

**RICERCHE ISTOLOGICHE ED IMMUNOCHEMICHE
SULLA SOSTANZA ORGANICA PRESENTE IN OSSA UMANE
DELL'ETA' DEL FERRO RINVENUTE NEL CASTELLIERE DI NIVIZE
SUL CARSO TRIESTINO**

RIASSUNTO

Gli AA., esposte alcune premesse metodologiche, presentano i primi risultati emersi da una serie di ricerche istologiche ed immunochimiche tendenti a dimostrare ed a definire la presenza e le componenti della sostanza organica in ossa umane dell'età del ferro. I primi dati dimostrerebbero l'esistenza di comunanze antigeniche tra le sostanze presenti negli estratti d'osso ed alcuni costituenti proteici del siero umano.

Per il presente studio ci siamo avvalsi di resti scheletrici umani rinvenuti in un pozzo carsico compreso nel castelliere dell'età del ferro di Nivize presso Trieste. Detto materiale, scoperto durante lavori di disostruzione ed esplorazione a scopo speleologico della cavità sopraccitata, è attualmente conservato presso la Società Alpina delle Giulie.

Associati ai resti scheletrici umani sono stati rinvenuti numerosi frammenti ceramici attribuibili all'età del ferro nonchè molte ossa di animali, domestici e selvatici, il cui studio è stato effettuato da Riedel (1968).

Con il nostro lavoro abbiamo inteso affrontare lo studio del materiale scheletrico umano dal punto di vista istologico e biochimico.

In considerazione della complessità e vastità del problema ci limiteremo a fornire con la presente nota i primi risultati emersi dalla ricerca e che, come tali, presentano valore essenzialmente metodologico.

Ci riserviamo di fornire risultati quantitativi, relativi all'intera popolazione studiata, in note seguenti.

MATERIALI E METODI

Il materiale scheletrico preso in esame consiste di parti provenienti da più individui rinvenute frammiste al detrito di riempimento della cavità. Non essendo nostro intendimento procedere allo studio antropometrico di dette ossa, ci siamo limitati a considerare i soli femori, tenuto conto della particolare ricchezza di tessuto organico che vi è in questi nel vivente, marcatamente nel collo e nella testa.

Complessivamente abbiamo riscontrato nel materiale conservato presso la Società Alpina delle Giulie 12 femori (7 sinistri e 5 destri) di cui alcuni frammentari.

Per lo studio ci si è premurati di non danneggiarli riguardo le loro caratteristiche fisico-geometriche effettuando i prelievi nella spongiosa e lasciando la corticale quanto più possibile intatta.

Dal materiale ora descritto abbiamo, innanzitutto, provveduto ad allestire dei campioni per lo studio istologico.

Ciò è stato fatto decalcificando alcuni frammenti di femore mediante trattamento con acido nitrico al 5% per 24 ore.

Il materiale così ottenuto è stato incluso in paraffina e sottoposto, dopo avere ricavato sezioni microtomiche da 5μ , alle consuete tecniche di colorazione dell'istologia: Ematossilina-Eosina, Van Gieson, PAS. I preparati sono stati osservati anche al microscopio polarizzatore. Le suddette metodiche ci hanno permesso di valutare il grado di conservazione della sostanza organica (osseina) del materiale in nostro possesso; ciò anche in vista dell'applicazione delle successive metodiche di estrazione che descriveremo ora.

Per i nostri scopi si è usata la spongiosa reperibile nelle teste e nelle parti limitrofe di ciascun femore. In particolare si è usato il femore denominato F4. Da questa spongiosa sono stati ricavati estratti secondo i tre metodi seguenti:

- a) Estrazione con acido (E.A.):
2 gr. di spongiosa per 20 ml. di HCl 5N; agitazione magnetica a $+4^{\circ}\text{C}$ per 24 ore.
- b) Estrazione alcalina (E.OH):
2 gr. di spongiosa per 20 ml. di NaOH 10%; agitazione magnetica a $+4^{\circ}\text{C}$ per 24 ore.
- c) Estrazione con Na-EtilenDiaminTetrAcetato 2% (E. EDTA):
portato a pH7 con NaOH; sempre in proporzione di 2 gr. di polvere per 20 ml. di solvente. L'agitazione è stata condotta a $+4^{\circ}\text{C}$ per una notte.

