

# Uporaba histologije pri analizah skeletnega gradiva iz arheoloških kontekstov

## *Histological Analyses of Skeletal Tissues from Archaeological Contexts*

© Tamara Leskovar

Univerza v Ljubljani, Filozofska fakulteta, Oddelek za arheologijo in Arhej d. o. o.; tamaraleskovar@gmail.com

**Izvleček:** Pogosta najdba na arheoloških najdiščih so med drugim tudi skeletni ostanki ljudi in živali. Kot del arhiva arheološkega najdišča so vključeni v poterske analize in tako pripomorejo k interpretacijam in razumevanju preteklosti. Med tovrstne analize sodi tudi histologija oz. analiza rezin skeletnih tkiv pod mikroskopom. Prispevek predstavi sestavo kosti in zob sesalcev kot izhodišče za histološke analize, metodološki postopek priprave in analize omenjenih tkiv od izbora primernih vzorcev do interpretacije rezultatov ter domet histologije glede na obravnavano tkivo in zastavljena arheološka vprašanja. Na kratko oriše tudi trenutno stanje uporabe histološke tehnike v sklopu slovenskih arheoloških raziskav, ilustracija uporabe pa je prikazana na primeru histološke analize dolgih kosti za natančnejšo oceno starosti petih sežganih oseb iz prazgodovinskih arheoloških najdišč Novine, Razvanje in Dobova.

**Ključne besede:** histologija, osteologija, arheološke poterske raziskave, kost, zob

**Abstract:** Human and animal skeletal remains represent a common find on archaeological sites. As part of the archaeological archive, they are included in the post-excavation analyses and thus help with the interpretation and understanding of the past. One of those analyses is histology, e.g. analysis of thin sections of bones and teeth under the microscope. The article outlines mammal bone and tooth structure, which serves as a base for histological analyses, the methodological procedure of preparation of histological thin-sections, from choosing of the most appropriate samples to the interpretation of the results, and the range of histology based on considered tissue and archaeological questions. It briefly presents the current situation on using histology as part of archaeological research in Slovenia and illustrates its potential with histological analysis of long bones of five cremated individuals from the prehistoric archaeological sites of Novine, Razvanje, and Dobova in order to more accurately assess their age at death.

**Keywords:** Histology, Osteology, Archaeological Post-excavation Research, Bone, Tooth

### Uvod

Analize človeških in živalskih posmrtnih ostankov predstavljajo del poterske obdelave arhiva arheološkega najdišča. Preko sistematičnega in natančnega pregleda skeletnih tkiv omogočijo vzpostavitev biološkega profila organizma ter s tem vpogled v demografsko strukturo populacije. Hkrati nudijo izhodišča za raziskave preteklih klimatskih in okoljskih razmer ter stanje ohranjenosti ostalin. Ker je za vzpostavitev tovrstnih rekonstrukcij potrebna velika količina podatkov, je v obdelavo gradiva potrebno vključiti različne makro in mikroskopske ter molekularne analize. Del teh je histologija oz. analiza rezin tkiv pod mikroskopom. Histologija sama po sebi nudi dober vpogled v mikroskopsko strukturo tkiv ter hkrati predstavlja diagnostični vmesni korak med makroskopskimi in molekularnimi analizami. Njen doprinos je posebej izrazit v primeru fizično, kemično in/ali biološko spremenjenih tkiv, ko so makroskopske analize močno omejene ter je pogosto težavno že razločitev med človeškimi in živalskimi ostanki, izgradnja biološkega profila (ocena starosti, spola, patoloških sprememb ...) pa je zelo omejena ali nemogoča. Ker imajo makroskopske analize omejen doseg ne glede na stanje ohranjenosti, histološke analize predstavljajo velik doprinos tudi v primeru dobro ohranjenih skeletnih ostankov.

Primerna histološka analiza, od priprave vzorca, mikroskopskega pregleda do interpretacije rezin skeletnih tkiv, omogoči: i) oceno ohranjenosti gradiva (Delannoy *et al.* 2017; Fernández Jalvo *et al.* 2010; Hoke *et al.* 2011; Hollund *et al.* 2012; Hollund *et al.* 2013; Jans *et al.* 2002), ključno pri odločitvah o nadaljnjih časovno in finančno zahtevnih molekularnih analizah, pri rekonstrukcijah preteklih okoljskih in klimatskih razmer ter načinu dolgoročne hrambe tkiv; ii) razločevanje med človeškimi in živalskimi ostanki ali različnimi vrstami živali (Chen *et al.* 2011; Cuijpers 2006; Harsányi 1993; Hillier, Bell 2007); iii) natančnejšo oceno starosti v času smrti (Crowder *et al.* 2012; Dokládál *et al.* 2017; Hummel, Schutkowski 1993; Uytterschaut 1985; Mineo Yoshino *et al.* 1991) ter iv) zanesljivejšo diagnozo patoloških sprememb (de Boer, Van der Merwe 2016; Grupe, Garland 1993; Piper, Valentine 2012). Kljub širokemu dometu histoloških analiz skeletnih posmrtnih ostankov je v sklopu arheoloških raziskav v Sloveniji mikroskopska tehnika uporabljena le redko. V sklopu raziskav je bila za oceno starosti in razumevanje življenjske dobe jamskega medveda uporabljena analiza zobnega cementa (Debeljak 1996; ista 2000; ista 2007; ista 2012), histološke analize za oceno starosti sežganih človeških ostankov pa so bile na nekaj primerih izvedene v sklopu projekta Arheologija na avtocestah Slovenije (Hincak 2010; ista 2013a; ista 2013b).

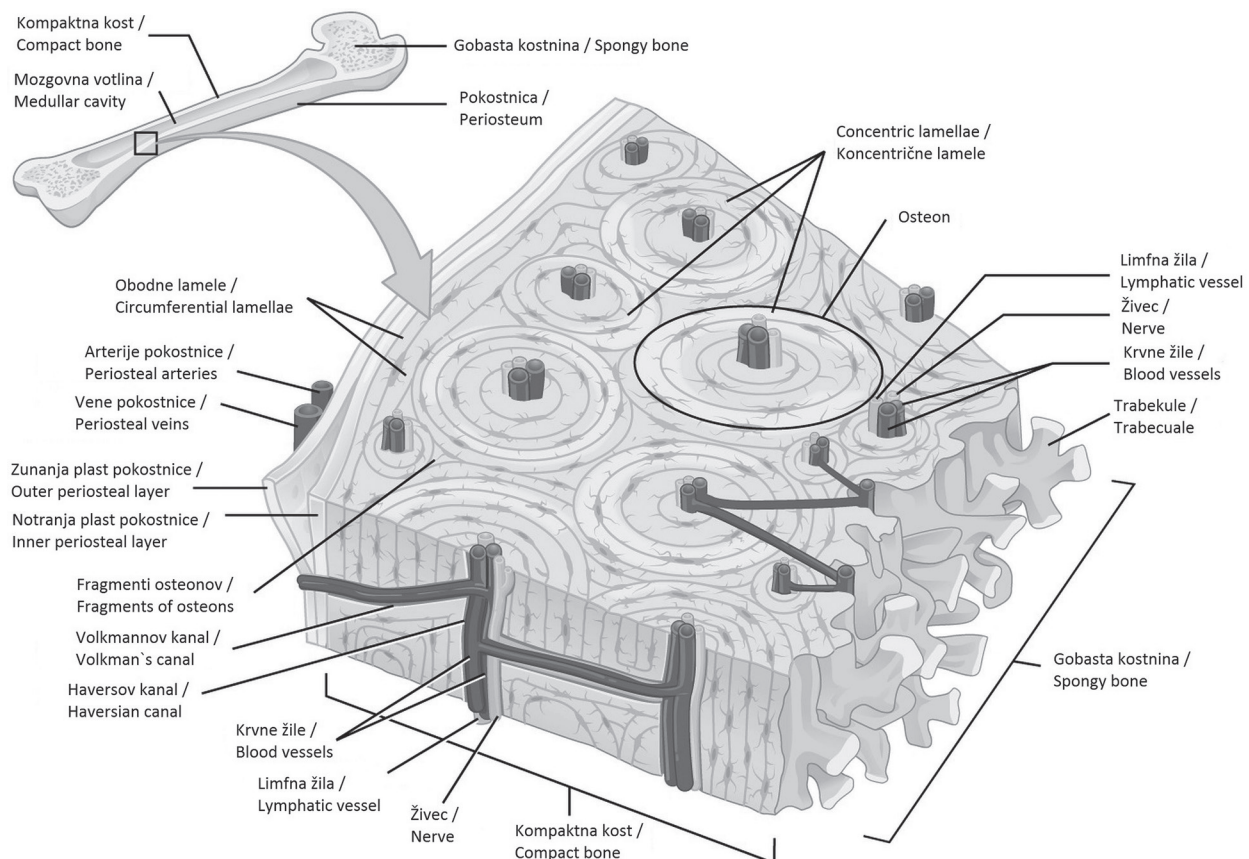
Prispevek nudi kratek pregled možnosti uporabe histoloških analiz posmrtnih ostankov sesalcev iz arheoloških kontekstov s poudarkom na človeških skeletnih ostankih. Predstavi tudi osnove strukture skeletnih tkiv, nujno potrebne pri razumevanju sprememb in vzrokov zanje, ter metodološke postopke od priprave do analize tkiv in interpretacije rezultatov. Za ilustracijo je predstavljenih tudi pet primerov histoloških analiz žganih človeških kosti iz prazgodovinskih arheoloških kontekstov.

### Struktura skeletnih tkiv sesalcev

#### Kostno tkivo

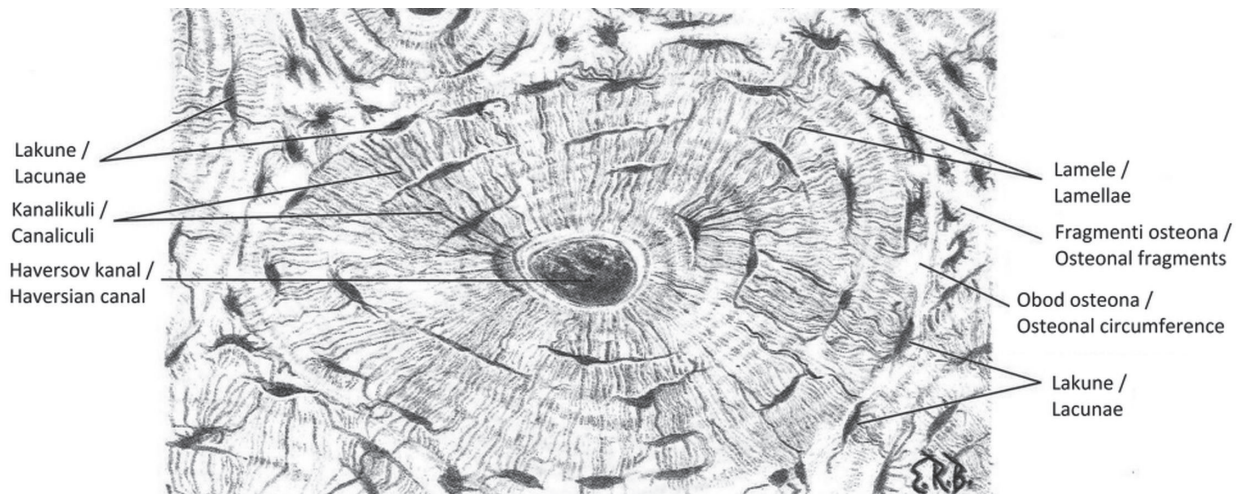
Makroskopska struktura kosti razločuje kompaktno in gobasto kostnino. Kompaktna kostnina je trd in gost zunanji »ovoj« kosti, medtem ko gobasto kostnino tvorijo

ploščato in trnasto oblikovane tanke kostne tvorbe v njeni notranjosti. Mikroskopsko je kost razdeljena na nezrelo in zrelo, slednja pa naprej na primarno, sekundarno in neožiljeno. Nezrelo kost gradijo nepravilno oblikovane, naključno usmerjene, vlaknaste strukture kosti, ki obdajajo živce in krvne žile. Ker nezrela kost nastaja v času razvoja in obnavljanja tkiv ali kot odziv na patološke spremembe, je njen razvoj hiter, obstoj pa zgolj začasen. Nezrela kost se razvije v zrelo kost, ki jo tvorijo dobro organizirane, pravilno usmerjene lamele iz mineraliziranih vlaken kolagena. Primarna zrelo kost je prva, pravilno usmerjena, plastovita odložitev kosti, del katere so vzdolžno usmerjeni, prekrvavljeni in s kompaktno kostnino obdani kanali ali primarni osteoni. Ti nastanejo ob prehodu iz nezrele v zrelo kost in služijo dovajanju krvi in hranil v kost ter odvajanju odpadnih snovi iz kosti. Glede na strukturo je primarno kost nadalje mogoče



Slika 1. Struktura kosti (Splet 1).

