

**A T T I**  
**DELLA**  
**SOCIETÀ TOSCANA**  
**DI**  
**SCIENZE NATURALI**  
**RESIDENTE IN PISA**

**MEMORIE - SERIE B**

**VOL. LXXXI - ANNO 1974**

## I N D I C E

ARRIGONI P. V. - La flora del Monte Ferrato . . . . .	Pag. 1
BARDAZZI S. - Il Monteferrato e l'agglomerato urbano pratese; aspetti paesistici ed ecologici . . . . .	» 11
CONEDERA C. - Variazioni fisico-morfologiche del Monte Ferrato per cause naturali e artificiali avvenute negli ultimi vent'anni . . . . .	» 21
CORTI R. - Caratteristiche generali della vegetazione del Monteferrato (Prato) . . . . .	» 32
CORTINI PEDROTTI C. - La vegetazione pioniera del Monte Ferrato (Prato) . . . . .	» 39
GAMBASSINI P. - La stazione paleolitica di Galceti (Prato) . . . . .	» 45
GUERRIERI F. - Il marmo verde di Prato nel policromismo architettonico . . . . .	» 52
NICOSIA F. - Aspetti archeologici del Monte Ferrato (Prato) . . . . .	» 77
PEDROTTI F. - Difesa e conservazione del Monteferrato (Prato) . . . . .	» 87
SARTI MARTINI L. - Materiale fitile dell'età del bronzo sul Monte Ferrato, presso Prato (Firenze) . . . . .	» 94
VINCIGUERRA G. - Situazione del vincolo idrogeologico sul Monte Ferrato (Prato) . . . . .	» 109
NAVARI IZZO F., LOTTI G., SOLDATINI G. - Distribuzione dello zinco nelle frazioni proteiche e subcellulari delle foglie di <i>Medicago sativa</i> . . . . .	» 120
PAOLI G., MALLEGNI F., PARENTI S. - Rapporti quantitativi fra L-Fucosio N-acetilesosamine e reazione IEA in estratti di ossa egiziane dinastiche . . . . .	» 136
BENAZZI LENTATI G. - Sulla eliminazione cromosomica nelle linee maschile e somatica delle planarie poliploidi . . . . .	» 154
PARDINI E., BASSI P. - Gli Etruschi. (Studio craniologico) . . . . .	» 161
MONTI G., TOMEI P. E. - Macromiceti della lucchesia - Primo contributo . . . . .	» 197
MAZZA M. - Variabilità ed anomalie negli scorpioni d'acqua euromediterranei ( <i>Heteroptera Nepidae</i> ) . . . . .	» 211
GIUSTI F. - Notulae Malacologicae XIX. (I generi <i>Paladilhioipsis</i> e <i>Sadleriana</i> ( <i>Prosobranchia</i> , <i>Hydrobioidea</i> ) nell'Italia appenninica) . . . . .	» 248
<i>Elenco dei Soci per l'anno 1974</i> . . . . .	» 259

G. PAOLI, F. MALLEGGNI, S. PARENTI \*

## RAPPORTI QUANTITATIVI FRA L-FUCOSIO N-ACETILESOSAMINE E REAZIONE IEA IN ESTRATTI DI OSSA EGIZIANE DINASTICHE \*\*

**Riassunto** — Viene determinato quantitativamente il contenuto in L-Fucosio ed in N-acetilesosamine in 100 ossa egiziane di età dinastica per la quasi totalità provenienti dalle due necropoli di Asiut e Gebelen e delle quali era stato precedentemente saggiato il gruppo sanguigno del sistema ABO. L'interesse della determinazione risiede nel fatto che i due monosaccaridi in parola sono fra i costituenti relativamente più specifici delle sostanze di gruppo ABO cosicché il loro rinvenimento può essere argomento in favore della possibilità di presenza delle sostanze di gruppo. La valutazione quantitativa del L-Fucosio è stata eseguita secondo la tecnica di M. N. Gibbons, quella delle N-acetilesosamine (in termini di equivalenza con la N-acetil-glucosamina) secondo il metodo di J. L. Reissig et Al. I risultati ottenuti hanno tra l'altro permesso di rilevare che esiste una connessione positiva e significativa tra intensità di reazione di inibizione della emoagglutinazione (IEA) e contenuto in L-Fucosio e N-acetilesosamine all'interno del campione d'Asiut e tra intensità di reazione IEA e quantità di L-Fucosio nel campione di Gebelen, suggerendo l'ipotesi che soprattutto quest'ultimo zucchero possa essere considerato sostanza capace di indicare la presenza di antigeni di gruppo negli estratti acquosi di polvere d'osso ottenuti nel modo che si usa nel nostro Istituto.

**Summary** — Biochemical analyses were carried out in one hundred samples of dynastic egyptian bones, almost entirely coming from the Asiut and Gebelen necropolis, already ABO typed, in order to determine their content in L-Fucose and N-acetylhexosamines which are the main specific components of the blood-group substances. The biochemical dosages were performed on aqueous extracts obtained from the same samples of bone powder previously ABO typed. Fucose determination was carried out using the specific method devised by M. N. Gibbons. Since the application of this method to heterogeneous samples of aqueous extracts from bone powder was rather inaccurate, the quantitative dosage was

---

\* Dipartimento di Storia naturale dell'Uomo, Università di Pisa.