Prescindendo dal tipo, tutti gli estratti vennero poi trattati con la seguente metodica:

Dialisi in tubo di cellophane contro H_2O a $+4^{\circ}\text{C}$ per 8 ore (fino a risultare l'estratto a $\text{pH} \simeq 7$).

Dopo questa operazione gli estratti presentavano un sedimento-precipitato; vennero quindi sottoposti a centrifugazione a 5000 giri per 15'.

Sia nel caso dell'E.OH che dell'E.EDTA, il sedimento venne scartato e si conservò solo la frazione sopranatante; dell'E.A., invece, si conservò a parte anche il sedimento.

I sopranatanti, così ottenuti, vennero portati, con acido o base, alla neutralità e poi concentrati con Mini-Amicon® (*) fino a riduzione del volume ad 1:100. Successivamente vennero sottoposti ad immunoelettroforesi (Scheidegger, 1955) usando il siero antiumano da coniglio (**).

Infine sul sedimento dell'estratto acido, risospeso in poche gocce di soluzione fisiologica, vennero condotte le analisi elettroforetiche (Uriel, 1966) ed immunoelettroforetiche.

(*) Ditta Rastelli - Roma

(**) Ditta Hoechst - Milano

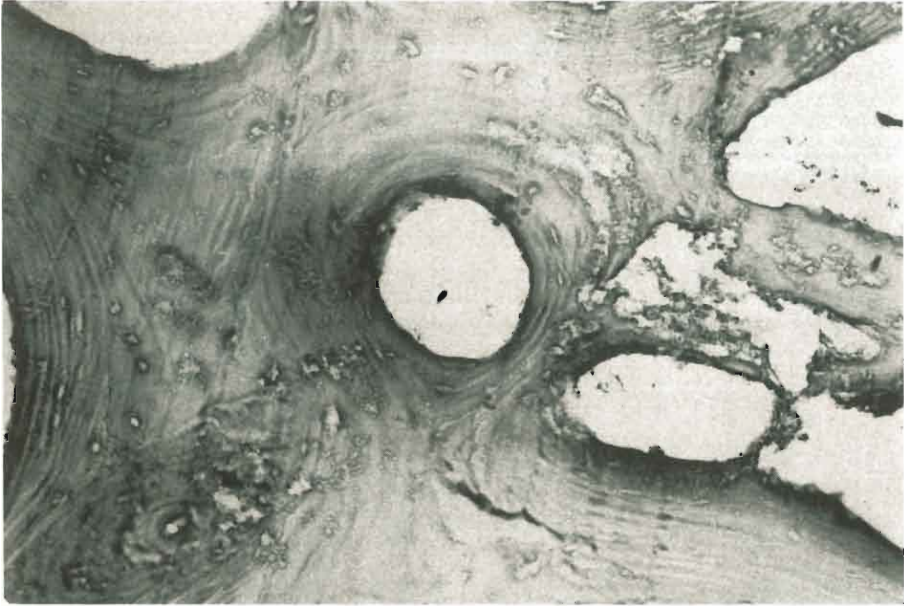


FIG. 1 — Colorazione Ematossilina-Eosina (100 x): osteoni della corticale femorale. Si notino le lacune osteocitiche site fra le lamelle ossee.
 Haematoxylin-Eosine Staining (100 x): osteones of the femoral cortical. Note the osteocytic lacunae lying between the osseus lamellae.



FIG. 2 — Colorazione Ematossilina-Eosina (640 x): lacune osteocitiche in corticale femorale; si noti la buona conservazione dei canalicoli a suo tempo occupati dai prolungamenti degli osteociti.
 Haematoxylin-Eosine Staining (640 x): osteocytic lacunae in femoral cortical; note the good state of the canaliculi once occupied by the osteocytes' prolongations.

RISULTATI

a) *Istologici*

Riguardo la prima parte del lavoro e cioè quella istologica, potremo subito dire che il materiale in studio ha dimostrato proprietà tintoriali simili a quelle dell'osso fresco.

In particolare si è riscontrata ottima tingibilità con l'ematosilina, discreta PAS-positività, colorazione tipica con metodo di Van Gieson. Dette metodiche hanno permesso di riconoscere strutture consuete dell'osso quali le lacune ossee ed i canalicoli occupati in vita dagli osteociti (Fig. 1-2).