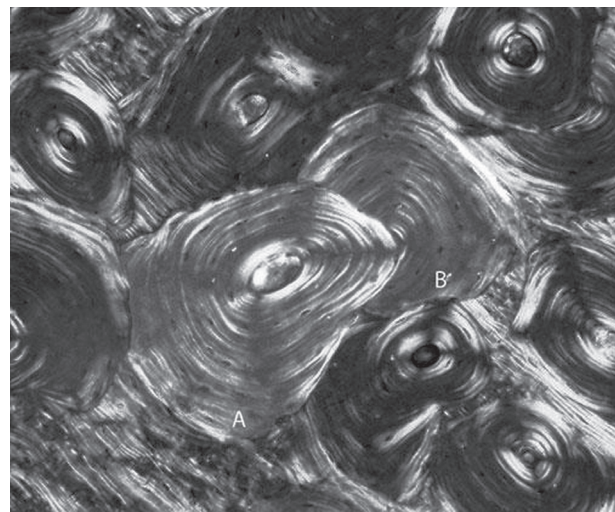
Figure 1. Bone structure (Web 1).



Slika 2. Struktura osteona (Splet 2).

Figure 2. Osteonal structure (Web 2).

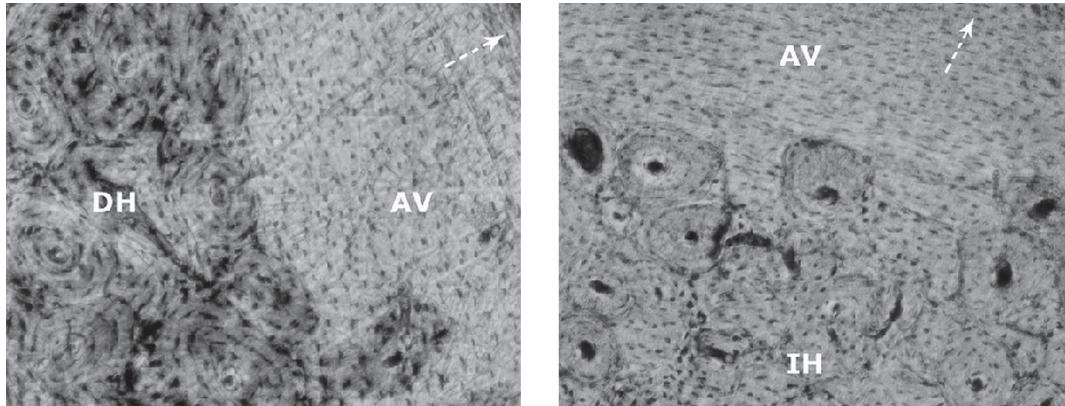
razdeliti v različne tipe, denimo vzdolžno, radialno, retikularno, plastovito (lamelarno), prepleteno oz. pleksiformno in brezcelično. Z obnavljanjem skeletnih tkiv pride do resorpcije primarne zrele kosti, ki jo nadomesti zrela sekundarna kost. Pri tem primarne osteone nadomestijo sekundarni osteoni, ki jih tvori Haversov sistem oz. osrednji kanal za krvne žile in živce, obdan z več koncentrično urejenimi plastmi lamel ter prečnimi Volkmanovimi kanali, ki povezujejo osteone med seboj (sliki 1 in 2). Sčasoma in med obnovo kosti so sekundarni osteoni prve generacije nadomeščeni z drugo generacijo, pri čemer v kostnini ostajajo fragmenti prve generacije (slika 3) (Ortner 2003, 24–26). Osnovo kosti odraslega človeka tako predstavljajo koncentrično urejene lamele mineraliziranega kolagena, ki obdajajo Haversov sistem kanalov. Ker je kost živo tkivo, ki se stalno obnavlja, je sistem lahko zaključen ali aktiven. Zaključen sistem je okrogle ali ovalne oblike, sestavljen iz osrednjega kanala, ki ga obdajajo 16–20 koncentrično naloženih lamel in zunanja, cementna linija. Aktivni sistem je različnih nepravilnih oblik, saj v njem prihaja do resorpcije kostnine s pomočjo osteoklastov (večjedrne celice kostnine in tkivni makrofagi) in posledično nastalih Howshipovih lakun (izdolben prostor), nalaga pa se tudi nova, še nemineralizirana kostnina, obdana z osteoblasti (celice, ki izločajo kostno medceličnino). Za razliko od kosti primatov (vključno s človekom) imajo kosti večjih, hitro rastočih sesalcev tudi prepleteno (pleksiformno) primarno kost. Ta je po sestavi



Slika 3. Primer celega osteona (A) in fragmenta osteona (B) (Crowder et al. 2012, 120, fig. 5).

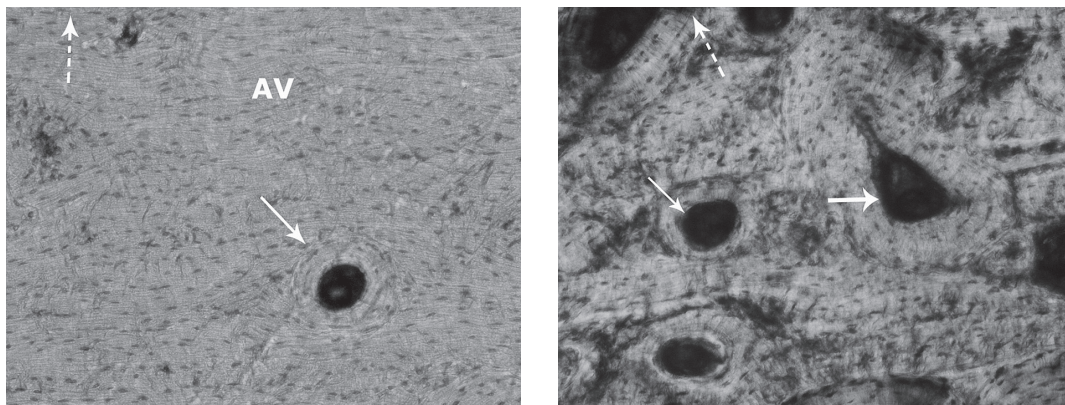
Figure 3. An example of a whole osteon (A) and osteonal fragment (B) (Crowder et al. 2012, 120, fig. 5).

sicer podobna plastoviti (lamelarni) kosti, vendar je žilni sistem bolj gost, kostnina pa je grajena iz vzdolžno, radialno in koncentrično usmerjenih primarnih osteonov. Značilnost primarne prepletene kosti je videz »opečnate stene« goste kostnine in žilnih kanalov (Hillier, Bell 2007) (slike 4–6).



Slika 4. Neožiljena (AV) in gosta kost s Haversovimi kanali (DH; IH) mačke (levo) in psa (desno); puščica kaže v smeri pokostnice (Brits et al. 2014, 7, figs. 5–6).

Figure 4. Avascular (AV) and dense bone with Haversian canals (DH; IH) of a cat (left) and a dog (right), arrow pointing in the direction of periosteum (Brits et al. 2014, 7, figs. 5–6).

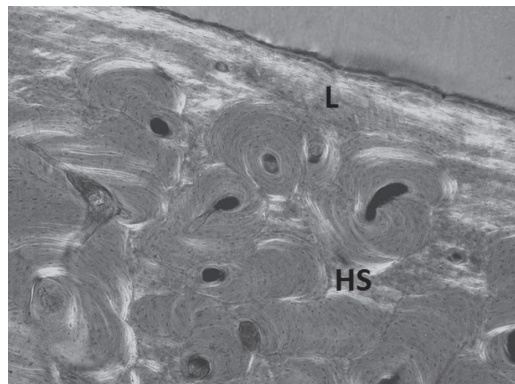


Slika 5. Neožiljena kost (AV) s Haversovim sistemom (polnočrtna puščica) odraslega človeka (levo) in mladostnika (desno), črtkana puščica kaže v smeri pokostnice (Brits et al. 2014, 9, figs. 9–10).

Figure 5. Avascular bone (AV) with Haversian system (full-line arrow) of an adult (left) and a juvenile (right), dotted arrow pointing in the direction of periosteum (Brits et al. 2014, 9, figs. 9–10).

Slika 6. Primarna lamelarna kost (L) in Haversov sistem (HS) kosti odraslega človeka (Streeter 2012, 107, fig. 4).

Figure 6. Primary lamellar bone (L) and Haversian system (HS) in a bone of an adult human (Streeter 2012, 107, fig. 4).

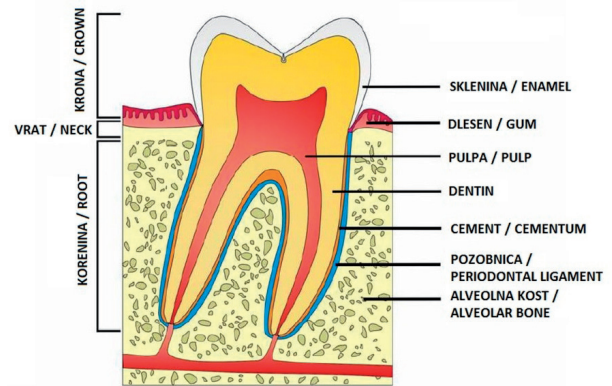


## Zob

Zob je večinsko grajen iz dentina ali zobovine, znotraj katere je zobna pulpa s krvnimi žilami in živci (slika 7) (Hitij *et al.* 2011). V predelu zobne krone je zobovina prekrita s sklenino, v predelu korenine pa s cementom, ki povezuje korenino in kolagenska vlakna obzobnih tkiv.

Dentin je grajen iz minerala, organskih snovi in vode. Izdelujejo ga celice odontoblasti, ki se nahajajo na dentinski površini znotraj zobne pulpe in s podaljški segajo v dentinske kanale okoli pulpe. Kanali potekajo radialno okoli pulpe, pri konici korenine (apeksu) skoraj naravnost, v osrednjem delu pa v obliki črke S. Dentin je glede na nastanek lahko primarni, sekundarni ali terciarni. Primarni dentin predstavlja osnovo pri nastajajočem zobu. Sekundarni dentin se odlaga znotraj zobne pulpe v času uporabe zob in postopno manjša njeno prostornino. Terciarni dentin nastane kot odziv zobne pulpe na kakršen koli stres. Njegova struktura je slabše organizirana kot struktura primarnega in sekundarnega dentina ter bolj spominja na zgradbo kosti.