\*\* Lavoro eseguito con il contributo del CNR (Contratto n. 71.00390-34).

performed using the parallel slopes dosage. The mean fucose content was 3.9  $\mu\text{g/ml}$  for Asiut and 2.3  $\mu\text{g/ml}$  for Gebelen.

N-acetylhexosamines (as N-acetyl-glucosamine) have been determined according to J. L. Reissig et Al., carrying out two dosages for every extract from bone powder. The mean N-acetylhexosamines content of the bones coming from Asiut was 6.5  $\mu\text{g/ml}$  and 4.2  $\mu\text{g/ml}$  for the bones coming from Gebelen.

From the data obtained the following remarks can be made:

- 13 samples gave no reaction for fucose presence: one of them only, tested with the HI reaction, gave a clear and specific absorption.
- In 11 samples L-fucose was present but in a non measurable amount: 4 of them only (36%), however, tested with HI reaction, gave specific absorption.
- The mean L-Fucose and N-acetylhexosamines content of the bones coming from the Asiut necropolis (70,4% of them were ABO diagnosable) is higher related to those coming from Gebelen necropolis, (57,1% ABO diagnosable). The differences observed in sugar content, checked by means of contingency tables, are statistically significant.
- A significant connection between L-Fucose and N-acetylhexosamines content in the bones coming from Asiut has been found.
- Similar connection was also observed between intensity of HI reaction and Fucose and N-acetylhexosamines content in the bones coming from Asiut and between intensity of HI reaction and Fucose content in the bones coming from Gebelen.

In conclusion, our data seem to point out that the presence of the two previously mentioned components of the ABO antigens in aqueous extracts from ancient bones can be a good test for the reliability of the ABO typing; particularly fucose content determination in these extracts may prove to be reliable index of their blood group substances content.

## INTRODUZIONE

(G. PAOLI)

Dato l'esito generalmente positivo delle diagnosi di gruppo ABO in ossa egiziane d'età dinastica, effettuate nel Dipartimento di Storia Naturale dell'Uomo dell'Università di Pisa (G. PAOLI [1972], 457-466), si è ritenuto opportuno eseguire ricerche di tipo biochimico allo scopo di dimostrare la presenza, nel materiale saggiato, di due costituenti fondamentali delle sostanze di gruppo: L-Fucosio e N-acetilesosamine.

Le *N-acetilesosamine* sono infatti costituenti essenziali degli antigeni del sistema ABO nella costituzione dei quali entrano con percentuali piuttosto elevate (dal 23 al 36%) secondo i dati di Au-

tori diversi su Atg diversi riferiti da W. M. WATKINS ([1972], 836). Per tale ragione il loro reperimento nelle ossa di cui si saggia il gruppo sanguigno può esser considerato condizione necessaria della presenza, in dette ossa, di sostanze gruppospecifiche.

Tuttavia, poiché queste sostanze non si trovano esclusivamente in queste macromolecole, ma figurano anche come costituenti secondari della matrice organica dell'osso (C. M. HERRING [1972], 148-156), il loro rinvenimento in ossa umane non può essere considerato argomento sufficiente per dimostrare la presenza, in tali ossa, di antigeni di gruppo ABO, ma solo argomento di probabilità e quindi di plausibilità del saggio immunologico.

Anche il *L-Fucosio* è uno dei costituenti caratteristici delle sostanze gruppospecifiche ABO nella costituzione delle quali entra con percentuali comprese fra il 16 e il 21% (W. M. WATKINS, [1972], 836). Rispetto agli altri costituenti delle sostanze gruppali questo metilpentoso presenta il vantaggio di avere una distribuzione assai limitata nel mondo animale e vegetale (E. BUDDECKE [1972], 530, 536, 539 e seguenti; J. S. FRUTON e S. SIMMONDS [1961], 410-429). Per questo fatto esso risulta assai specifico, tanto che PRICE EVANS ([1960], 384, 398) ha potuto considerare la quantità di L-Fucosio presente nella saliva di individui diversi come un valido indice quantitativo delle sostanze gruppospecifiche ABO secrete. Per quanto riguarda, in particolare, il tessuto osseo, da studi diversi di BURCKARD [1966] e di DISCHE et Al. riportati da G. M. HERRING ([1972], 162, 164) risulta che il L-Fucosio vi è presente ma in quantità assai inferiore alle N-acetilesosamine (da 1/6 a 1/10); mentre lo stesso può dirsi per il tessuto cartilagineo (Autori diversi riportati da E. BUDDECKE [1972], 550, tab. VIII). Si dovrà concludere che la presenza di questo metil pentoso in ossa umane, pur non essendo assolutamente sufficiente a dimostrare la presenza di antigeni, la rende per lo meno molto probabile.

### *Materiale*

La ricerca è stata condotta su 100 femori destri egiziani di età dinastica della collezione Marro del Museo Etnografico di Torino, gentilmente messi a nostra disposizione per lo studio dal Prof. B. Chiarelli. Per quanto riguarda la località di origine il materiale risulta così distribuito: 54 femori della necropoli di Asiut, 35 femori

della necropoli di Gebelen, 8 femori della necropoli di Assuan, 3 femori di provenienza sconosciuta.

