

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ 21ΗΣ ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 1968

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΙΣ ΜΗ ΜΕΛΩΝ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ.— Vergleichende Untersuchungen über den Aminosäuregehalt menschlicher Knochen verschiedener Zeitalter sowie fossiler Knochen und Mollusken, I.*, von *A. Oekonomidis, Chrysanthi Pavlopulu-Papakosta und Anast. A. Christomanos*** . Ἀνεκοινώθη ὑπὸ τοῦ Ἀκαδημαϊκοῦ κ. Γ. Ἰωακείμογλου.

Es ist seit langem bekannt dass die Aminosäuren und die Proteine sehr schnell einer bakteriellen Zersetzung anheimfallen indem, hauptsächlich durch reduktive Desaminierung und Dekarboxylierung, niedere stickstofffreie Produkte entstehen, die nachher weiter abgebaut werden. Im Gegensatz dazu zeigen manche Aminosäuren gegenüber oxydativer Einwirkung, selbst bei erhöhter Temperatur, eine grössere Widerstandsfähigkeit (1).

Es war daher sehr bemerkenswert, dass trotz der unvermeidlichen bakteriellen Einwirkung, Aminosäuren in einen bei Ausgrabungen in London aufgefundenen fossilen Rinocerosknochen festgestellt werden konnten (2).

Dieser Befund veranlasste uns auch den Aminosäuregehalt von Menschenknochen verschiedener Zeitalter, sowie der Knochen eines bei Nea Apollonia in Mazedonien aufgefundenen fossilen Tierskelettes

* Α. ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΗ, ΧΡΥΣΑΝΘΗΣ ΠΑΥΛΟΠΟΥΛΟΥ-ΠΑΠΑΚΩΣΤΑ καὶ ΑΝΑΣΤ. Α. ΧΡΗΣΤΟΜΑΝΟΥ, Συγκριτικὴ ἔρευνα περὶ τῆς εἰς ἀμινοξέα περιεκτικότητος ἀνθρωπίνων ὀστέων παρωχημένων περιόδων ὡς καὶ ἀπολιθωμάτων ζώων καὶ μαλακίων, I.

** Aus dem Biochemischen Institut der Universität Thessaloniki und dem Institut für Marine Biologie und Biochemie in St. Georg bei Limni auf Euboea.

und ebenfalls fossiler Molluskenschalen aus der Gegend des ehemaligen Volvi Sees, zu bestimmen.

Das in Nea Apollonia aufgefundene Tierskelett wurde zuerst für das eines Sauriers gehalten, spätere eingehende Untersuchung der ausgegrabenen Knochenteile, — der Kopf des Tieres konnte bis heute noch nicht gefunden werden —, ergaben nach dem Gutachten von J. Melentis der Athener Universität, dass es sich um Knochenteile eines Elefanten, des *Paleoloxodon antiquus*, aus dem mittleren Pliocän handelt, also einem Alter von ca 300.000 Jahren entspricht. Es ist das erste mal dass fossile Elefantenknochen in der Gegend des Volvi Sees gefunden worden sind. Fossile Knochen der gleichen Tierart wurden in den Gegenden von Amyntaion, Ptolemais und in den Sümpfen bei Philippi, ebenfalls in Mazedonien gefunden.

M E T H O D I K

Was die Methodik unserer Untersuchungen anbelangt, so wurde diese andersorts ausführlich beschrieben (3), daher möge die von uns befolgte Arbeitsweise, kurz erwähnt werden.

Die Knochenstücke werden wiederholt gründlich mit dest. Wasser ausgekocht und dannach mit 95% Äthylalkohol im Soxhlet Apparat extrahiert und in 6 N HCl gelöst, die HCl auf dem Wasserbad verdampft, und der Rückstand im geschlossenen Rohr bei 105° mit 6 N HCl während 48 St. hydrolysiert. Nach Verdampfung der HCl und nachfolgender Aussalzung im Elektrolysenapparat über Quecksilber wird die salzfreie Lösung zur zweidimensionalen absteigenden Chromatographie nach den üblichen Methoden verwendet. Gleichzeitig wurden, in den meisten der Fälle, parallele zur Chromatographie Mikrokjeldahlbestimmungen zur Bestimmung des Gesamt-N der zur Chromatographie verwendeten Lösung durchgeführt.