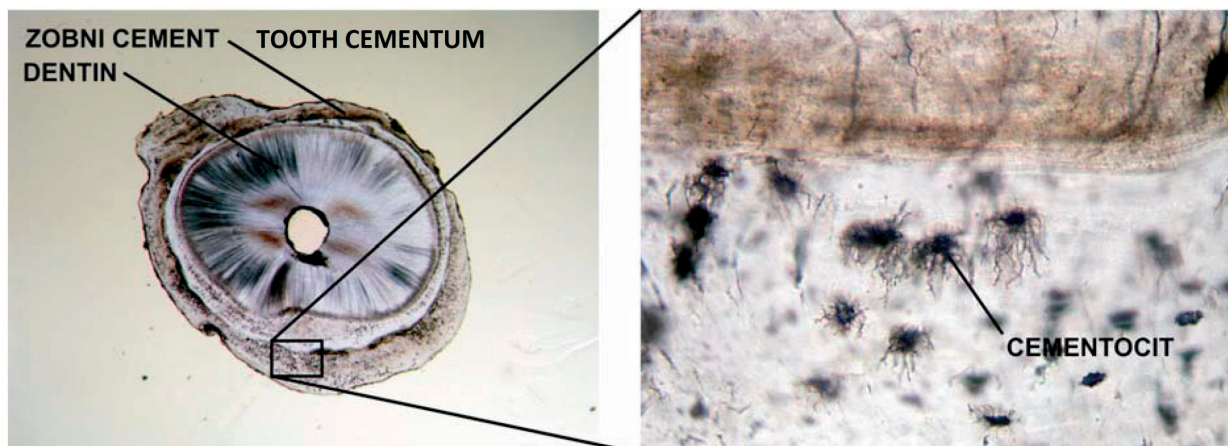
Sklenina je izrazito mineralizirano tkivo, grajeno iz skleninskih prizem, med katerimi so medprizemske snovi. Razlike v mineraliziranosti vodijo v pojav prečnih prog v sklenini, ki predstavljajo rastne (Retziusove) linije. Zobni cement je tanka plast mineraliziranega tkiva na zunanji površini koreninskega dentina in ne vsebuje dentinskih kanalov. Za razliko od sklenine, ki



Slika 7. Sestavni deli zoba z okolnimi tkivi (Hitij *et al.* 2011, 1, fig. 1).

Figure 7. Parts of a tooth with surrounding tissues (Hitij *et al.* 2011, 1, fig. 1).

nastaja med razvojem zoba (proizvajajo jo embrionalne celice ameloblasti), se cement nalaga tudi po končani rasti korenine zoba. Nalaganje cementa je plastovito, posamezne plasti gradijo sprva gosti snopi kolagenskih vlaken, ki z vgrajevanjem kristalov hidroksiapatita postopno mineralizirajo. Ob hitrem odlaganju cementa se nekatere celice lahko ujamejo v cement in končajo kot cementociti (slika 8) (Hitij *et al.* 2011, 2–5; Sloopweg 2013, 9–15).



Slika 8. Presek korenine zoba (desno) z vidnimi cementociti pri večji povečavi (levo) (Hitij *et al.* 2011, 5, fig. 10).

Figure 8. Cross-section of a tooth root (right) with cementocytes under higher magnification (left) (Hitij *et al.* 2011, 5, fig. 10).

## Metodologija

### Izbor vzorcev

Histološka analiza skeletnih tkiv sledi makroskopski analizi in fotografskemu dokumentiranju. Glede na makroskopsko ohranjenost tkiv in zastavljena vprašanja je najprej potrebno izbrati primerne vzorce. Rezultati preteklih raziskav in metodološki postopki (Canturk *et al.* 2014; Dokládál *et al.* 2017; Hummel, Schutkowski 1993; Jankauskas *et al.* 2001; Kerley 1965; Kerley, Ubelaker 1978; Wedel 2007; Yoshino *et al.* 1994) najpogosteje narekujejo izbor dolgih kosti, predvsem stegenice, golenice in nadlahtnice ter zob. V primeru patoloških sprememb se uporabi skeletni element z najizrazitejšimi spremembami. Zaradi praktičnosti priprave zbruskov morajo biti odlomki kosti veliki vsaj 1 cm.

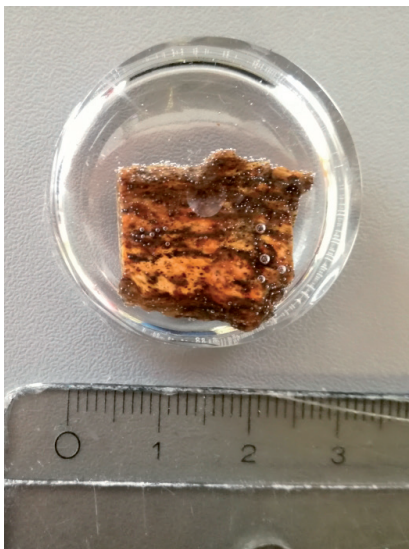
### Priprava vzorcev

Odlomek kosti velikosti najmanj 1 cm ali zob je potrebno utrditi z epoksi smolo (slika 9). Po končanem sušenju v sušilnici na 30 °C se utrjene vzorce z diamantno žago, opremljeno s sistemom za hlajenje, počasi razreže na 70–100 µm debele rezine (slika 10). Zaradi raznolikosti v strukturi skeletnih tkiv ter njihove občutljivosti na

poškodbe je za vsak vzorec priporočljivo izdelati najmanj 3 do 5 rezin. Rezine se prenese in prilepi na objektno steklo; sledi brušenje in poliranje do debeline ~75–50 µm oz. vse dokler struktura tkiv pod mikroskopom ni jasno vidna (slika 11). Očiščene, zbrusene in spolirane rezine se nato prekrije s krovnim medijem ter krovnim steklom in vzorci so pripravljene za pregled pod mikroskopom (Crowder *et al.* 2012, 112–117).

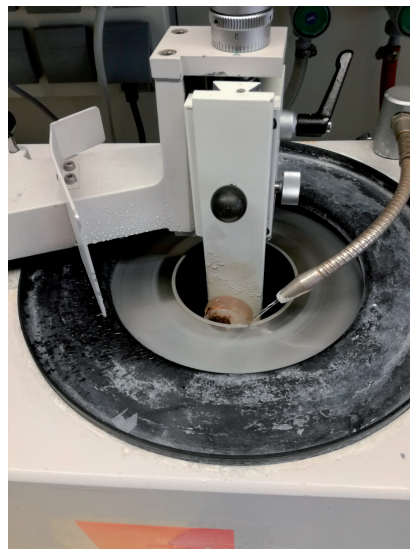
### Mikroskopska analiza

Mikroskopska analiza poteka z uporabo svetlobnega mikroskopa pri 50–200-krat povečavah. Posamezna rezina je v celoti temeljito pregledana, najbolje ohranjeni in/ali izpovedni deli pa so natančno opisani in fotografirani. Nadaljnje analize imajo širok domet, z vidika (bio)arheologije pa so pomembne predvsem možnosti razlikovanja med živalskimi in človeškimi posmrtnimi ostanki, ocena starosti osebe v času smrti, prepoznavanja neonatalne linije v zobu, opazovanja morebitnih patoloških sprememb in sprememb pod vplivom različnih tafonomskih procesov, kot so izpostavitve visokim temperaturam ali kontaminaciji ob vgrajevanju snovi iz okolja ter oceni stanja ohranjenosti in potenciala vzorcev za molekularne analize (Garland 2011; Grupe, Garland 1993; Haynes *et al.* 2002; Hillier, Bell 2007; Nanci 2008).



Slika 9. Odlomek kosti, utrjen z epoksi smolo (foto: T. Leskovar).

Figure 9. Bone fragment embedded in epoxy resin (photo: T. Leskovar).



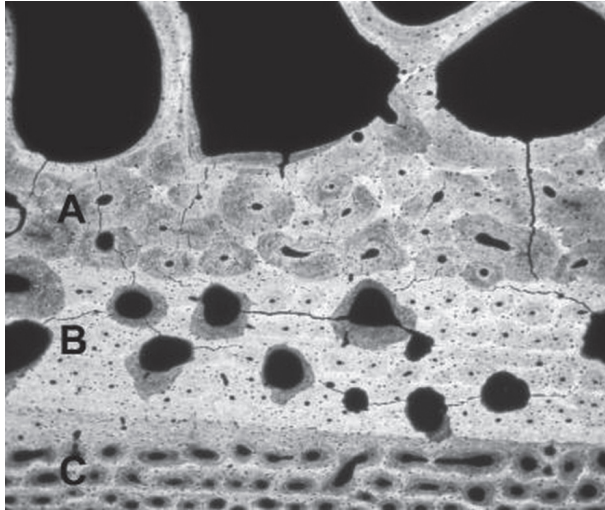
Slika 10. Rezanje utrjenega odlomka kosti (foto: T. Leskovar).

Figure 10. Cutting of the embedded bone fragment (photo: T. Leskovar).



Slika 11. Brušenje utrjenega odlomka kosti (foto: T. Leskovar).

Figure 11. Gridding of the embedded bone fragment (photo: T. Leskovar).



Slika 12. Ovčja kost. A – notranji del kosti s Haversovim sistemom, B – prehodno območje, C – zunanji del kosti s pleksiformno organizacijo; Širina vidnega polja: 2,5 mm (Hillier, Bell 2007, 251, fig. 1).

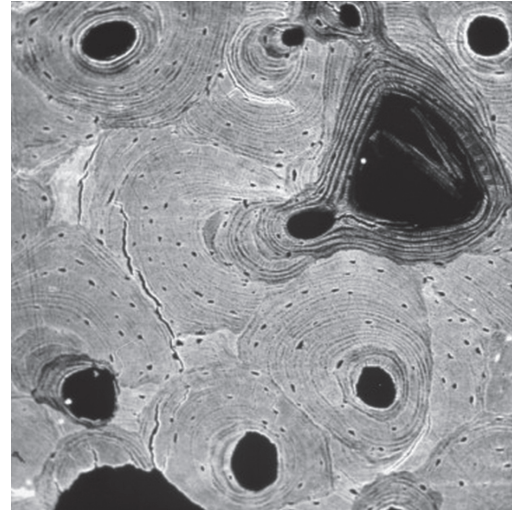
Figure 12. Sheep bone. A – inner part of the bone with Haversian system, B – transitional area, C – outer part of the bone with plexiform organisation; Field width: 2.5 mm (Hillier, Bell 2007, 251, fig.1).

#### Razlikovanje med človeškimi in živalskimi kostmi

Razlike v strukturi kompaktne kosti sesalcev temeljijo na prisotnosti ali odsotnosti slojevitosti, vzdolžni, krožni ali radialni prekrvavljenosti, pravilni ali nepravilni obliki preseka krvnih žil in tipu osteonov (Goldbach, Hinüber 1955) (sliki 12 in 13). Najbolj izrazite razlike v strukturi človeških in živalskih kosti predstavljata število in predvsem velikost Haversovih kanalov. Manjši sesalci običajno nimajo osteonov, medtem ko večji sesalci osteone imajo, a je njihov povprečni premer ( $< \sim 40 \mu\text{m}$ ) manjši kot pri človeških kosteh ( $\sim 60 \mu\text{m}$ ) (Rämsch, Zerndt 1963; Urbanova, Novotny 2005). Tako prisotnost/odsotnost in premer osteonov omogočata razlikovanje med človeškimi in živalskimi kostmi, deloma pa tudi razlikovanje med različnimi vrstami slednjih.