### *Preparazione del campione*

Anziché operare direttamente sul tessuto osseo si è preferito operare su quei medesimi estratti acquosi che costituiscono la base del metodo da noi usato per saggiare il gruppo sanguigno con la reazione IEA.

Il metodo di preparazione dei medesimi si può trovare indicato in S. BORGOGNINI ([1967]); G. PAOLI ([1972], 458).

Se ne riassumono tuttavia in questa sede le fasi principali in ordine al contributo che la loro conoscenza può fornire all'interpretazione dei risultati. Tali fasi comprendono:

- 1) prelievo di ~ 1,5 gr di tessuto spugnoso dall'epifisi prossimale del femore e sottile triturazione in un mortaio;
- 2) trattamento della polvere ottenuta con 18 ml di fenolo al 90% per 8 h;
- 3) aggiunta di una soluzione etanolo/fenolo 1:1 (v/v) fino ad ottenere una concentrazione finale pari al 12,5% di etanolo in fenolo 90%; la soluzione così ottenuta viene lasciata a t. a. per una notte;
- 4) centrifugazione a 8000 r.p.m. e allontanamento del supernatante;
- 5) lavaggio della polvere con 8 ml di etanolo al 99,2%;
- 6) trattamento della polvere così lavata con 5 ml di una miscela formata da 3 parti del sale disodico dell'acido etilendiaminotetracetico (EDTA) e quattro parti del sale trisodico dello stesso acido, entrambi in soluzione al 5%; questa fase di estrazione viene continuata per il tempo minimo di 6 h a t.a.;
- 7) purificazione parziale dell'estratto acquoso della polvere d'osso mediante gel-filtrazione su colonne di Sephadex G 25 coarse.

I vantaggi offerti dall'analisi dei costituenti delle sostanze di gruppo ABO effettuate sull'estratto di osso anziché direttamente sulla polvere sono essenzialmente due:

- a) le sostanze da analizzare si presentano in uno stato di maggio-

- re purezza, grazie specialmente alle fasi 2-3 e 7 del procedimento;
- b) si usa un materiale identico a quello usato per la determinazione del gruppo e quindi ci si pone in condizione di giudicare veramente della plausibilità o meno dei risultati ottenuti in tali determinazioni.

### DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL L-FUCOSIO

(G. PAOLI)

Per la determinazione del L-Fucosio è stata applicata, con leggere modifiche, la tecnica di M. N. GIBBONS ([1955], 273-274):

#### *Reattivi*

- a) L-Fucosio puro e secco (per 20 minuti in stufa a 80° C in presenza di pentossido di fosforo); se ne preparano quattro soluzioni in H<sub>2</sub>O distillata alle concentrazioni di 10, 20, 30, 40, µg/ml, che vengono conservate in freezer a -20° C.
- b) Acido solforico diluito 6:1 (v/v) in H<sub>2</sub>O distillata. La soluzione viene conservata in frigo a 4° C.
- c) Acido tioglicollico al 3,3% (v/v) in H<sub>2</sub>O distillata. La soluzione viene conservata in freezer a -20° C.

#### *Procedimento*

- a) Preparazione di due serie di provette: provette contenenti il materiale da saggiare (serie del campione) e provette contenenti il relativo controllo (serie del controllo).  
la *serie del controllo* è costituita da quattro provette in ciascuna delle quali vengono introdotti 0,5 ml di H<sub>2</sub>O distillata e 0,5 ml di L-Fucosio in concentrazione di 10, 20, 30, 40 µg/ml.  
La *serie del campione* è costituita da cinque provette: in ciascuna delle prime quattro vengono introdotti 0,5 ml di estratto di osso da analizzare e 0,5 ml di L-Fucosio alle stesse concentrazioni adoperate per la serie del controllo; la quinta provetta, costituita da 0,5 ml di estratto d'osso e

0,5 ml di H<sub>2</sub>O distillata, ha lo scopo di servire come bianco, determinare cioè per ogni estratto quale frazione di densità ottica sia imputabile alla reazione di rivelazione Fucosio-acido solforico- acido tioglicolico, e quale invece al naturale colore dell'estratto d'osso. Le due serie di provette vengono tenute in bagno di acqua fredda (4° C) per una notte.

- b) Reazione di rivelazione: a ciascuna provetta, tenuta sempre in bagno di acqua fredda, vengono aggiunti 4,5 ml di acido solforico preparato come sopra. L'aggiunta deve essere fatta molto lentamente onde evitare un brusco innalzamento della temperatura dovuto all'idratazione dell'acido solforico. Questa fase è una delle più delicate di tutto il procedimento: numerose prove da noi eseguite variando da 30 secondi a 3 primi il tempo impiegato per introdurre l'acido solforico in ciascuna delle 9 provette hanno rivelato che quando l'acido solforico viene introdotto rapidamente si verifica, specialmente nelle provette a più alta concentrazione di Fucosio, una notevole perdita di questa sostanza, probabilmente in seguito a parziale idrolisi. Le provette così preparate vengono tenute per 30 minuti a t.a., quindi in b.m. bollente per 10 minuti ,dopo i quali l'idrolisi viene bloccata immergendo di nuovo le provette in acqua fredda. Segue l'aggiunta di 0,1 ml di acido tioglicolico, alla concentrazione sopra indicata, in ciascuna delle 8 provette (nella provetta del bianco all'acido tioglicolico si sostituisce una uguale quantità di H<sub>2</sub>O distillata) e quindi entrambe le serie sono conservate al buio per tre ore.
- c) Dosaggio spettrofotometrico: i contenuti delle due serie di provette vengono rapidamente travasati in cuvette di quarzo e quindi letti in parallelo contro H<sub>2</sub>O distillata alle lunghezze d'onda di 396 e 430 m $\mu$ . A questo proposito dobbiamo rilevare che M. N. GIBBONS ([1955], 273) consiglia di effettuare le letture della densità ottica a 400 e 430 m $\mu$ . Tuttavia, numerose prove comparative da noi compiute vagliando una lunga serie di lunghezze d'onda (390, 392, 394, 396, 398, 400, 405, 430 m $\mu$ ) ci hanno convinto che le letture a 396 e 430 m $\mu$  erano le più idonee a determinare una serie di punti (corrispondenti alle diverse concentrazioni) che, allineandosi su una stessa retta, potevano fornire una buona ga-