R E S U L T A T E

Die Resultate unserer Untersuchungen können folgendermassen zusammengefasst werden:

A. Frische Menschenknochen.

Ein Knochenstück aus einen Wirbel eines an einen Unfall verstorbenen Mannes ergab fast alle in den Proteinen vorkommenden Amino-

säuren ausser Tryptophan. Es konnten Spuren von Taurin festgestellt werden, dagegen waren die Werte für Lysin, Prolin und Oxyprolin sehr hoch.

B. Zehn Jahre alte Menschenknochen.

Ein Stück des Okzipitalknochens eines Schädels (Sammlung Prof. Savas) ergab ebenfalls sämtliche in den Proteinen vorkommenden Aminosäuren, allerdings die Werte lagen etwas niedriger, dieses gilt hauptsächlich für Lysin, Prolin und Oxyprolin. Taurin konnte nicht festgestellt werden.

C. Circa 1000 Jahre alter Menschenknochen.

Es wurden Teile des Femurs aus einem Grab bei St. Achileus des kleinen Prespa Sees untersucht. Sämtliche Aminosäuren konnten festgestellt werden, aber in bedeutend niedrigeren Werten.

D. Menschenknochen aus den Spätmykänischen Gräber bei Perati in Attika, ca. 3000 Jahre alt.

Die uns zugesandten kleine Knochenstücke aus verschiedenen nummerierten Gräber (Sammlung Dr. Paidussis) zeigten nur Spuren von Lysin und Arginin. Prolin konnte nur in Spuren in einem Fall festgestellt werden, Tyrosin fehlte in allen untersuchten Knochenproben, dagegen konnten in den Knochenstücke aus vier der sechs untersuchten Grabstätten Oxydationsprodukte des Cysteins sichergestellt werden.

E. Fossile Knochen des Elefanten *Paleoloxodon antiquus*, ca. 300.000 Jahre alt (4).

Es kamen zur Untersuchung Stücke aus den Wirbeln und einer Rippe. Folgende Aminosäuren wurden gefunden: Glutamin- und Asparaginsäure, Glykokoll, Serin, deutliche Anwesenheit von Alanin, Valin, und Leucin, ebenso konnten Oxydationsprodukte des Cysteins festgestellt werden.

F. Fossile Schalen der Muschel der Gattung *Anodonta*, ca. 100.000 - 300.000 Jahre alt (4).

Die Schalen dieser Muscheln, die um die Anhöhen rings um den heutigen Volvi See in Erosionsgraben zu finden sind, ergaben Glutamin- und Asparaginsäure, Serin, Glykokoll, Alanin, Prolin, Isoleucin, Leucin

und einen Ninhydrinpositiven Fleck mit dem gleichen Rf wie Tryptophan, ebenso konnten nur sehr undeutliche Spuren von Lysin und Arginin festgestellt werden.

G. Schalen der heute lebender Muscheln der Arten *Mytilus edulis*, *Ensis directus*, *Donax variabilis* und *Murex*.

In den Schalen obiger Mollusken konnten sämtliche in den Proteinen vorkommenden Aminosäuren festgestellt werden. Ein über dem Tyrosin befindlicher Ninhydrinpositiver Fleck könnte auf ein jodhaltiges Tyrosinabkömmling zurückgeführt werden. Oxydationsprodukte des Cysteins konnten nicht gefunden werden.

DISKUSSION DER RESULTATE

In allen der von uns untersuchten Knochenproben, selbst in den Fossilen Knochen und Mollusken, fanden wir eine grössere oder kleinere Zahl der in den Proteinen vorkommenden Aminosäuren. Oxydationsprodukte des Cysteins, konnten nur in einigen Knochenproben aus den Spätmykänischen Grabstätten bei Perati in Attika, als auch in den fossilen Elefantenknochen von Nea Apollonia gefunden werden. Durch Erhitzen frischer Menschenknochen auf 800⁰-900⁰ konnte festgestellt werden dass hauptsächlich die aromatischen und basischen Aminosäuren, ausserdem Serin, Prolin und Oxyprolin zerstört werden, während Glutamin- und Asparaginsäure, Glykokoll, Alanin, Valin und Leucin nur teilweise der Zersetzung anheimfallen.