#### Ocena starosti v času smrti

Starost v času smrti je mogoče najbolj natančno oceniti v primeru otrok, saj temelji na dobro raziskanem in relativno predvidljivem razvoju kosti in zob. Predvsem ob ohranjenosti slednjih so ocene lahko na mesece ali leto

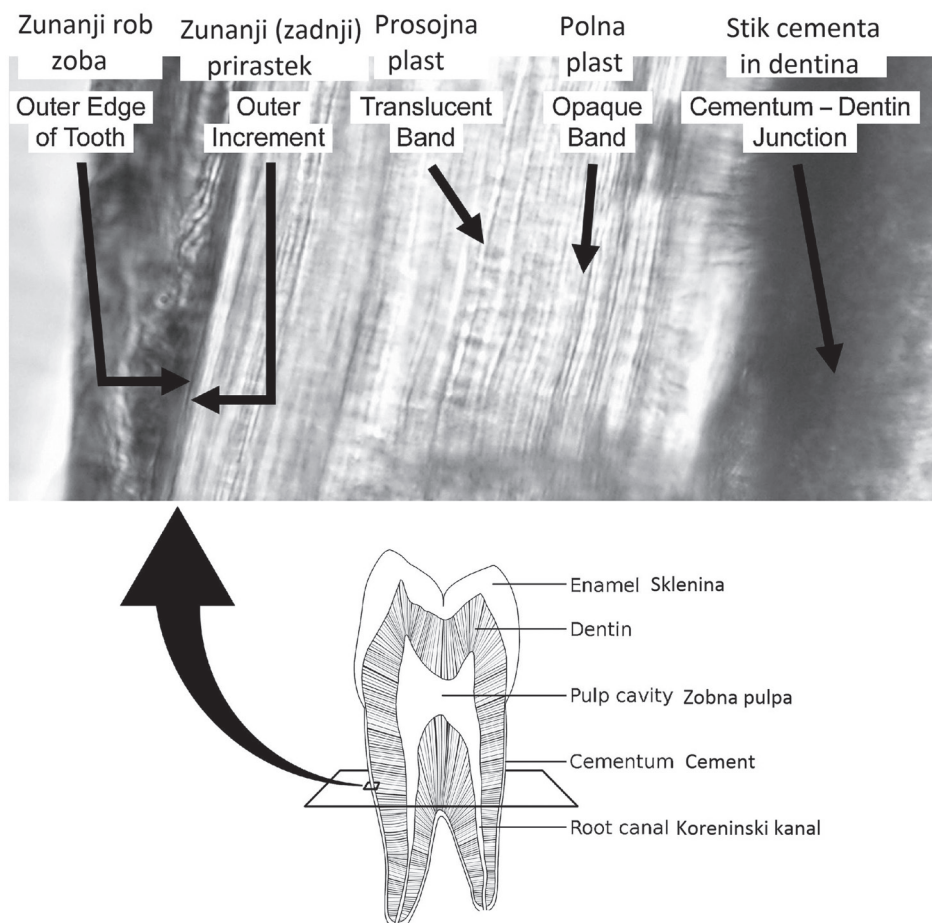


Slika 13. Človeška kost s Haversovim sistemom, s celimi osteoni in fragmenti osteonov; Širina vidnega polja: 930  $\mu\text{m}$  (Hillier, Bell 2007, 251, fig. 2).

Figure 13. Human bone with Haversian system, with complete and fragmented osteons; Field width: 930  $\mu\text{m}$  (Hillier, Bell 2007, 251, fig. 2).

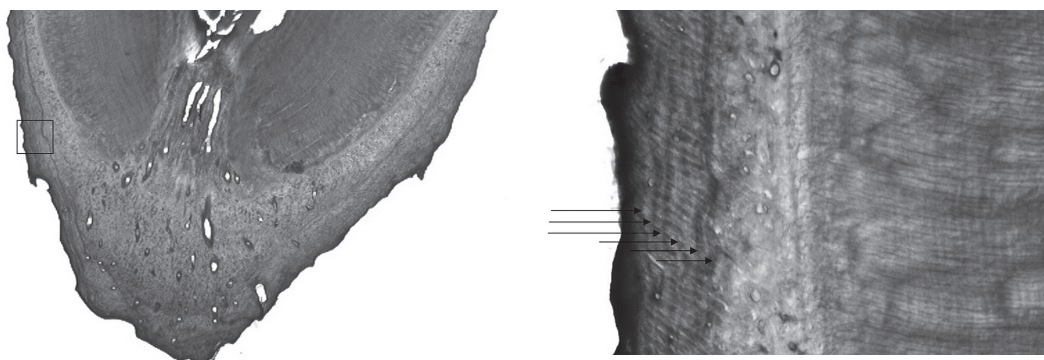
natančne (AlQahtani *et al.* 2014; Cardoso 2007; Demirjian *et al.* 1985; Işcan, Steyn 2013, 59–86; Lewis, Garn 1960; Rösing *et al.* 2007; Scheuer, Black 2000). Pri odraslih so ocene manj zanesljive, saj temeljijo na slabše predvidljivih degenerativnih spremembah (Işcan, Steyn 2013, 86–141). Posledično je na obravnavanem skeletu najbolje upoštevati čim večje število prepoznavnih degenerativnih sprememb (Boldsen, *et al.* 2002; Garvin, Passalacqua 2012) in tako zožiti ocenjeni starostni razpon. Pri tem so najbolj zahtevne kremacije, kjer je ocena starosti pogosto nemogoča ali le grob približek.

Ocenjene starosti oseb v času smrti je mogoče izboljšati z uporabo histologije in histomorfometričnih metod, primernih za sežgane in nesežgane posmrtno ostanke. Pri slednjih so najbolj natančne analize zobnega cementa. Namreč, po končanem razvoju zobne korenine kolagenske fibrile zobnega cementa rastejo neprekinjeno, njihova mineralizacija pa poteka s prekinitvami. Posledično se spreminja usmerjenost mineralnih kristalov ter nastaja vzorec pod mikroskopom vidnih polnih in prosojnih plasti cementa. Ker vsak par plasti ustreza približno enemu letu življenja, vsota števila parov plasti in časa zaključka



Slika 14. Shematska predstavitev zoba s polnimi in prosojnimi pasovi cementa (Wedel, Wescott 2016, 136, fig. 2).

Figure 14. Schematic presentation of a tooth with opaque and translucent cement bands (Wedel, Wescott 2016, 136, fig. 2).



Slika 15. Polni in prosojni pasovi cementa na zobu 6 let stare evrazijske vidre (Sherrard Smith, Chadwick 2010, 46, fig. 1).

Figure 15. Opaque and translucent cementum bands in Eurasian otter aged 6 (Sherrard Smith, Chadwick 2010, 46, fig. 1).



rasti zobne korenine predstavlja starost posameznika ob izpadu zoba ali ob smrti, in sicer na  $\pm 2,5$  let natančno (Halberg *et al.* 1983; Kagerer, Grupe 2001; Lieberman 1994; Wittwer Backofen *et al.* 2004) (sliki 14 in 15). Pri sežganih posmrtnih ostankih so za oceno starosti najbolj uporabne in zanesljive dolge kosti oz. njihova mikrostruktura. Ker se s staranjem večja število osteonov in njihovih ostankov, štetje le-teh in uporaba regresivnih enačb omogočata oceno starosti odraslih oseb na  $\pm 10$  let natančno (Ahlqvist, Damsten 1969; Dokládál *et al.* 2017; Drusini 1987; Hummel, Schutkowski 1993; Kerley 1965; Kerley, Ubelaker 1978; Uytterschaut 1985; Yoshino *et al.* 1994).

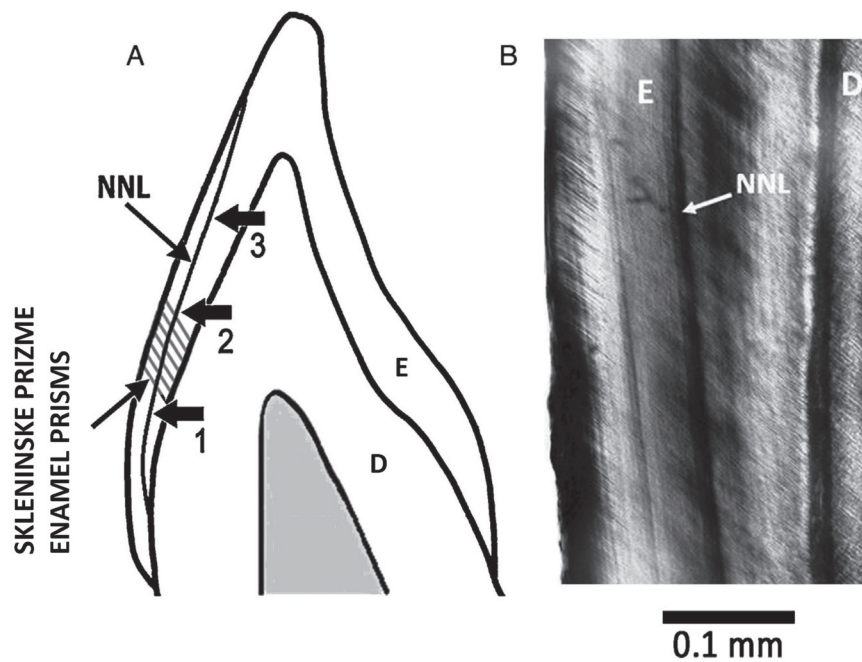
#### Prepoznavanje neonatalne linije v zobnem tkivu

Razvoj mlečnih zob se prične že v maternici in se zaključi pri približno treh letih starosti (AlQahtani *et al.* 2010; Canturk *et al.* 2014). Tvorba dentina in sklenine je ob samem rojstvu otroka in v prvih nekaj dneh življenja začasno zaustavljena, saj ob izraziti spremembi življenjskega okolja s porodom pride do metaboličnega stresa

in upada nivoja kalcija. S prilagoditvijo na nove pogoje se razvoj zob normalno nadaljuje, a v sklenini ostane tanek, slabo mineraliziran pas, imenovan neonatalna linija (NNL). Linija poteka od stika med sklenino in dentinom proti površini sklenine v apeksu zobne krone (slika 16) in je prisotna pri vseh mlečnih zobeh ter pri prvem stalnem sekalcu (Antoine *et al.* 2008; Berkovitz 2017, 134; Kurek *et al.* 2015; Mishra *et al.* 2009; Sabel *et al.* 2008), a le v primeru, da je otrok preživel prvih 7–10 dni življenja (Canturk *et al.* 2014; Smith, Avishai 2005; Whittaker, Richards 1978). Tako prisotnost NNL omogoča prepoznavo otrok, umrlih ob rojstvu ali nekaj dni po njem, od otrok, ki so preživel vsaj prvih 7–10 dni življenja.