ranza circa la esattezza della determinazione. Al dosaggio quantitativo per semplice lettura, soggetto ad errori accidentali, si è sostituito un metodo assai più complesso in parte derivato da PRICE EVANS ([1960], 382) che si basa sulla costruzione di due rette che rappresentano le rette di dosaggio del campione e del controllo e sull'assunzione della distanza fra dette rette, misurata in ordinate, come misura della quantità di L-Fucosio presente nel campione. In pratica le due rette si tracciano determinando per ciascuna di esse 4 punti le cui coordinate sono date dalle diverse concentrazioni di L-Fucosio (ascissa) e dal valore della differenza di densità ottica  $D_{396} - D_{430}$  (ordinata) corrispondente a ciascuna di esse, come indicato nella fig. 1.

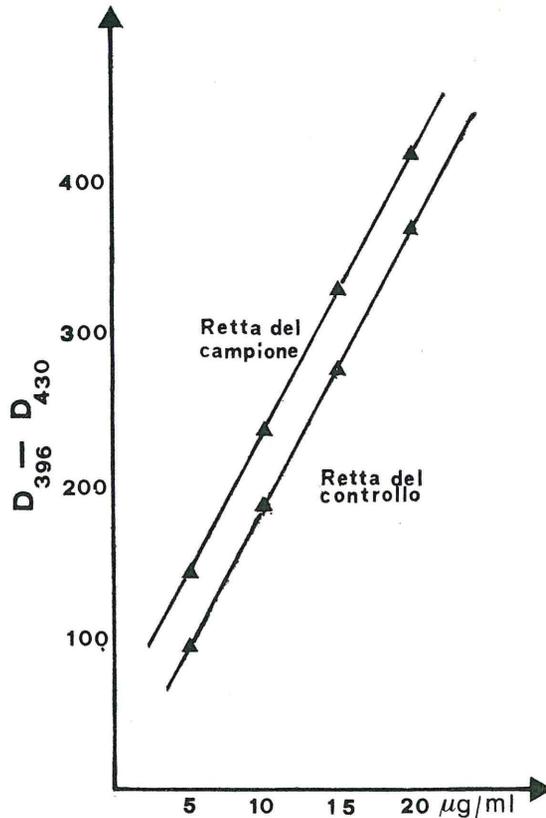


Fig 1 : Esempio di dosaggio quantitativo del L-Fucosio

Perché la lettura sia considerata valida si esige che le due rette interpolatrici risultino più o meno parallele; mentre, se tale condizione non è facilmente realizzabile, si giudica la prova mal riuscita e la quantità di fucosio indeterminabile. Se invece le due rette risultano parallele, si procede alla determinazione quantitativa misurando la distanza fra le due rette in direzione delle ordinate e facendo la proporzione tra questa e la lettura della densità ottica della quantità di fucosio nota che è servita per la costruzione della retta del controllo.

### Risultati

I risultati ottenuti utilizzando la tecnica sopra esposta sono compendati nella tab. 1.

TABELLA 1 - *Contenuto in L-Fucosio ( $\mu\text{g/ml}$ ) in estratti di ossa egiziane di età dinastica.*

Provenienza	(1)	(2)	(3)	(4)	$\Delta$ Gini
Asiut	54	5 (9,3%)	6 (11,1%)	3,91 (48)	3,19
Gebelen	35	6 (17,1%)	4 (11,4%)	2,25 (31)	1,85
Assuan	8	1 (12,5%)	1 (12,5%)	5,30 (7)	—
Sconosciuta	3	1 —	—	3,78 (3)	—

- (1) numero delle ossa saggiate;
- (2) numero delle ossa in cui il contenuto di L-Fucosio è risultato nullo;
- (3) numero di saggi negativi (aberranti). E' riportato in questa colonna il numero dei saggi dove la retta del controllo e quella del campione non risultavano parallele;
- (4) valore del contenuto in L-Fucosio espresso in  $\mu\text{g/ml}$ ; tra parentesi il N. delle ossa su cui è stata calcolata la media. Dato che i singoli valori non si distribuiscono secondo le leggi di una distribuzione normale la media esprime semplicemente un valore indice e la variabilità è stata misurata con la differenza media «delta» ( $\Delta$ ) proposta da C. GINI e calcolata con la formula abbreviata riportata in M. Boldrini [1942], 536-543.

### DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE N-ACETILESOSAMINE

(F. MALLEGNI, S. PARENTI)

La valutazione quantitativa di queste sostanze è stata fatta in termini di equivalenza con la N-acetilglucosamina (M. W. CHASE [1968], 299-300). Il metodo seguito è sostanzialmente quello di J.

L. REISSIG et Al. ([1955], 959-960) con i necessari adattamenti. Si ritiene utile, pertanto, riferirlo schematicamente nella sua attuazione concreta:

### *Reattivi*

- a) Soluzione standard di N-acetilglucosamina (NAGA) alla concentrazione di 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in acqua distillata satura di cloroformio. Dato il valore puramente comparativo dei rilievi e il tipo di materiale da saggiare, non si è ritenuto necessario purificare ulteriormente la NAGA (A. M. STAUB [1963], 1356).
- b) HCl 3N.
- c) Soluzione satura di KOH.
- d) Tetraborato di potassio 0,8M preparato da  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e KOH.
- e) Reattivo di Ehrlich: 2 gr di p-dimetilaminobenzaldeide in 100 ml di  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glaciale contenente 5 ml di HCl fumante. La concentrazione standard si conserva in frigorifero e al momento dell'uso si diluisce 1/10 (v/v) con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glaciale.

### *Procedimento*

#### A) Retta di taratura

- 1) in 4 provette da idrolisi a chiusura ermetica si introducono ml 0,5 di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata contenenti, progressivamente, 0, 25, 50, 75  $\lambda$  della soluzione NAGA standard di cui sopra. Si aggiungono a ciascuna ml 0,15 di HCl 3N e si procede a idrolisi per 10 minuti in b.m. bollente. La normalità dell'acido e il tempo di idrolisi sopra riportati, sono sembrati ottimali dopo alcune prove di saggio;
- 2) si raffreddano le provette sotto acqua di fonte; si aggiungono ml 0,14 di tetraborato di cui sopra e si aggiusta con ml 0,03 di KOH in soluzione satura. E' questa la quantità adatta per portare il pH del sistema al valore di circa 9. E' necessario aggiungere il tetraborato prima del KOH perché un locale eccesso di alcali può distruggere gli amminozuccheri (W. CHASE [1968], 296);
- 3) le provette vengono poste in b.m. bollente per 3 minuti esatti, raffreddate sotto acqua di fonte, addizionate di

3 ml di reattivo di Ehrlich e quindi poste in b.m. a 37-38°C per 20 min.;

- 4) lettura rapida allo spettrofotometro a 585 m $\mu$  usando come bianco la provetta non contenente NAGA.

Si fanno più rette di taratura e si assume come standard la media delle rette disegnate (purché poco diverse).

B) Determinazione delle N-acetilesosamine in estratti acquosi di polvere d'osso.

Su ogni estratto vengono effettuati due saggi in parallelo.

Il procedimento generale è il seguente:

- 1) si usano 4 provette come quelle indicate nel metodo di tracciamento della retta di taratura. Nella prima provetta (I), che servirà come bianco nella lettura spettrofotometrica, si introducono 50  $\lambda$  di H<sub>2</sub>O dist.; in ciascuna delle altre tre provette (II, III, IV) si introducono 40  $\lambda$  dell'estratto d'osso da saggiare (preparato come è detto nell'Introduzione) e 10  $\lambda$  di soluzione standard NAGA (v. sopra). Questa aggiunta ha lo scopo di portare la lettura spettrofotometrica su una scala di valori più attendibili; inoltre serve come controllo per le varie fasi della prova in quanto per ogni estratto è da aspettarsi almeno la quantità di NAGA aggiunta;
- 2) si procede come per le prove destinate al tracciamento della retta di taratura secondo le solite fasi: aggiunta di HCl, idrolisi, tetraborato di potassio e KOH;
- 3) aggiunta di reattivo di Ehrlich nelle provette I, III e IV lasciandone priva la II nella quale invece viene introdotta uguale quantità di H<sub>2</sub>O distillata (essa fornirà un dato per eliminare dalla lettura spettrofotometrica l'interferenza del colore dell'estratto).

La quantità in  $\mu\text{g/ml}$  di NAGA contenuta nell'estratto viene calcolata riportando sulla retta di taratura il valore medio dell'assorbanza ottica per le due provette del campione (purché i due valori siano poco diversi).

*Risultati*

I risultati delle prove, distribuiti secondo le stazioni di provenienza del materiale saggiato, sono riuniti nella tab. 2.

TABELLA 2 - *Contenuto in N-acetilesosamine ( $\mu\text{g/ml}$ ) in estratti di ossa egiziane di età dinastica.*

Provenienza	(1)	(2)	(3)	$\Delta$ Gini
Asiut	54	2 (3,7%)	6,53	5,88
Gebelen	34	1 (2,9%)	4,23	3,85
Assuan	8	1 (12,5%)	4,61	—
Sconosciuta	3	—	3,75	—

(1) numero delle ossa saggiate;

(2) numero delle ossa in cui il contenuto di N-acetilesosamine è risultato nullo;

(3) valore medio del contenuto in N-acetilesosamine espresso in  $\mu\text{g/ml}$ . Dato che i singoli valori non si distribuiscono secondo le leggi di una distribuzione normale la media esprime semplicemente un valore indice e la variabilità è stata misurata con la differenza media «delta» ( $\Delta$ ) proposta da C. GINI e calcolata con la formula abbreviata riportata in M. BOLDRINI [1942], 536-543.