La successiva osservazione al microscopio polarizzatore ha dimostrato la presenza dei sistemi di Havers (osteoni) e di quelli interstiziali (Fig. 3).

b) *Immunochimici*

Sono riprodotti nelle Fig. 4, 5, 6 i risultati delle analisi immunoelettroforetiche ed elettroforetiche eseguite, come descritto in precedenza, sugli estratti oggetto di questo lavoro.

La figura 4 riproduce l'immunoelettroforesi dell'E. A. e dell'E. OH:

- a) estratto alcalino: sulla duplice colorazione di fondo, estendentesi dall'anodo al catodo, sono visibili un netto arco di precipitazione in regione catodica e un debole ma nitido arco di precipitazione in zona anodica. La vicinanza, al solco di semina dell'antisiero, dell'arco di precipitazione catodico dipende per l'elevata diffusibilità dell'antigene e quindi per il suo relativamente piccolo peso molecolare.
- b) Estratto acido: è visibile solo un arco di precipitazione in zona catodica, contrapposto a quello dell'E. OH, ma meno definito.

La povertà di precipitati forniti da questo estratto e il suo particolare aspetto «flocculoso» ci hanno indotti ad eseguire l'immunoelettroforesi sul suo sedimento, il risultato è riprodotto dalla Fig. 5. Nella zona anodica è presente un arco di precipitazione che sembra equivalente a quello comparso nell'esame dell'E. OH; sono peraltro rilevabili anche due debolissimi archi di precipitazione, che appaiono fusi nella loro parte più prossimale al pozzetto di semina. La loro vicinanza al solco di semina dell'antisiero suggerisce, come già prima accennato, l'elevata diffusibilità degli antigeni e quindi il loro relativamente piccolo peso molecolare. Lo stesso sedimento è stato sottoposto ad elettroforesi (Fig. 6). Con tale metodica sono state evidenziate, su una modesta colorazione di fondo, una debole banda in zona albuminica ed una in zona prealbuminica.

DISCUSSIONE

Le ricerche a sfondo biochimico sull'osso antico non rappresentano una novità. Detti studi hanno infatti già portato ad alcuni risultati interessanti e con ciò intendiamo alludere al riconoscimento di costituenti fondamentali della sostanza organica presente nel tessuto osseo. Ci riferiamo in particolare all'identificazione di alcuni aminoacidi sia costituenti del collagene che di altre proteine,



FIG. 3 — Colorazione Ematossilina-Eosina (100 x): stesso campo della Fig. 1 osservato in luce polarizzata.
 Haematoxylin-Eosine Staining (100 x): same field as Fig. 1 observed in polarized light.

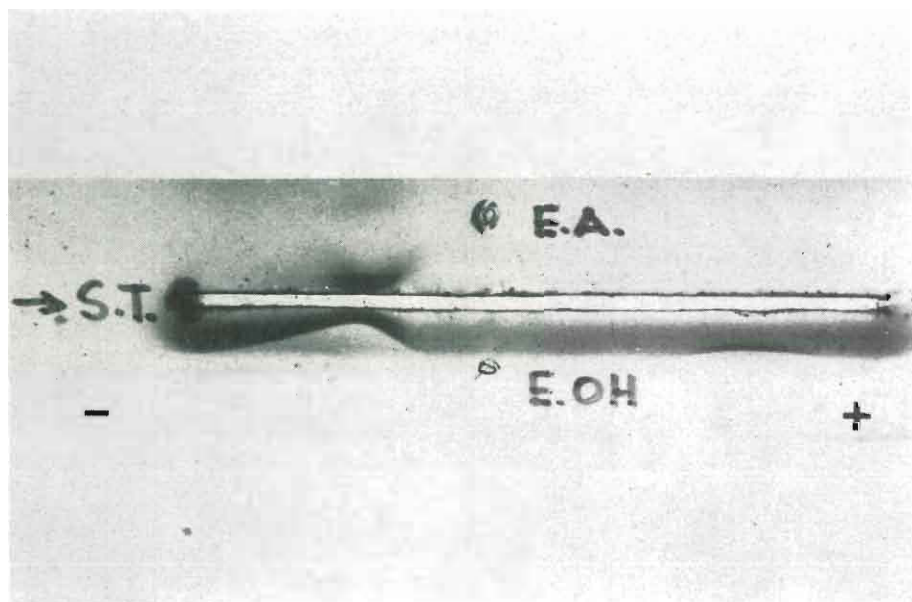


FIG. 4 — Tracciato immunoelettroforetico degli estratti acido e alcalino.
 Immunoelectrophoretic pattern of the acid and alkaline extracts.