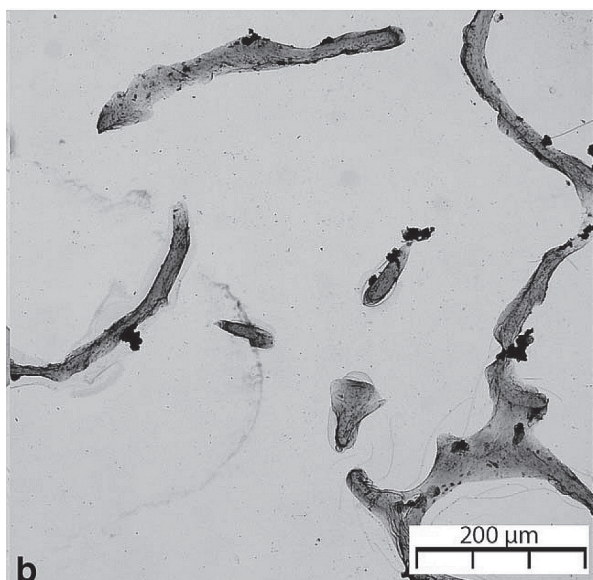
#### Patološke spremembe

Skelet živega organizma je dinamično tkivo, v katerem neprestano potekata razgradnja in nalaganje nove kostnine. Dinamika kostnega tkiva je odvisna od številnih notranjih in zunanjih dejavnikov ter se prilagaja mehanskim, hormonskim in elektrolitskim spremembam v telesu (Harada, Rodan 2003). V zdravem tkivu sta



Slika 16. Shema (A) in mikroskopska slika (B) neonatalne linije in skleninskih prizem zoba. NNL – neonatalna linija, 1 – vratni del, 2 – osrednji del, 3 – vrhni del, E – sklenina, D – dentin (Kurek *et al.* 2015, 4, fig. 1).

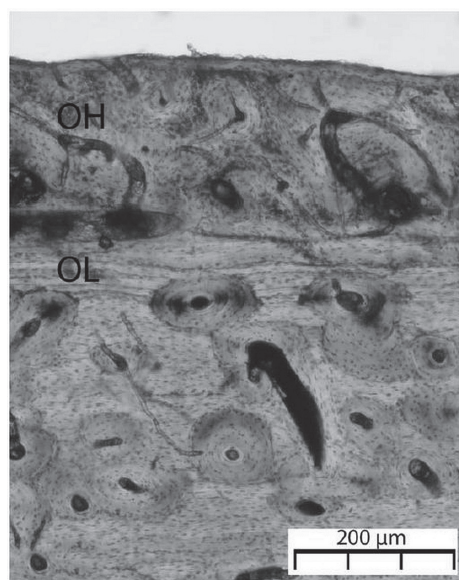
Figure 16: Scheme (A) and micrograph (B) of neonatal line and enamel prisms of a tooth. NNL – neonatal line, 1 – cervical part, 2 – middle part, 3 – upper part, E – enamel, D – dentine (Kurek *et al.* 2015, 4, fig. 1).



Slika 17. Primer osteoporoze  
(de Boer, Van der Merwe 2016, 3, fig. 1).

Figure 17. Example of osteoporosis  
(de Boer, Van der Merwe 2016, 3, fig. 1).

razgradnja in nalaganje kosti uravnoteženi, medtem ko ob patološkem stanju pride do porušitve ravnovesja in povečane razgradnje ali tvorbe nove kostnine ter s tem do opaznih sprememb v njeni strukturi. Denimo kronična vnetja spodbudijo tvorbo nove kostnine, medtem ko so akutna vnetja povezana z njeno razgradnjo (Ortner 2003, 35). Razen tega je pomembna tudi sama hitrost tvorbe in/ali razgradnje kosti. Patološko spodbujene reakcije so lahko zelo hitre, kar vodi v neorganizirano in slabo mineralizirano kost (Ortner 2003, 64). Analiza strukture kosti tako pripomore k diagnosticiranju patoloških sprememb. Vendar je pri posmrtnih ostankih iz arheoloških kontekstov potrebno upoštevati tudi tafonomijo oz. propadanje skeletnih tkiv po smrti organizma. Tafonomija z različnimi procesi na strukturo kosti vpliva podobno kot patološki dejavniki ter otežuje razločitev med posledicami tafonomskih in patoloških procesov ali pa zakrije/uniči diagnostične patološke spremembe (Bell *et al.* 1996; Hackett 1981; Marchiava *et al.* 1974; Ortner 2003, 64). Kljub temu je histologija ob dobrem poznavanju tafonomskih in patoloških sprememb koristno orodje pri diagnozah različnih metaboličnih boleznih, okužbah,



Slika 18. Primer okostenelega hematoma (OH),  
OL – originalna plastovita kost  
(de Boer, Van der Merwe 2016, 7, fig. 5).

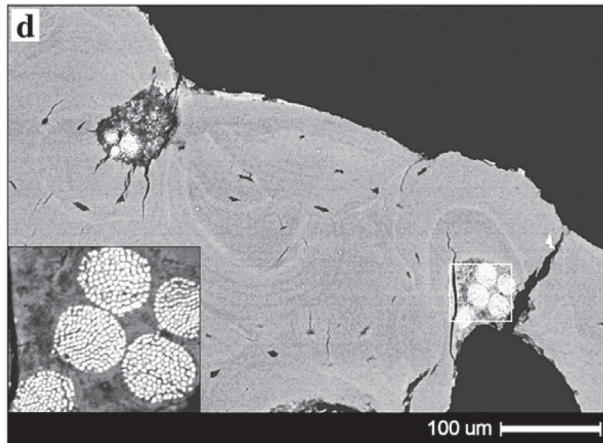
Figure 18. Example of ossified haematoma (OH),  
OL – original lamellar bone  
(de Boer, Van der Merwe 2016, 7, fig. 5).

tumorjih in mehanskih poškodbah (sliki 17 in 18) (de Boer, Van der Merwe 2016).

#### Tafonomski procesi

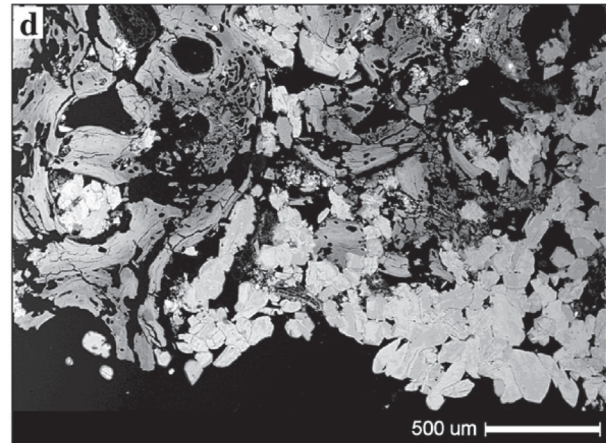
Po smrti organizma so vsa tkiva, vključno s skeletnimi, izpostavljena različnim tafonomskim procesom. Ti so izredno kompleksni, saj gre za preplet antropogenih in naravnih dejavnikov, od naravnega propadanja tkiv po smrti, do razkosanja, drobljenja ter izpostavitve različnim pogojem, kot so visoke temperature in prebavni sokovi, ter diageneti po odložitvi v tleh (Denys 2002; Fernández Jalvo *et al.* 2010).

Izvemši ekstremne razmere spremembe v mikrostrukturi skeletnih tkiv nastopijo hitro, lahko že nekaj dni po smrti in veliko pred skeletizacijo, ko mehko tkivo razpade in ostane le še okostje. Običajno so posledica delovanja mikroorganizmov, predvsem endogenih bakterij iz prebavnega trakta, kasneje pa tudi eksogenih bakterij in gliv. Delovanje mikroorganizmov pusti prepoznavne vzorce, ki se jasno razlikujejo od drugih patoloških in tafonomskih sprememb ter omogočajo tudi razlikovanje



Slika 19. Primer dobro ohranjene kosti s formacijami kristalov pirita, ki kažejo na prisotnost žveplo-reducirajočih bakterij in anaerobno okolje (Turner Walker, Jans 2008, 230, fig. 2).

Figure 19. Example of well-preserved bones with framboids indicating presence of sulphur reducing bacteria and anoxic conditions (Turner Walker, Jans 2008, 230, fig. 2).



Slika 20. Močno propadla kost s kristali sadre, ki kaže na s kisikom sproženo reakcijo med raztopljenim kalcijem in sulfati ter na spremembo pogojev iz anaerobnih v aerobne (Turner Walker, Jans 2008, 232, fig. 4).

Figure 20. Highly degraded bone with gypsum crystals indicating an oxidising reaction of dissolved calcium with the degrading pyrites and thus changes from anaerobic to aerobic conditions (Turner Walker, Jans 2008, 232, fig. 4).

med delovanjem različnih vrst bakterij in gliv (Bell *et al.* 1996; Hackett 1981; Jans *et al.* 2004; Nielsen Marsh *et al.* 2007). Značilne sledi na skeletnem tkivu pustijo tudi prebavni sokovi (Denys *et al.* 1995; Fernández-Jalvo *et al.* 2002) in izpostavitve visokim temperaturam (Hanson, Cain 2007; Nicholson 1996; Shipman *et al.* 1984). Po odložitvi v tleh so tkiva izpostavljena diagenetskim procesom, ki so pogojeni s stanjem tkiva v času odložitve, in z lastnostmi tal, kot so temperatura, vlaga, pH vrednost, aktivnost organizmov ipd. Vpliv različnih procesov in dejavnikov povzroči fizične, kemične in biološke spremembe v mineralu in kolagenu ter posledično spremembe na mikrostrukturi skeletnih tkiv (Collins *et al.* 2002; Delannoy *et al.* 2017; Hedges 2002; Hedges, Millard 1995; Jans *et al.* 2002; Nielsen Marsh *et al.* 2007; Nielsen Marsh, Hedges 2000). Nastale spremembe pripomorejo k boljšemu razumevanju tafonomske zgodovine tkiv pred in po odložitvi v tleh (Dal Sasso *et al.* 2014; Turner Walker, Jans 2008). Omenjene raziskave dokazujejo, da denimo delovanje različnih vrst bakterij lahko kaže na aerobne ali anaerobne pogoje, odsotnost bakterij in prisotnost gliv na razkositve trupla, spremembe v strukturi minerala in kolagena na izpostavitve različno visokim temperaturam z ali brez mehkega tkiva ter

na spremembe v kemičnih lastnostih in hidrologiji tal. S histološko analizo pridobljeni podatki tako omogočijo interpretacije vpletenosti obravnavanih tkiv v različne procese pred samo odložitvijo v tleh, vezane na predelavo in pripravo hrane ali ritualne (pokopne) prakse, ter definiranje lastnosti in sprememb okolja, v katerem so se tkiva nahajala po odložitvi (sliki 19 in 20).

#### *Stanje ohranjenosti kostnega materiala*

Histologija predstavlja pomemben doprinos tudi pri ocenah stanja ohranjenosti obravnavanih tkiv. Vzpostavitev le-te je pomembna pri konservatorskih odločitvah glede ravnanja z ostalinami ter pri optimalnem vzorčenju za morebitne biomolekularne raziskave, kot so analize izotopov in antične DNA. Nerazumevanje ohranjenosti minerala in kolagena namreč lahko vodi v neprimerne konservatorske postopke, načine dolgoročne hrambe in vzorčenje ter s tem v pospešen propad skeletnih tkiv, neuspešne biomolekularne analize ali napačne interpretacije pridobljenih rezultatov (Colson *et al.* 1997; Fernández-Jalvo *et al.* 2002; Geigl 2002; Jans *et al.* 2002; Lee-Thorp 2002; Stone 2005).