## DISCUSSIONE

(G. PAOLI)

Si considereranno successivamente i diversi tipi di «risposta» alle indagini compiute secondo questo schema: risposte negative (assenza dell'uno, dell'altro o di entrambi i carboidrati); risposte dubbie (determinazioni non interpretabili); risposte positive.

In relazione allo scopo di queste ricerche si terrà anche conto del rapporto fra i risultati dell'indagine biochimica e quelli dell'indagine immunologica (tipizzazione ABO).

*I - Frequenza di determinazioni nulle*

La quantità di L-Fucosio e di N-acetilesosamine risulta nulla rispettivamente in 13 e in 4 delle 100 ossa saggiate. L'assenza può

evidentemente essere attribuita a perdita della sostanza; la differenza di comportamento fra i due componenti è in accordo con quanto osservato nell'introduzione e fa pensare che il L-Fucosio rinvenuto sia da ascrivere più che altro alle sostanze gruppospecifiche, particolarmente abbondanti in quasi tutti i fluidi dell'organismo (E. A. KABAT [1956], 102) e di cui si potrebbe essere impregnato l'osso durante il processo di decomposizione del cadavere. La constatata labilità di questo metil-pentoso sarebbe quindi dovuta alla sua origine antigenica e confermerebbe l'interpretazione il fatto che nei casi di mancanza di N-acetilesosamine manca pure il L-Fucosio.

### *II - Frequenza di determinazioni dubbie*

Nell'11% delle ossa saggiate non è stato possibile determinare la quantità di L-Fucosio (casi di mancato parallelismo fra la retta del controllo e quella del campione). E' probabile che i procedimenti di purificazione da noi adottati non siano stati sufficienti ad allontanare possibili sostanze inquinanti.

### *III - Connessione fra assenza o indeterminabilità di zuccheri e tipizzabilità ABO*

A conferma di quanto ipotizzato ai punti precedenti (presenza dei due zuccheri nelle ossa come indice della presenza di sostanze gruppospecifiche del sistema ABO), nella seguente tabella i risultati dei saggi biochimici che hanno dato risposta negativa o dubbia, sono riportati in parallelo con quelli dei saggi immunologici. Da notare che i due tipi di saggio sono stati compiuti, sebbene in tempi diversi, su estratti ottenuti, con procedimento identico, dagli stessi campioni di polvere d'osso.

TABELLA 3- Risultati delle prove biochimiche e di quelle immunologiche.

N. ossa	L-Fucosio µg/ml	N-acetilesosamine µg/ml	Tipizzabilità ABO	
			no	si
13	0	2,12	12	1
11	?	3,56	7	4

Si rileva quanto segue:

- Su 13 ossa in cui non è stata riscontrata traccia di Fucosio, solo in un caso si è avuta reazione gruppосpecifica. Tale discordanza non appare spiegabile e deve essere attribuita a errore o nella determinazione del L-Fucosio o nell'esecuzione o valutazione della reazione IEA.
- Su 11 ossa in cui non è stato possibile determinare la quantità di L-Fucosio, solo 4 (36%) hanno dato reazione di gruppo. Evidentemente le sostanze inquinanti che disturbano la reazione biochimica impediscono anche una attendibile tipizzazione grup-pale.
- Le medie del contenuto in N-acetilesosamine degli estratti che hanno Fucosio nullo o indeterminabile sono rispettivamente 2,12 e 3,56  $\mu\text{g/ml}$ , valori assai inferiori a quelli riportati nella tab. 2.

Questi risultati, aggiungendosi ai rilievi riferiti nell'introduzione, confermano l'ipotesi che, con buona approssimazione, il Fucosio possa essere considerato sostanza capace di indicare la presenza di antigeni di gruppo, oltre che nella saliva, anche negli estratti acquosi di polvere d'osso trattati nel modo che si usa nel nostro Istituto.

#### *IV - Significatività delle differenze di intensità (quantitative) fra campioni di diversa provenienza*

Limitando l'attenzione ai due campioni più numerosi (Asiut, Gebelen) si è cercato di valutare se la differenza riscontrata nel contenuto medio in L-Fucosio e in N-acetilesosamine (tabb. 1 e 2) sia o no statisticamente significativa. La significatività di questa differenza è stata saggiata col metodo delle contingenze (che offre il vantaggio di non presupporre la distribuzione normale nei gruppi di variabili messi a confronto). Si è costruita, a tale scopo, una tabella 2x2 assumendo come limiti delle classi, definite come «con poco» o «con molto» Fucosio o N-acetilesosamine, quelli suggeriti dalle medie e sotto riportati:

con poco Fucosio (—)	0-3,2	$\mu\text{g/ml}$
con molto Fucosio (+)	3,3-X	$\mu\text{g/ml}$
con poche N-acetilesosamine (—)	0-5,6	$\mu\text{g/ml}$
con molte N-acetilesosamine (+)	5,7-X	$\mu\text{g/ml}$

I risultati sono compendati nella doppia tabella sotto riportata.