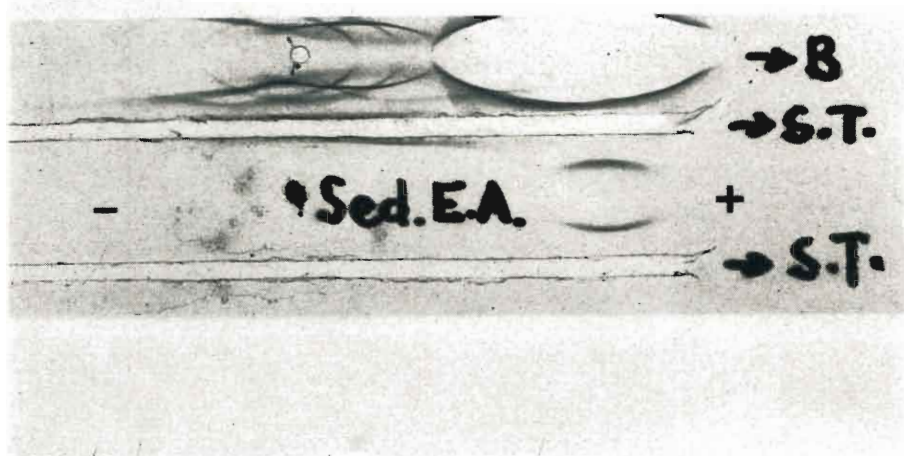


FIG. 5 — Tracciato immunoelettroforetico del sedimento dell'estratto acido (Sed. E. A.), comparato con quello di un siero umano normale (→ B).

Immunoelectrophoretic pattern of the sediment of the acid extract (Sed. E. A.), compared with one of a normal human serum (→ B).

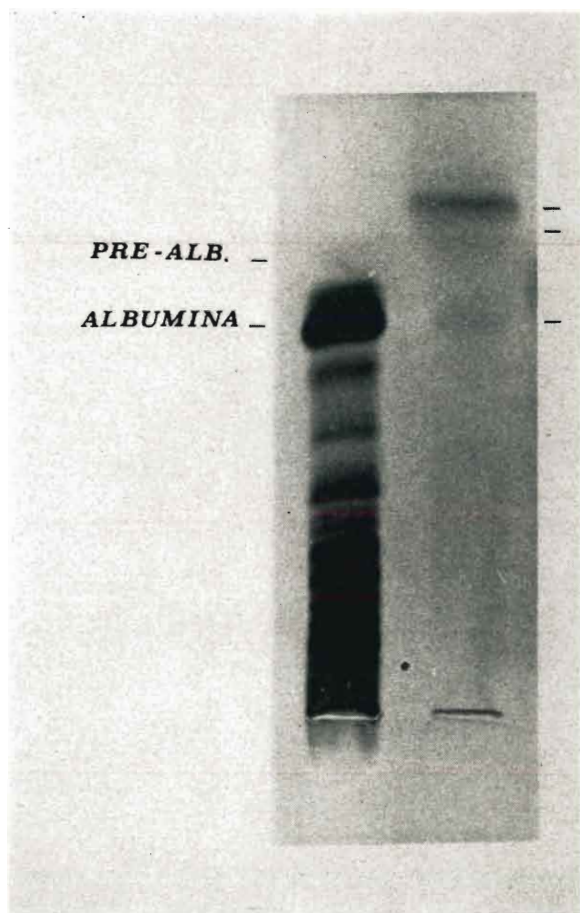


FIG. 6 — Tracciato elettroforetico del sedimento dell'estratto acido (a destra) comparato con quello di un siero umano normale (a sinistra).

Electrophoretic pattern of the sediment of the acid extract (on the right) compared with one of a normal human serum (on the left).

nonchè di polisaccaridi ed in specie del L-fucosio, D-galattosio, N-acetilglucosamina, N-acetilgalattosamina, i quali formano la parte prostetica della molecola responsabile della specificità di gruppo sanguigno nel sistema A-B-O.

In Italia gli studi relativi alla biochimica dell'osso antico sono stati sviluppati in particolare da Corrain e dalla sua Scuola (Corrain et al., 1962; Corrain, 1964; Corrain, 1965; Capitanio, 1968 etc); quelli relativi alla determinazione dei gruppi sanguigni A-B-O dall'Istituto di Antropologia dell'Università di Pisa (Borgognini et al., 1967; Borgognini, 1968; Borgognini-Tarli e Paoli, 1969 etc).