NAJDIŠČE/SITE	GROB/GRAVE	STAROST/AGE	SPOL/SEX
Novine	1	odrasel/adult	nedoločljiv/undetermined
Razvanje	91	odrasel/adult	nedoločljiv/undetermined
Dobova	193	odrasel/adult	nedoločljiv/undetermined
Dobova	197	odrasel/adult	morda moški/maybe male
Dobova	352	> 30 let/years	morda ženska/maybe female

Preglednica 1. Rezultati makroskopskih osteoloških analiz petih oseb iz arheoloških najdišč.

Table 1. Results of macroscopic osteological analyses of five individuals from the archaeological sites.

### Primer uporabe histološke analize kosti za oceno starosti

Narejena je bila histološka analiza dolgih kosti za oceno starosti petih sežganih oseb iz starejših železnodobnih gomil iz Novin pri Šentilju (Vinazza *et al.* 2015) in Velike gomile nad Razvanjem (Strmčnik Gulič 1992) ter iz grobov kulture žarnih grobišč iz Dobove (Starè 1975). Četudi sežgani so bili odlomki kosti relativno dobro ohranjeni in veliki do 9 cm. Makroskopska antropološka analiza je omogočila prepoznavanje posameznih skeletnih elementov in oceno, da gre v vseh petih primerih za odrasle osebe, pri čemer naj bi bila ena oseba verjetno starejša od 30 let. Spol je bilo mogoče oceniti le v dveh primerih, v enem primeru gre morda za moškega in v enem morda za žensko (Preglednica 1).

Iz zbira kosti posameznega groba je bil za histološko analizo izbran po en odlomek dolge kosti noge (slika 21),

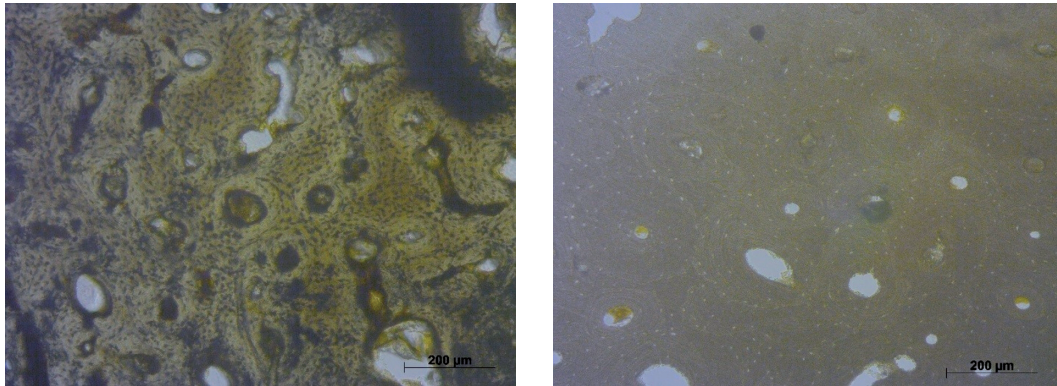
ki je bil nato pripravljen in analiziran po opisanem metodološkem postopku (glej poglavje *Metodologija*). Kosti so bile utrjene z epoksi smolo in prečno razrezane na 60–80  $\mu\text{m}$  debele rezine. Iz vsakega vzorca kosti so bile pripravljene 3 histološke rezine, ki so bile nato analizirane pod optičnim mikroskopom (*Axioskop 2 plus*; Zeiss, Jena) pri 100-kratni povečavi. Najbolje ohranjeni deli na zunanem, osrednjem in notranjem delu preseka kompakte so bili slikani (*AxioCam MRc*; Zeiss, Jena) (sliki 22 in 23). S pomočjo mreže velikosti 1  $\text{mm}^2$  so bili na posnetkih prešteti osteoni (slika 24). Na osnovi prešteti osteonov na šestih različnih mestih preseka kosti izračunana povprečna starost oseb (Hummel, Schutkowski 1993) (Preglednica 2).

Iz navedenega primera je razvidno, da histološka analiza primerno ohranjenih, pripravljenih in analiziranih kosti lahko poda veliko boljše oceno starosti osebe kot zgolj makroskopska analiza, povzeta v Preglednici 1.



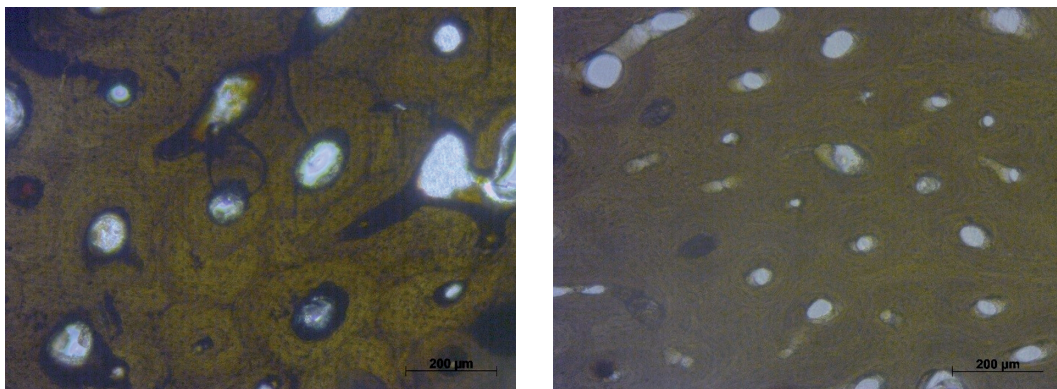
Slika 21. Primer odlomka stegenice z groba 91 iz Razvanja in 193 iz Dobove.

Figure 21. Example of femur fragments from Razvanje, grave 91, and Dobova, grave 193.



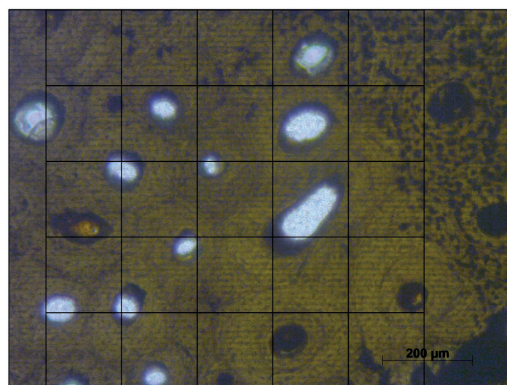
Slika 22. Tkivna rezina kosti iz groba 1 iz Novine (levo) in iz groba 91 iz Razvanja (desno) pod mikroskopom (100-kratna povečava).

Figure 22. Thin sections of bone from Novine, grave 1 (left), and Razvanje, grave 91 (right), under the microscope (100x magnification).



Slika 23. Tkivna rezina kosti iz grobov 197 (levo) in 352 (desno) iz Dobove pod mikroskopom (100-kratna povečava).

Figure 23. Thin sections of bone from Dobova, graves 197(left) and 352 (right), under the microscope (100x magnification).



Slika 24. Mreža velikosti 1 mm<sup>2</sup> na rezini kosti iz groba 193 iz Dobove.

Figure 24. 1 mm<sup>2</sup> sized net on the thin section of the bone from Dobova, grave 193.

Novine grob 1/ Novine grave 1		Razvanje grob 91/ Razvanje grave 91		Dobova grob 193/ Dobova grave 193		Dobova grob 197/ Dobova grave 197		Dobova grob 352/ Dobova grave 352	
starost/ age	# osteonov/ osteons	starost/ age	# osteonov/ osteons	starost/ age	# osteonov/ osteons	starost/ age	# osteonov/ osteons	starost/ age	# osteonov/ osteons
40,5	29	31,55	24	63,77	37	20,81	18	36,92	27
60,19	40	29,76	23	60,19	44	20,81	18	38,71	28
58,4	39	27,97	22	69,14	40	22,6	19	42,29	30
42,29	30	26,18	21	74,51	38	24,39	20	31,55	24
53,03	36	27,97	22	61,98	32	27,97	22	33,34	25
49,45	34	33,34	25	63,77	41	26,18	21	38,71	28
<b>Starost/Age: 51 +/- 10 let/years</b>		<b>Starost/Age: 29 +/- 10 let/years</b>		<b>Starost/Age: 58 +/- 10 let/years</b>		<b>Starost/Age: 24 +/- 10 let/years</b>		<b>Starost/Age: 37 +/- 10 let/years</b>	

Preglednica 2. Število osteonov in ocenjena starost obravnavanih oseb ob smrti.

Table 2. Number of osteons and estimated age of examined individuals at the time of death.

### Zaključek

Histološka analiza skeletnega gradiva lahko močno pripomore pri natančnejših interpretacijah arheoloških podatkov ter k razumevanju ljudi in okolja v preteklosti. Priprava vzorcev, analiza in interpretacija so zaradi občutljivosti in specifičnosti arheoloških materialov sicer nekoliko zahtevnejši, a sta široka uporabnost in količina pridobljenih podatkov vredni truda. Histološka analiza, ob primerni ohranjenosti in pripravi vzorcev, omogoča razločevanje kostnega materiala ljudi in živali ter prepoznavanje neonatalne linije v zobeh in s tem oceno starosti otrok, izboljša oceno starosti ob smrti v primeru sežganih posmrtnih ostankov ter pomaga diagnosticirati morebitne patološke spremembe, nudi vpogled v potek tafonomskih procesov in s tem obravnavanje ostankov po smrti organizma ter vpogled v okoljske spremembe.

Sodeč po objavljeni literaturi je histološki pristop, kljub svojemu širokemu dometu za potrebe arheoloških raziskav, v Sloveniji le redko uporabljen. V prispevku izpostavljen primer sicer predstavlja le eno izmed možnosti uporabe histološke analize – oceno starosti sežganih pokojnikov, a vendarle jasno prikaže njen doprinos in potencial pri analizah arheološkega skeletnega gradiva.

Poleg širokega doprinosu podatkov v pomoč in podporo interpretacijam preteklosti ne gre zanemariti, da histološka analiza predstavlja tudi vpogled v stanje dejanske ohranjenosti vzorcev. S tem nudi izhodišča za izbor najprimernejših vzorcev za morebitne nadaljnje analize ter vzpostavitev primernih pogojev za dolgotrajno hrambo gradiva.