TABELLA 4 - *Connessione tra provenienza del campione e contenuto in L-Fucosio e in N-acetilesosamine.*

	FUCOSIO		N-ACETILESOSAMINE	
	—	+	—	+
ASIUT	26	22	24	30
GEBELEN	26	5	27	7
	$\chi^2 = 6,126; P \approx 0,01$		$\chi^2 = 9,083; P < 0,01$	

Il calcolo del  $\chi^2$  è stato fatto secondo la formula riportata da G. BARBENSI ([1962], 280).

La significatività rilevata fa supporre che le ossa delle due necropoli siano state soggette a condizioni di trattamento, di giacitura e di conservazione assai diverse ed è in accordo con i risultati delle prove immunologiche (di cui appresso).

*V - Connessione fra quantità residua di L-Fucosio e quantità di N-acetilesosamine entro ciascun campione*

Analizzando ancora i dati delle tabb. 1 e 2 si osserva che le ossa di Asiut, che contengono (in media) una maggiore quantità di Fucosio di quelle di Gebelen, contengono anche una maggiore quantità di N-acetilesosamine. Tale comportamento ci ha spinto a cercare se esistesse o no una connessione quantitativa, all'interno dei due campioni, tra questi due zuccheri. Adoperando sempre il metodo delle contingenze e distribuendo i singoli valori relativi a ciascun campione tra le due classi: + (al di sopra della rispettiva media) e — (al di sotto della rispettiva media) si ottiene la seguente doppia tabella.

TABELLA 5 - Connessione tra contenuto in L-Fucosio e N-acetilesosamine entro ciascun campione.

		ASIUT Fucosio		GEBELEN Fucosio			
		-	+	-	+		
N-acetilesosamine	-	19	7	16	7	-	
	+	10	12	2	5	+	

Valutata con le tavole di FINNEY et Al. [1963], la tabella di contingenza relativa al campione di Asiut mostra una correlazione positiva e significativa ( $P = 0,0287$ ), mentre per il campione di Gebelen non si raggiunge il limite minimo (0,05) di significatività.

#### VI - Connessione fra quantità di zuccheri e intensità IEA all'interno dei campioni

Analizzando i dati della tab. 6 sotto riportata in cui i risultati delle prove biochimiche vengono messi a confronto con quelli della determinazione del gruppo sanguigno del sistema ABO ottenuti saggiando le stesse ossa, si rileva che la percentuale delle ossa tipizzabili è assai maggiore nel campione di Asiut.

TABELLA 6 - Risultati delle prove biochimiche e di quelle immunologiche.

	N. ossa saggiate	L-Fucosio $\mu\text{g/ml}$	N-acetilesosamine $\mu\text{g/ml}$	% ossa tipizzabili
Asiut	54	3,9	6,5	70,4
Gebelen	35	2,3	4,2	57,1

La differenza tra le due frequenze saggiata col metodo del  $t$  di Student (G. BARBENSI [1962], 184) non risulta significativa ( $t = 1,2788$ ;  $P \approx 0,20$ ) e perciò non si può asserire che, in linea di massima, a una differenza dell'intensità sopra indicata nel contenuto in zuccheri corrisponda di regola una differenza di tipizzabilità. Tuttavia l'armonia fra contenuto in zuccheri e frequenza di tipizzabilità (anche se non significativa e quindi non generalizzabile) e quanto ri-

portato nella discussione dei risultati d'ordine qualitativo ci autorizzano a saggiare se, all'interno del nostro gruppo concreto, si verifica, su base individuale e quantitativa, una correlazione tra queste due variabili.

Abbiamo scelto, anche per questa indagine, il metodo delle contingenze valutando la significatività con le tavole di FINNEY et Al. [1963]. In seguito ad alcune prove orientative abbiamo trovato utile graduare i due fenomeni dividendo la quantità dei due zuccheri in poco (sotto la media) e in molto (sopra la media) e l'intensità della reazione IEA (\*) (inibizione della emoagglutinazione) in due classi: inibizione inferiore o uguale al 9%, inibizione superiore al 9%.

I risultati relativi al campione di Asiut sono compendati nella doppia tabella sotto riportata.

TABELLA 7 - Connessione fra quantità di zuccheri e reazione IEA nel campione di Asiut.

		FUCOSIO		N-ACETILESOSAMINE			
		-	+	-	+		
IEA	-	19	7	23	9	-	
	+	10	12	8	14	+	
		$P < 0,05$		$P < 0,05$			

Si conclude perciò per l'esistenza di un legame significativo tra intensità di reazione IEA e contenuto in L-Fucosio e N-acetilesosamine dell'estratto nel senso che la reazione IEA risulta meno intensa quando l'estratto saggiato contiene sia poco Fucosio sia poche N-acetilesosamine. Questa constatazione dà maggior credibilità anche alla connessione prima trovata non significativa, ma perfettamente armonica con la conclusione attuale.