Es ergibt sich nun die Frage wie die Anwesenheit der Aminosäuren über tausende von Jahren, ja selbst in den fossilen Knochen zu erklären ist. Es ist durch die Arbeiten verschiedener Forscher (5) bekannt geworden, dass die Aminodikarbonsäuren der entsprechenden Salze mit den Erdalkalien einhergehen. Ebenso sind die Diaminosäuren zur Bildung von Carbonat- und Phosphatsalze befähigt (6). Die Bildung aber der freien Aminosäuresalze setzt eine Spaltung des kollagenen Stützgewebes des Knochens voraus. Diese bakterielle Proteolyse des Knochenstützgewebes würde mit einer gleichzeitigen Diffusion, bzw. weitere Zersetzung der freiwerdenden Aminosäuren einhergehen. Es wäre demnach unwahrscheinlich dass noch nach 300.000 von Jahren Aminosäuren in den Knochen zu finden sind.

Aus diesem Grunde, neigen wir eher zur Annahme, dass die Grundsubstanz der Knochen, das sogenannte Osseomukoid, mitsamt der in ihm eingelagerten dichten Geflecht der kollagenen Faserbündel und den Hydroxylapatitkrystallen die durch Nebenvalenzen mit den Proteinen verbunden sind, für bakterielle Enzyme widerstandsfähig ist, und dass diese Eigenschaft durch das nach dem Tod erfolgende hineindiffundieren von Mineralsalzen, und deren Bindung an den freien $-\text{NH}_3^+$ und $-\text{COO}^-$ Gruppen des Gitterrostes der Polypeptidketten der Proteine der Knochengerüstsustanzen, eher zunimmt. Diese Annahme wird gestützt durch die schon von Grassmann (7) festgestellten Befund nach dem die kollagenen Fasern für Trypsin nicht angreifbar sind. Ebenso wurde vom gleichen Forscher festgestellt dass die Pepsinwirkung auf die kollagene erst dann einsetzt wenn die Fasern durch Säureeinfluss aufgequollen sind.

Diese Tatsachen bestärken unsere Annahme dass das Auffinden von Aminosäuren nach tausenden von Jahren erst auf die hydrolytische Spaltung durch die HCl dieses, sagen wir, versteinerten Komplexes der Proteingerüstsustanzen und der der Erdalkalien beruht.

Das Auffinden von Oxydationsprodukten des Cysteins, lässt vielleicht auf vorangegangener Oxydation durch Erhitzung der Knochen an der Luft (Brand), schliessen. Bei den in den Grabstätten von Perati aufgefundenen Knochereste ist diese Möglichkeit vorhanden, da auch von archäologischer Seite auf diese Möglichkeit hingewiesen wurde.

I I T E R A T U R

1. GARDIKI, V., A. DIMITRIADIS und A. CHRISTOMANOS: *Chimica Chronika*, 25A, S. 229, 1960 (Griechisch).
2. OAKLEY, K. P.: *Science in Archaeology, Analytical Methods of dating bones*, Thames and Hudson, London 1956, auch DEGENS, E. D. und H. SCHMIDT: *Paläontol. Zeits. B.* 40, S. 218, 1966.
3. PAVLOPULU, CHRYS., A. OEKONOMIDIS, EV. PAZIONIS und M. PAIDUSIS: *Folia Bioch. et Biol. Graeca*, Vol. IV, p. 103, 1968.
4. OEKONOMIDIS, A.: Vergleichende Chromatographische Untersuchungen des Aminosäuregehaltes fossiler Knochen, *Folia Bioch. et Biol. Graeca*, Vol. V, p. 6, 1968.
5. SOGNAES, R. F.: *Calcification in Biol. Systems*, Amer. Assoc. Adv. Sci. Publ. No. 64, 511, 1960, *ibidem* No. 75, 764, 1963.

- RAMANATHAN, N. : Collagen, Proc. Symp. Centr. Leather Research Inst. Madras India, John Wiley and Sons, New York - London, p. 579, 1962.
- HALL, D. A. : Intern. Review of Connective Tissue Res. Acad. Press Inc. New - York, Vol. 1, p. 401, Vol. 2, p. 350, 1962.
- MOSS, M. L. : Comp. Biol. of calc. Tissue : Ann. New - York Acad. Sci. Vol. 109, p. 1, 1963.
- WILBUR, K. M. and C. M. YONGE : Physiol. of Mollusca, Acad. Press Inc. Vol. 1, p. 473, 1964.
6. DEGENS, E. D. und H. SCHMIDT : Siehe Anm. 2.
7. GRASSMANN, W. : Collegium, S. 549, Darmstadt 1934 und Kolloid Zeit. B. 77, S. 205, 1936.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Knochenreste verschiedener Zeitalter auf ihren Gehalt an Aminosäuren untersucht. Es ergab sich, dass sämtliche untersuchte Proben Aminosäuren enthielten. Fossile Knochen eines Elefanten aus dem Pliocän, *Paleoloxodon antiquus*, enthielten keine basische und aromatische Aminosäuren, ebenso verhielten sich 3000 Jahre alte Menschenknochen. Dagegen wurden in beiden Fällen Oxydationsprodukte des Cysteins vorgefunden. Mit dem Alter des Knochens scheint ein paralleler Schwund der basischen und aromatischen Aminosäuren einherzugehen. Es wird die Vermutung ausgesprochen dass das Auffinden von Aminosäuren nach Verlauf grosser Zeiträume, auf eine durch bakterielle proteolytische Enzyme schwer angreifbare Komplexe Verbindung zwischen den Polaren Gruppen des Proteingitterrostes der kollagenen Stützsubstanz und der Erdalkalien zurückzuführen ist.