*Literatura / References*

- AHLQVIST, J., O. DAMSTEN 1969, A modification of Kerley's method for the microscopic determination of age in human bone. – *Journal of forensic sciences* 14(2), 205–212.
- ALQAHTANI, S. J., M. P. HECTOR, H. M. LIVERSIDGE 2010, Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. – *American Journal of Physical Anthropology* 142(3), 481–490.
- ALQAHTANI, S. J., M. P. HECTOR, H. M. LIVERSIDGE 2014, Accuracy of dental age estimation charts: Schour and Massler, Ubelaker and the London Atlas. – *American Journal of Physical Anthropology* 154(1), 70–78.
- ANTOINE, D., S. HILLSON, M. C. DEAN 2008, The developmental clock of dental enamel: a test for the periodicity of prism cross-striations in modern humans and an evaluation of the most likely sources of error in histological studies of this kind. – *Journal of Anatomy* 214(1), 45–55.
- BELL, L. S., M. F. SKINNER, S. J. JONES 1996, The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. – *Forensic Science International* 82(2), 129–140.
- BERKOVITZ, B. K. B. 2017, *Oral Anatomy, Histology and Embryology*. New York.
- BOLDSSEN, J. L., G. R. MILNER, L. W. KONIGSBERG, J. W. WOOD 2002, Transition analysis: a new method for estimating age from skeletons. – V / In: R. D. Hoppa, J. W. Vaupel (ur. / eds.), *Paleodemography, Age Distributions from Skeletal Samples*, Cambridge, 73–106.
- BRITS, D., M. STEYN, E. N. L'ABBÉ 2014, A histomorphological analysis of human and non-human femora. – *International Journal of Legal Medicine* 128(2), 369–377.
- CANTURK, N., S. S. ATSU, P. S. AKA, R. DAGALP 2014, Neonatal line on fetus and infant teeth: An indicator of live birth and mode of delivery. – *Early Human Development* 90(8), 393–397.
- CARDOSO, H. F. V 2007, Environmental effects on skeletal versus dental development: Using a documented subadult skeletal sample to test a basic assumption in human osteological research. – *American Journal of Physical Anthropology* 132(2), 223–233.
- CHEN, M., X. WANG, Z. Ye, Y. ZHANG, Y. ZHOU, W.-S. TAN 2011, A modular approach to the engineering of a centimeter-sized bone tissue construct with human amniotic mesenchymal stem cells-laden microcarriers. – *Biomaterials* 32(30), 7532–7542.
- COLLINS, M. J., C. M. NIELSEN MARSH, J. HILLER, C. I. SMITH, J. P. ROBERTS, R. V. PRIGODICH, T. J. WESS, J. CSAPO, A. R. MILLARD, G. TURNER WALKER 2002, The survival of organic matter in bone: a review. – *Archaeometry* 44(3), 383–394.
- COLSON, I. B., J. F. BAILEY, M. VERCAUTEREN, B. C. SYKES, R. E. M. HEDGES 1997, The preservation of ancient DNA and bone diagenesis. – *Ancient Biomolecules* 1(2), 109–117.
- CROWDER, C., J. HEINRICH, S. D. STOUT 2012, Rib histomorphometry for adult age estimation. – *Methods in Molecular Biology* 915, 109–127.
- CUIJPERS, A. G. F. M. 2006, Histological identification of bone fragments in archaeology: telling humans apart from horses and cattle. – *International Journal of Osteoarchaeology* 16(6), 465–480.
- DAL SASSO, G., L. MARITAN, D. USAI, I. ANGELINI, G. ARTIOLI 2014, Bone diagenesis at the micro-scale: Bone alteration patterns during multiple burial phases at Al Khiday (Khartoum, Sudan) between the Early Holocene and the II century AD. – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 416, 30–42.
- de BOER, H. H. H., A. E. L. VAN DER MERWE 2016, Diagnostic dry bone histology in human paleopathology. – *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)* 29(7), 831–843.
- DEBELJAK, I. 1996, A simple preparation technique of cave bear teeth for age determination by cementum increments. – *Revue de paléobiologie* 15(1), 105–108.
- DEBELJAK, I. 2000, Dental cementum in the cave bear; comparison of different preparation techniques. – *Geološki zbornik* 15, 25–40.
- DEBELJAK, I. 2007, Fossil population structure and mortality of the cave bear from the Mokrica cave (North

- Slovenia) / Struktura fosilne populacije in umrljivost jamskega medveda iz Mokriške jame (severna Slovenija). – *Acta carsologica* 36(3), 475–484.
- DEBELJAK, I. 2012, The age and sex structure of the cave bear population from Križna jama (Slovenia). – *Mitteilungen der Kommission für Quartärforschung der österreichischen Akademie der Wissenschaften* 21, 97–108.
- DELANNOY, Y., T. COLARD, C. CANNET, V. MESLI, V. HÉDOUIN, G. PENEL, B. LUDES 2017, Characterization of bone diagenesis by histology in forensic contexts: a human taphonomic study. – *International Journal of Legal Medicine* 132(1), 219–227.
- DEMIRJIAN, A., P. H. BUSCHANG, R. TANGUAY, D. K. PATTERSON 1985, Interrelationships among measures of somatic, skeletal, dental, and sexual maturity. – *American Journal of Orthodontics* 88(5), 433–438.
- DENYS, C. 2002, Taphonomy and experimentation. – *Archaeometry* 44(3), 469–484.
- DENYS, C., Y. FERNÁNDEZ JALVO, Y. DAUPHIN 1995, Experimental taphonomy: preliminary results of the digestion of micromammal bones in the laboratory. – *Comptes Rendus de l'Academie de Sciences - Serie IIa: Sciences de la Terre et des Planetes* 321, 803–809.
- DOKLÁDAL, M., B. STREIT, M. SCHULTZ, M. WOLF 2017, Determining Human Age at Death Using Cremated Bone Microstructure. – *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 1(3), 1–7.
- DRUSINI, A. 1987, Refinements of two methods for the histomorphometric determination of age in human bone. – *Zeitschrift für Morphologie und Anthropologie* 77(2), 167–176.
- FERNÁNDEZ JALVO, Y., P. ANDREWS, D. PESQUERO, C. SMITH, D. MARÍN Monfort, B. SÁNCHEZ, E. M. GEIGL, A. ALONSO 2010, Early bone diagenesis in temperate environments: Part I: Surface features and histology. – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 288(1–4), 62–81.
- FERNÁNDEZ JALVO, Y., B. SÁNCHEZ CHILLÓN, P. ANDREWS, S. FERNÁNDEZ LÓPEZ, L. ALCALÁ MARTÍNEZ 2002, Morphological taphonomic transformations of fossil bones in continental environments, and repercussions on their chemical composition. – *Archaeometry* 44(3), 353–361.
- GARLAND, A. N. 2011, An Introduction to the Histology of Exhumed Mineralized Tissue. – V / In: A. N. Garland, G. Gruppe (ur. / eds.), *Histology of Ancient Human Bone: Methods and Diagnosis*, Berlin, Heidelberg, 1–16.
- GARVIN, H. M., N. V. PASSALACQUA 2012, Current Practices by Forensic Anthropologists in Adult Skeletal Age Estimation\*. – *Journal of Forensic Sciences* 57(2), 427–433.
- GEIGL, E. M 2002, On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. – *Archaeometry* 44(3), 337–342.
- GOLDBACH, H. J., H. HINÜBER 1955, Versuch einer Systematik der Formelemente des Säugetierknochens. – *Deutsche Zeitung für Gerichtsmedizin* 44(4–5), 578–588.
- GRUPE, G., A. N. GARLAND (ur. / eds.) 1993, *Histology of Ancient Human Bone: Methods and Diagnosis: Proceedings of the "Palaeohistology Workshop" held from 3–5 October 1990 at Göttingen*, Berlin, Heidelberg.
- HACKETT, C. J. 1981, Microscopical Focal Destruction (Tunnels) in Exhumed Human Bones. – *Medicine, Science and the Law* 21(4), 243–265.
- HALBERG, F., M. LAGOGUEY, A. REINBERG 1983, Human circannual rhythms over a broad spectrum of physiological processes. – *International Journal of Chronobiology* 8(4), 225–268.
- HANSON, M., C. R. CAIN 2007, Examining histology to identify burned bone. – *Journal of Archaeological Science* 34(11), 1902–1913.
- HARADA, S., G. A. RODAN 2003, Control of osteoblast function and regulation of bone mass. – *Nature* 423, 349–355.
- HARSÁNYI, L. 1993, Differential Diagnosis of Human and Animal Bone. – V / In: *Histology of Ancient Human Bone: Methods and Diagnosis*, Berlin, Heidelberg, 79–94.
- HAYNES, S., J. B. SEARLE, A. BRETMAN, K. M. DOBNEY 2002, Bone Preservation and Ancient DNA:



- The Application of Screening Methods for Predicting DNA Survival. – *Journal of Archaeological Science* 29(6), 585–592.
- HEDGES, R E M 2002, Bone diagenesis: an overview of processes. – *Archaeometry* 44(3), 319–328.
- HEDGES, R E M, A. R. MILLARD 1995, Bones and Groundwater: Towards the Modelling of Diagenetic Processes. – *Journal of Archaeological Science* 22(2), 155–164.
- HILLIER, M. L., L. S. BELL 2007, Differentiating Human Bone from Animal Bone: A Review of Histological Methods. – *Journal of Forensic Sciences* 52(2), 249–263.
- HINCAK, Z. 2010, Antropološka analiza žganega skeleta. – V / In: I. Šavel, S. Sankovič (ur. / eds.), *Za Raščico pri Krogu*, Ljubljana, 118.
- HINCAK, Z. 2013a, Antropološka analiza žganih ostankov. – V / In: B. Djurič, Z. Hincak, B. Kavur (ur. / eds.), *Popava pri Lipovcih 2*, Ljubljana, 114–119.
- HINCAK, Z. 2013b, Zooarheološke analize kostnih ostankov. – V / In: B. Djurič, Z. Hincak, B. Kavur (ur. / eds.), *Popava pri Lipovcih 2*, Ljubljana, 120–123.
- HITIJ, T., J. ZALOHAR, D. CEBRON 2011, *Histologija zobnega organa in anatomija zob za zobne asistente*. Ljubljana.
- HOKE, N., J. BURGER, C. WEBER, N. BENECKE, G. GRUPE, M. HARBECK 2011, Estimating the chance of success of archaeometric analyses of bone: UV-induced bone fluorescence compared to histological screening. – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 310(1–2), 23–31.
- HOLLUND, H. I., N. ARTS, M. M. E. JANS, H. KARS 2013, Are Teeth Better? Histological Characterization of Diagenesis in Archaeological Bone–Tooth Pairs and a Discussion of the Consequences for Archaeometric Sample Selection and Analyses. – *International Journal of Osteoarchaeology* 25(6), 901–911.
- HOLLUND, H. I., M. M. E. JANS, M. J. COLLINS, H. KARS, I. JOOSTEN, S. M. KARS 2012, What Happened Here? Bone Histology as a Tool in Decoding the Postmortem Histories of Archaeological Bone from Castricum, The Netherlands. – *International Journal of Osteoarchaeology* 22(5), 537–548.
- HUMMEL, S., H. SCHUTKOWSKI 1993, Approaches to the Histological Age Determination of Cremated Human Remains. – V / In: G. Grupe, A. N. Garland (ur. / eds.), *Histology of Ancient Human Bone: Methods and Diagnosis: Proceedings of the “Palaeohistology Workshop” held from 3–5 October 1990 at Göttingen*, Berlin, Heidelberg, 111–123.
- IŞCAN, M. Y., M. M. STEYN 2013, *The Human Skeleton in Forensic Medicine* (3. izd.). Springfield.
- JANKAUSKAS, R., S. BARAKAUSKAS, R. BOJARUN 2001, Incremental lines of dental cementum in biological age estimation. – *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* 52(1), 59–71.
- JANS, M. M. E., H. KARS, C. M. NIELSEN–MARSH, C. I. SMITH, A. G. NORD, P. ARTHUR, N. EARL 2002, In situ preservation of archaeological bone: a histological study within a multidisciplinary approach. – *Archaeometry* 44(3), 343–352.
- JANS, M. M. E., C. M. NIELSEN–MARSH, C. I. SMITH, M. J. COLLINS, H. KARS 2004, Characterisation of microbial attack on archaeological bone. – *Journal of Archaeological Science* 31(1), 87–95.
- KAGERER, P., G. GRUPE 2001, Age-at-death diagnosis and determination of life-history parameters by incremental lines in human dental cementum as an identification aid. – *Forensic Science International* 118(1), 75–82.
- KERLEY, E. R. 1965, The microscopic determination of age in human bone. – *American Journal of Physical Anthropology* 23(2), 149–163.
- KERLEY, E. R., D. H. UBELAKER 1978, Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. – *American Journal of Physical Anthropology* 49(4), 545–546.
- KUREK, M., E. ZADZIŃSKA, A. SITEK, B. BOROWSKA STRUGIŃSKA, I. ROSSET, W. LORKIEWICZ 2015, Prenatal factors associated with the neonatal line thickness in human deciduous incisors. – *HOMO* 66(3), 251–263.
- LEE THORP, J. 2002, Two decades of progress towards understanding fossilization processes and isotopic signals in calcified tissue minerals. – *Archaeometry* 44(3), 435–446.