Saggi analoghi compiuti sul materiale di Gebelen al fine di ap-

(\*) Il grado di inibizione viene misurato con l'aiuto di un colorimetro usato come turbidimetro. Al fine di ottenere questa ultima misura si eseguono diluizioni scalari, una di siero test e una, parallela, di siero assorbito e si assume come misura convenzionale del titolo dell'uno e dell'altro siero la somma delle trasmittanze rilevate nelle singole provette della serie. Il titolo del siero assorbito è poi espresso in % del titolo del siero di controllo (BORGOGNINI S., BARTOLONI S. OMER [1967], 44).

purare se esistesse anche in questo caso una connessione del tipo di quella trovata ad Asiut non hanno messo in evidenza nessuna connessione significativa (tab. 8).

TABELLA 8 - *Connessione fra quantità di zuccheri e reazione IEA nel campione di Gebelen.*

		FUCOSIO		N-ACETILESOSAMINE			
		-	+	-	+		
IEA	-	14	5	17	6	-	
	+	5	7	8	3	+	
		$P > 0,05$		$P > 0,05$			

Tale comportamento è probabilmente attribuibile sia al fatto che la minor consistenza numerica del gruppo rende più difficile il raggiungimento del livello di significatività statistica, sia al fatto che, per la quantità media di L-Fucosio e N-acetilesosamine effettivamente rinvenuta in questo campione, il limite di reazione forte fissato in corrispondenza di una inibizione superiore al 9% è troppo elevato.

Se si spostassero infatti i limiti delle due classi (poco, molto) dei due zuccheri ai corrispondenti limiti fissati per il campione di Asiut si avrebbe una connessione positiva e significativa ( $P = 0,016$ ) tra contenuto in L-Fucosio e intensità di reazione IEA mentre rimarrebbe sempre non significativa la connessione tra quest'ultima e il contenuto in N-acetilesosamine (tab. 9).

TABELLA 9 - *Connessione fra quantità di zuccheri (limiti delle classi come in Asiut) e reazione IEA nel campione di Gebelen.*

		FUCOSIO		N-ACETILESOSAMINE			
		-	+	-	+		
IEA	-	19	0	19	4	-	
	+	8	4	8	3	+	
		$P = 0,016$		$P > 0,05$			

Pur tenendo conto dell'esiguità numerica del campione è da ritenere che quest'ultime siano un componente meno specifico e quindi un indice meno valido della quantità di sostanze gruppo-specifiche presenti nell'estratto.

## OPERE CITATE

- BARBENSI G. (1962) - Metodologia statistica applicata alle scienze biologiche. Valsalva, Firenze.
- BOLDRINI M. (1942) - *Statistica: teoria e metodi*. A. Giuffré Ed., Milano.
- BORGOGNINI S. (1967) - Sulla determinazione dei gruppi sanguigni ABO in ossa umane antiche: studio metodologico ed applicativo. *Tesi - Scuola Normale Superiore*, Pisa.
- BORGOGNINI S., BARTOLONI S. OMER (1967) - Determinazione dei gruppi sanguigni ABO in un gruppo di scheletri eneolitici provenienti dalla necropoli di Ponte S. Pietro. *Arch. Antrop. Etnol.*, **97**, 35-46.
- BUDDECKE E. (1972) - Occurrence and distribution of glycoproteins. In: GOTTSCHALK A. (1972) - *Glycoproteins their composition, structure and function*. Elsevier Pub., Amsterdam, London, N. York, 529-564.
- CHASE M. W. (1968) - Carbohydrate Analysis. In: WILLIAMS C. A., CHASE M. W. (1968) - *Methods in immunology and immunochemistry*. Academic Press, New York and London, 282-296.
- FINNEY D. J., LATSCHA R., BENNET B. M., HSU P. (1963) - *Tables for testing significance in a 2x2 contingency table*. Cambridge University Press.
- FRUTON J. S., SIMMONDS S. (1961) - *General biochemistry*. J. Wiley and Sons, N. York.
- GIBBONS M. N. (1955) - The determination of methylpentoses. *Analyst*, **80**, 268-276.
- HERRING G. M. (1972) - The organic matrix of bone. In: BOURNE G. H. (1972) - *The biochemistry and physiology of bone*. Acad. Press, N. York, 127-189.
- KABAT E. A. (1956) - *Blood-group substances. Their chemistry and immunochemistry*. Acad. Press, N. York.
- PAOLI G. (1972) - Further biochemical and immunological investigations on early Egyptian remains. *J. of Human Evolution*, **1**, 457-466.
- PRICE EVANS D. A. (1960) - The estimation of fucose in saliva. *J. Lab. and Clin. Med.*, **55**, 381-385.
- PRICE EVANS D. A. (1960) - The fucose and agglutinin contents of saliva in subjects with duodenal ulcers. *J. Lab. and Clin. Med.*, **55**, 386-399.
- REISSIG J. L., STROMINGER J. L., LELOIR L. F. (1955) - A modified colorimetric method for the estimation of N-Acetyl amino sugars. *J. Biolog. Chem.*, **217**, 959-966.
- STAUB A. M. (1963) - Extraction, identification et dosage des glucides dans les extraits d'organes et les corps bactériens. In: LOISELEUR J. (1963) - *Techniques de Laboratoire*. Masson et Cie, Paris, 1309-1366.
- WATKINS W. M. (1972) - Blood-group specific substances. In: GOTTSCHALK A. (1972) - *Glycoproteins, their composition, structure and function*. Elsevier Pub., Amsterdam, London, N. York, 830-891.

(ms. pres. il 21 novembre 1974; ult. bozze il 12 maggio 1975).