Eine auf den Aminosäuregehalt beruhende Zeitbestimmung der Knochen, könnte jedoch nur die systematische Analysen von Knochenproben historisch, bzw. geologisch absolut zeitlich definierter Proben gestützt werden. Solche Arbeiten sind im Gange.

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Ι Σ

Ἐξητάσθησαν διάφορα δείγματα ὀστῶν διαφόρων χρονολογιῶν ἐπὶ τῆς εἰς αὐτὰ ἐμπεριεχομένης ποσότητος ἀμινοξέων. Κατεδείχθη ὅτι ἅπαντα τὰ ἐξετασθέντα ὀστᾶ ἐνεῖχον ἀμινοξέα. Τὰ ὀστᾶ τοῦ παρὰ τὴν Νέαν Ἀπολλωνίαν ἀνευρεθέντος ἐλέφαντος τοῦ εἴδους *Paleoloxodon antiquus* ἐνεῖχον ἐπίσης ἀμινοξέα, πλὴν τῶν βασικῶν καὶ ἀρωματικῶν τοιούτων. Ὅμοίαν εἰκόνα παρουσίαζον καὶ

τὰ ἀνθρώπινα ὀστᾶ ἐκ τῶν ὑστερομυκηναϊκῶν τάφων ἐκ Περατῆς τῆς Ἀττικῆς, ἡλικίας περίπου 3000 ἐτῶν. Εἰς τὰς δύο ταύτας τελευταίας περιπτώσεις ἀνευρέθησαν, πλὴν τῶν ἀμινοξέων, καὶ προϊόντα ὀξειδώσεως τῆς κυστεΐνης, ἅτινα δὲν ἀνευρέθησαν εἰς τὰ ἕτερα ἐξετασθέντα δείγματα ὀστέων. Παραλλήλως πρὸς τὴν ἡλικίαν τῶν ὀστέων φαίνεται ὅτι καταστρέφονται τὸ πρῶτον τὰ βασικά καὶ ἀρωματικά ἀμινοξέα. Ἐκφράζεται ἡ ἄποψις ὅτι ἡ ἀνεύρεσις ἀμινοξέων ἐντὸς τῶν ὀστέων καὶ μετὰ πάροδον μεγίστων χρονικῶν διαστημάτων, ὡς π. χ. τοῦ ἐλέφαντος τοῦ ζήσαντος ἐν Μακεδονίᾳ πρὸ 300.000 περίπου ἐτῶν, ὀφείλεται εἰς τὸν σχηματισμὸν συμπλόκου ἐνώσεως μεταξὺ τῶν πολικῶν ομάδων τῆς ἐσχάρας τῶν πολυπεπτιδικῶν ἀλύσεων τῶν πρωτεϊνῶν τοῦ ὀστίτου ἰστοῦ καὶ τῶν γαιωδῶν ἀλκαλίων, ἥτις δυσκόλως προσβάλλεται ὑπὸ τῶν πρωτεολυτικῶν ἐνζύμων τῶν μικροβίων.

Προσδιορισμὸς τῆς χρονολογίας τῶν ὀστέων διὰ συγκριτικῆς ἀναλύσεως τῶν ἐν αὐτοῖς ἐμπεριεχομένων ἀμινοξέων θὰ ἠδύνατο νὰ γίνῃ μόνον κατόπιν συστηματικῆς ἀναλύσεως δειγμάτων ὀστέων διαφόρων ἀλλὰ γεωλογικῶς χρονολογικῶς προσδιορισμένων χρονολογιῶν. Ἡ ἐργασία αὕτη εὐρίσκεται ὑπὸ ἐκτέλεσιν.