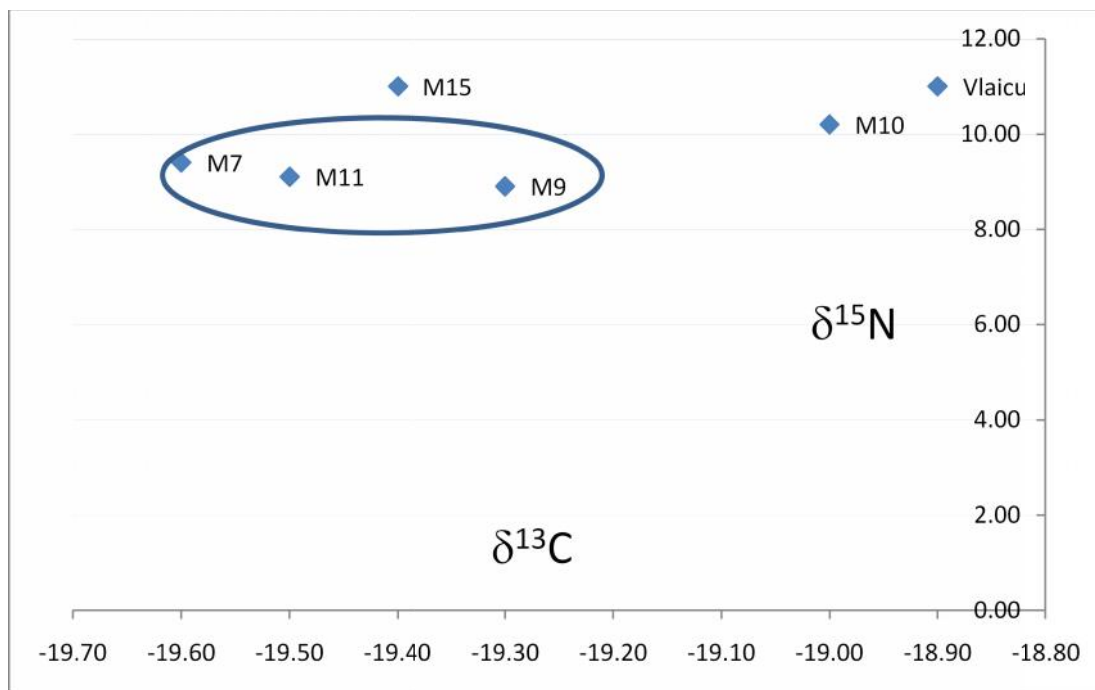


Area colorata indica pozitia trofica a probelor analizate in acest studiu preliminar

Proba	an calculat +/- 30	interval
"Vlaicu"	1340	1310-1370
M7	1370	1340-1400
M9	1620	1590-1650
M10	1280	1250-1310
M11	1610	1580-1640
M15	1740	1710-1770

Datarea probelor si intervalul probabil in care a survenit decesul

Intervalele temporare obtinute pentru resturile datate sugereaza ca sub pavimentul Bisericii Ortodoxe din Feleac s-au efectuat inhumari incepand cu sfarsitul secolului XIII pana in secolului XVIII. Numarul mic de probe analizate, specific unui studiu preliminar nu permite enuntarea unor concluzii mai amanuntite.



Tipare alimentare pentru probele analizate

Se observa aportul mai scazut de carne la copii (M7, M9, M11) comparativ cu adultii si la femeii (M10) comparativ cu barbatii (M15 si Vlaicu). Indivizii mai vechi din punct de vedere istoric prezinta un aport crescut de plante cu fotosinteza de tip C4 (mei) comparativ cu adultii mai recenti si copiii.

CONCLUZII:

- **Obiectivele si activitatile propuse pentru aceasta etapa au fost realizate in totalitate si permit continuarea desfasurarii proiectului in parametri asumati la contractare.**