- LEWIS, A. B., S. M. GARN 1960, The Relationship Between Tooth Formation and Other Maturational Factors. – *The Angle Orthodontist* 30(2), 70–77.
- LIEBERMAN, D. E. 1994, The Biological Basis for Seasonal Increments in Dental Cementum and Their Application to Archaeological Research. – *Journal of Archaeological Science* 21(4), 525–539.
- MARCHIAFAVA, V., E. BONUCCI, A. ASCENZI 1974, Fungal osteoclasia: a model of dead bone resorption. – *Calcified Tissue Research* 14(1), 195–210.
- MISHRA, S., H. F. THOMAS, J. M. FEARNE, A. BOYDE, P. ANDERSON 2009, Comparison of demineralisation rates in pre- and postnatal enamel and at the neonatal line. – *Archives of Oral Biology* 54, S101–S106.
- NANCI, A. 2008, *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Missouri.
- NICHOLSON, R. A. 1996, Bone Degradation, Burial Medium and Species Representation: Debunking the Myths, an Experiment-based Approach. – *Journal of Archaeological Science* 23(4), 513–533.
- NIELSEN MARSH, C. M., C. I. SMITH, M. M. E. JANS, A. NORD, H. KARS, M. J. COLLINS 2007, Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations. – *Journal of Archaeological Science* 34(9), 1523–1531.
- NIELSEN MARSH, C. M., R. E. M. HEDGES 2000, Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of Site Environments. – *Journal of Archaeological Science* 27(12), 1139–1150.
- ORTNER, D. J. 2003, *Identification of pathological conditions in human skeletal remains* (2. izd.). San Diego.
- PIPER, K., G. VALENTINE 2012, Bone Pathology. – V / In: L. S. Bell (ur. / ed.), *Forensic Microscopy for Skeletal Tissues: Methods and Protocols*, Totowa, 51–88.
- RÄMSCH, R., B. ZERNDT 1963, Vergleichende Untersuchungen der Havers'schen Kanäle zwischen Menschen und Haustieren. – *Archiv für Kriminologie* 131, 74–82.
- RÖSING, F. W., M. GRAW, B. MARRÉ, S. RITZTIMME, M. A. ROTHSCHILD, K. RÖTZSCHER, A. SCHMELING, I. SCHRÖDER, G. GESERICK 2007, Recommendations for the forensic diagnosis of sex and age from skeletons. – *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* 58(1), 75–89.
- SABEL, N., C. JOHANSSON, J. KÜHNISCH, A. ROBERTSON, F. STEINIGER, J. G. NORÉN, G. KLINGBERG, S. NIETZSCHE 2008, Neonatal lines in the enamel of primary teeth – A morphological and scanning electron microscopic investigation. – *Archives of Oral Biology* 53(10), 954–963.
- SCHEUER, L., S. M. BLACK 2000, *Developmental Juvenile Osteology*. London, San Diego.
- SHERRARD SMITH, E., E. A. CHADWICK 2010, Age structure of the otter (*Lutra lutra*) population in England and Wales, and problems with cementum ageing. – *IUCN Otter Specialist Group Bulletin* 27(1), 42–49.
- SHIPMAN, P., G. FOSTER, M. SCHOENINGER 1984, Burnt bones and teeth: an experimental study of color, morphology, crystal structure and shrinkage. – *Journal of Archaeological Science* 11(4), 307–325.
- SLOOTWEG, P. J. 2013, Histology of the Teeth and Surrounding Structures. – V / In: P. J. Slootweg, (ur. / ed.), *Dental Pathology: A Practical Introduction*, Berlin, Heidelberg, 9–18.
- SMITH, P., G. AVISHAI 2005, The use of dental criteria for estimating postnatal survival in skeletal remains of infants. – *Journal of Archaeological Science* 32(1), 83–89.
- STARÈ, F. 1975, *Dobova*. Brežice.
- STONE, E. 2005, *Conservation of Archaeological Osseous Materials*. Oregon.
- STREETER, M. 2012, The determination of age in subadult from the rib cortical microstructure. – *Forensic Microscopy for Skeletal Tissues* 915, 101–108.
- STRMČNIK GULIČ, M. 1992, Razvanje. – *Varstvo spomenikov* 34, 290.
- TURNER WALKER, G., M. JANS 2008, Reconstructing taphonomic histories using histological analysis. – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266(3–4), 227–235.

URBANOVA, P., V. NOVOTNY 2005, Distinguishing Between Human and Non-human Bones: Histometric Method for Forensic Anthropology. – *Anthropologie (Brno)* 43(1), 77–85.

UYTTERSCHAUT, H. T. 1985, *Determination of skeletal age by histological methods*. Zeitschrift für Morphologie und Anthropologie.

VINAZZA, M., T. NANUT, M. MIHELČ, M. ČREŠNAR 2015, Arheološka izkopavanja na slovenski strani Novin pri Šentilju. – V / In: M. Črešnar, M. Mele, K. Peitler, M. Vinazza (ur. / eds.), *Archäologische Biographie einer Landschaft an der steirisch-slowenischen Grenze. Ergebnisse des grenzübergreifenden Projekts BorderArch-Steiermark Arheološka biografija krajine ob meji med avstrijsko Štajersko in Slovenijo. Rezultati čezmejnega projekta B*, Graz, Ljubljana, 166–205.

WEDEL, V. L. 2007, Determination of Season at Death Using Dental Cementum Increment Analysis. – *Journal of Forensic Sciences* 52(6), 1334–1337.

WEDEL, V. L., D. J. WESCOTT 2016, Using dental cementum increment analysis to estimate age and season of death in African Americans from an historical cemetery in Missouri. – *International Journal of Paleopathology* 15, 134–139.

WHITTAKER, D. K., D. RICHARDS 1978, Scanning electron microscopy of the neonatal line in human enamel. – *Archives of Oral Biology* 23(1), 45–50.

WITTEWER BACKOFEN, U., J. GAMPE, J. W. VAUPEL 2004, Tooth Cementum Annulation for Age Estimation: Results From a Large Known-Age Validation Study. – *American journal of physical anthropology* 123(2), 119–129.

YOSHINO, M., K. IMAIZUMI, S. MIYASAKA, S. SETA 1994, Histological estimation of age at death using microradiographs of humeral compact bone. – *Forensic Science International* 64(2–3), 191–198.

YOSHINO, M., T. KIMIJIMA, S. MIYASAKA, H. SATO, S. SETA 1991, Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. – *Forensic Science International* 49(2), 143–158.

### *Spletna vira / Web sources:*

Splet 1 / Web 1 : <https://anatomylife.com/compact-of-human-bone-tissue/compact-of-human-bone-tissue-file624-diagram-of-compact-bone-new-wikimedia-commons/> (dostop 14. 10. 2018).

Splet 2 / Web 2: <https://anatomylife.com/compact-of-human-bone-tissue/compact-of-human-bone-tissue-what-is-the-anatomy-of-bone-tissue-unlabeled-diagram-human/> (dostop 14. 10. 2018).

## *Histological Analyses of Skeletal Tissues from Archaeological Contexts*

### *(Summary)*

Analyses of human and animal remains from archaeological contexts are a part of the archaeological post-excavation process. Carried out systematically and precisely, macroscopic, microscopic, and molecular analyses provide a biological profile of the individuals and thus insight into the demographic structure of a population. They also form a foundation for paleoclimate and paleoenvironmental research and help better understand the preservation state of archaeological remains. One part of the analyses of human and animal remains is histology, e.g. analyses of thin sections of tissues under the microscope. Histology offers a view into the microscopic structure of tissue and forms a diagnostic intermediate step between macroscopic and molecular analyses. It is especially beneficial in the case of physically, chemically, and/or biologically altered tissues, when macroscopic analyses fail to provide even basic information about the remains, such as differentiation between humans and animals, and the establishment of biological profile becomes very limited.

Properly performed histological analysis can help with the estimation of preservation state and differentiation between human and animal remains, improves age at death assessment of an individual, and provides a more accurate pathological diagnosis. Regardless of their wide range and benefits, histological analyses in Slovenian archaeological research are rare. The article presents a short review of the possibilities offered by the histological analyses of mammalian skeletal remains from archaeological contexts and illustrates its applicability through small, real case research on the age assessment of five cremated individuals from prehistoric archaeological sites.

Histological analyses of skeletal remains from the archaeological context are best performed on long bones and/or teeth, while in the case of pathology a skeletal element with macroscopically best observable changes is used. A whole tooth or 1–2 cm big bone fragment is sampled and embedded in epoxy resin (Figure 9). Once dry, the sample is cut into thin sections of thickness 70–100  $\mu\text{m}$  using a cooled diamond saw (Figure 10), mounted onto a glass slide and ground (Figure 11) until the structure of sampled tissue is clearly seen. The clean and dry thin-section is covered by a glass coverslip and thus ready to be analysed under the microscope. The microscopy analysis is carried out using an optical microscope

with 50x–200x magnifications. Each slide is systematically and precisely analysed and the most informative parts described and photographed. Based on structural differences, mainly presence of plexiform bone, developmental stages of osteons, their density, organisation and size, number of tooth cementum bands, and presence of neonatal line, histology can help with the differentiation between human and animal bone (Figures 12 and 13), age at death assessment (Figures 14 and 15), recognition of stillbirths (Figure 16), and pathological diagnosis (Figures 17 and 18). Specific patterns in the structure can indicate a taphonomical history of the remains, such as aerobic or anaerobic conditions (Figures 19 and 20), changes in the hydrological regime, butchering, exposure to high temperatures (with or without soft tissue) etc. Furthermore, histological analyses can provide a basis for the assessment of the preservation state of the remains, crucial for sampling, success and accuracy of further molecular analyses.

A small pilot study of five individuals from Slovenian prehistoric sites of Novine, Razvanje, and Dobova illustrates how histological analysis can improve very limited results of macroscopic osteological analyses (Table 1). Once the histological analyses were included into the research, the estimated age at death of the five cremated individuals was narrowed from *adult* or *> 30 years* to the age range of  $\pm 20$  years (Table 2).

A review of histological analyses of skeletal remains from archaeological context shows how histology can improve the interpretation of archaeological data and thus understanding of past societies and environment. Due to highly delicate material, the preparation process and analysis is somewhat more complex, yet outweighed by the wide applicability and newly gained information. Histological analysis can help differentiate between human and animal remains, recognises stillbirths, improves age at death estimation, enables or strengthens palaeopathological diagnosis, and opens a window into the taphonomic processes affecting the remains. Furthermore, it can serve as a pre-screening tool for sampling in case of additional, e.g. aDNA or isotopic, analyses or for determination and establishment of long-term curation conditions. Regardless of the benefits, histological analyses in Slovenia remain rare.