E' nell'ambito di tale studio che abbiamo inteso portare avanti la nostra ricerca. In particolare abbiamo affrontato preliminarmente il problema dal punto di vista istologico.

Le metodiche da noi usate ci hanno così permesso di riconoscere nell'osso antico caratteristiche tintoriali tipiche dell'osso fresco. Ciò si accorda nelle sue grandi linee con i reperti di Ascenzi (1964).

Ottenuta così la dimostrazione della buona conservazione della matrice organica nell'osso in studio, abbiamo inteso procedere all'identificazione di alcuni componenti della stessa. Sulla base dei risultati elettroforetici ed immunoelettroforetici precedentemente esposti possiamo dire che:

- 1) sono rilevabili comunanze antigeniche fra le sostanze presenti negli estratti d'osso ed i costituenti del siero umano. Queste sembrano esser dovute a proteine di peso molecolare relativamente piccolo, migranti in regione prealbuminica, albuminica e globulinica.

Il dato esposto è tuttavia di difficile valutazione essendo possibile una azione litica dei solventi usati su proteine a elevato peso molecolare eventualmente presenti.

- 2) Le diverse tecniche di estrazione della sostanza organica dall'osso, non hanno dato risultati sovrapponibili. Allo stadio attuale delle ricerche, quella effettuata con NaOH appare la migliore.
- 3) I dati fin qui acquisiti permettono comunque di prospettare un ulteriore affinamento delle tecniche di identificazione delle sostanze presenti nell'osso mediante l'uso di immunoelettroforesi con antisieri specifici per le singole proteine seriche.

In particolare ciò dovrebbe essere fatto per identificare quelle a più basso peso molecolare.

CONCLUSIONI

Una volta accertata la presenza nell'osso antico di sostanza organica abbondante e con caratteristiche tintoriali simili a quelle dell'osso fresco, ci è stato possibile, mediante opportune metodiche di estrazione, procedere al riconoscimento di alcune frazioni molecolari dello stesso.

In particolare abbiamo potuto riconoscere all'immunoelettroforesi alcune sostanze aventi comunanze antigeniche con quelle presenti nel siero umano.

GUGLIELMO ANTONUTTO - MAURO MELATO - ANTONIO PEZZOLI

**HISTOLOGICAL AND IMMUNOCHEMICAL INVESTIGATIONS
ON THE ORGANIC SUBSTANCE PRESENT IN HUMAN BONES
OF THE IRON AGE FOUND IN THE CASTELLAR OF NIVIZE
ON TRIESTE'S CARSO**

SUMMARY

The authors, after having made some preliminary remarks on the methods used, present the first results obtained from a series of histological and immunochemical investigations aimed at showing and defining the components and the presence of the organic substance in human bones of the Iron Age. The first data reveal the existence of common antigenic points between the substances present in the bone extracts and some proteic components of the human serum.

For this study we used human skeletal remains found in a pit inside the Iron Age castellar of Nivize near Trieste. This material, discovered during speleological diggings and explorations of the above mentioned cavity, is now kept at the Società Alpina of the Julian Alps.

Together with the human skeletal remains, many ceramic fragments belonging to the Iron Age were also found, as well as many domestic and wild animal bones which have been studied by Riedel (1968).

The aim of our research was to study the human skeletal material from a histological and biochemical point of view.

Due to the complexity and vastness of the problem, for the time being we shall only give the first results of the research which, as such, are of a pure methodological importance.

We intend to publish quantitative results, relevant to the entire population, studied, as soon as possible.

MATERIAL AND METHODS

The skeletal material studied consisted of bones belonging to several individuals found among the debris inside the cavity. As we did not intend to carry out an anthropometric study of these bones, we just studied the femora because of the particular abundance of organic tissue present in the fresh bone especially in the neck and head.

Out of the material preserved at the «Società Alpina», we found altogether 12 femora (7 left and 5 right) some of which were in fragments.

During the study we took care not to damage them due to their physico-geometric characteristics. Therefore we took the extracts from the spongiosa, leaving the cortical as intact as possible.

The first thing we did was to prepare some samples for the histological study.

This was done by decalcifying some femoral fragments by means of a 5% solution of nitric acid for 24 hours.

Then the material was placed in paraffin and, after having extracted 5μ microtomic sections, it underwent the usual histological staining process: Haematoxylin-Eosine, Van Gieson, PAS.

The preparations were also examined under a polarizing microscope.

With the above methods we were able to assess the state of preservation of the organic substance (ossein) of the material in our possession; this was also done in view of the application of the other methods of extraction which we are now going to describe.

For our study we used the spongiosa present in the heads and in the adjacent parts of each femur. We used in particular the femur called F4. Extracts from this spongiosa were obtained according to the following 3 methods:

a) Extraction by means of acid (E.A.):

2 gr. spongiosa per 20 ml. of NaOH 10%; magnetic stirring at $+4^{\circ}\text{C}$ for 24 hours.

b) Alkaline Extraction (E.OH):

2 gr. of spongiosa per 20 ml. of NaOH 10%; magnetic stirring at $+4^{\circ}\text{C}$ for 24 hours.

c) Extraction by means of Na-Etilendiaminotetracetic 2% (E. EDTA):

brought to pH7 with NaOH; always 2 gr. of powder per 20 ml. of solvent. Excitation was carried out at $+4^{\circ}\text{C}$ for one night.

With the exception of the type, all the extracts were treated with the following method:

Dialysis in cellophane tubes against H_2O at $+4^{\circ}$ for 8 hours (until the extract was brought to $\text{pH} \simeq 7$).

After this process the extracts revealed the presence of a precipitated sediment; they then underwent centrifugation at 5000 rev/min for 15 minutes.

Both in the case of E.OH and E.EDTA, the sediment was eliminated and only the supernatant portion was kept; however in the E.A.'s case the sediment was also kept.

At this point the supernatants were neutralized with acid or bases and then concentrated with Mini-Amicon® (*) until the volume was reduced to 1:100. Afterwards they underwent immunoelectrophoresis (Scheidegger, 1955) using the rabbit antihuman serum (**).

Electrophoretic (Uriel 1966) and immunoelectrophoretic analyses were carried out only on the sediment of the acid extract, suspended in a few drops of physiological solution.

(*) Rastelli firm - Rome

(**) Hoechst firm - Milan

RESULTS

a) *Histological*

As far as the first part of the research is concerned, namely the histological one, we can say straight away that the material studied revealed staining properties similar to those of a fresh bone.

In particular staining with haematoxylin was excellent; a fairly good positivity with PAS; typical staining with Van Gieson's method.

These methods enabled us to recognise the usual structures of the bone such as the osseous lacunae and the canaliculi where the osteocytes are to be found in a fresh bone (Fig. 1-2).

After having examined this under a polarizing microscope we discovered the presence of Havers's systems (osteones) and the interstitial ones.

b) *Immunochemical*

Figs. 4, 5, 6 show the results of the already mentioned immunoelectrophoretic and electrophoretic analyses of the extracts by us studied.

Fig. 4 shows the immunoelectrophoresis of E.A. and E.OH:

- 1) alkaline extract: a clear arc of precipitation in the cathodal region and a weak but clear one in the anodic region can be seen against the double staining in the background, running from the anode to the cathode. The proximity of the cathodal arc of precipitation to the antiserum seeding furrows shows the wide diffusibility of the antigen and its relative light molecular weight.
- 2) acid extract: an arc of precipitation is only visible in the cathodal region, as opposed to the E.OH one, but this arc is less clear. Due to the low number of precipitates provided by this extract and its particular «floculous» aspect, we carried out an immunoelectrophoresis on its sediment; the result can be seen in Fig. 5. In the anodic region there is an arc of precipitation which looks similar to the one seen in the E.OH test; there are also two very faint arcs of precipitation which appear fused in the region nearest the seeding furrow. Their proximity to the antiserum seeding furrow suggests, as we already mentioned, the wide diffusibility of the antigens and consequently their relatively light molecular weight. This same sediment underwent electrophoresis (Fig. 8). With this method, against a light background staining, faint bands in the albuminous region and the pre-albuminous region could be seen.

DISCUSSION

Biochemical tests on ancient bones are not a novelty. They have already produced some interesting results such as the identification of fundamental components of the organic substance present in the bony tissue. We are referring in particular to the identification of certain amino acids, be they components of collagen or other proteins, as well as the polysaccharides and especially L-

fucose, D-galactose, N-acetylglucosamines, which form the prosthetic part of the molecule responsible for the specificity of the ABO blood group.

In Italy studies on the biochemistry of ancient bones have been elaborated in particular by Corrain and his School (Corrain et al., 1962; Corrain, 1964; Corrain, 1965; Capitanio, 1968, etc.). Studies on the determination of ABO blood groups have been carried out by the Antropological Institute at the University of Pisa (Borgognini et al., 1967; Borgognini, 1968; Borgognini-Tarli and Paoli, 1969 etc.).

We therefore carried out our research in the context of the above mentioned studies. We preliminarily examined the problem from a histological point of view.

With our methods we were able to distinguish, in the ancient bone, staining properties peculiar to a fresh bone. This generally falls in line with the discoveries made by Ascenzi (1964).

Having thus proved the good state of the organic substance in the bone, we proceeded to the identification of some of its components. On the basis of the electrophoretic and immunoelectrophoretic results already described we can say the following:

- 1) There are common antigen characteristics between the substances present in the bone extracts and the components of the human serum. These seem to be due to the proteins of a relatively light molecular weight, migrating in the prealbuminous, albuminous and globulin regions.

However it is difficult to evaluate this fact because a lithic action of the solvents used on proteins with a heavy molecular weight, if present, is not excluded.

- 2) The different methods for extracting the organic substance from the bone have not given overlapping results. At present, out of all the researches carried out the one with NaOH is the best one.
- 3) However, with the data so far obtained, we can expect a further improvement of the methods used for identifying the substances present in the bone by means of immunoelectrophoresis with specific antisera for each serum protein. This should be done in particular for the identification of proteins with a lighter molecular weight.

CONCLUSION

Once we established the presence of abundant organic substances in the ancient bone and the staining characteristics similar to the ones of a fresh bone, we were then able, using appropriate extraction methods, to proceed to the identification of some of its molecular sections.

During the electrophoresis we were able to identify some substances which had antigenic points in common with the ones present in the human serum.

BIBLIOGRAFIA - REFERENCES

- ASCENZI A.: «*Microscopia e osso preistorico*».
Rivista di Antropologia LI, 5-21, 1964.
- BORGOGNINI S., BARTOLONI S., OMER C.: «*Determinazione dei gruppi sanguigni ABO in un gruppo di scheletri eneolitici provenienti dalla necropoli di Ponte S. Pietro*».
Arch. per l'Antropologia e l'Etnologia XCVII, 1/2, 35-46, 1967.
- BORGOGNINI S.: «*Dimostrazione della presenza di alcuni costituenti fondamentali delle sostanze gruppo specifiche ABO in ossa di diversa antichità*».
Atti Soc. Tosc. Sci. Nat. Mem., LXXV, 202-217, 1968.
- BORGOGNINI - TARLI S. M., PAOLI G.: «*Biochemical and Immunological Investigations on Early Egyptian Remains*».
Journal of Human Evolution 1, 281-287, 1972.
- CAPITANIO M.: «*La conservazione della sostanza organica in denti umani di epoche diverse*».
Istituto di Antropologia dell'Università di Padova - 1968.
- CORRAIN C., FASSINA G., GALLO P.: «*Ricerche sulla sostanza organica di ossa umane antiche*».
Archivio per l'Antropologia e l'Etnologia, XCII, 421-435, 1962.
- CORRAIN.: «*Altre ricerche sulla sostanza organica in ossa umane antiche*».
Atti della VIII e IX Riunione Scientifica dell'Istituto Italiano di Preistoria e Protostoria, Trieste 19-20 Ottobre 1963 - Calabria 6-8 Aprile 1964.
- CORRAIN C.: «*Ulteriori indagini sulla sostanza organica in ossa umane antiche*».
Biochimica e Biologia Sperim. IV, 211-216, 1965.
- RIEDEL A.: «*I mammiferi domestici del castelliere di Nivize del Carso Triestino*».
Atti e Memorie della Comm. Grotte E. Boegan, VIII, 125-144, 1968.
- SCHEIDEGGER J.J.: «*Une micromethode de l'immuno-electrophorese*».
Ist. Arch. Allergy 7, 103, 1955.
- URIEL J.: «*Methode d'electrophorese dans des gels d'acrylamyde-agarose*».
Bull. Soc. Chim. Biol. 48, 969, 1966.