



## Zobje kot vir DNA za genetske preiskave forenzičnih in starodavnih skeletnih ostankov

Teeth as a source of DNA for genetic investigations of forensic and ancient skeletal remains

Hana Brezar,<sup>1</sup> Barbara Mihelič Pečar,<sup>1</sup> Irena Zupanič Pajnič<sup>2</sup>

### Izvleček

Zobje so eno najpogostejše uporabljenih tkiv za izolacijo DNA v forenziki in arheogenetiki, saj jih odlikuje njihova časovna in strukturna obstojnost. V forenzičnih in starodavnih skeletnih ostankih je sicer količina DNA majhna, DNA je poškodovana in degradirana, kar še dodatno otežuje nadaljnjo analizo in genetsko umeščanje. V preglednem članku obravnavamo zgradbo in značilnosti zobnih tkiv, vplive na ohranjenost zob in DNA v njih ter uporabnost zob v forenzičnih in arheogenetskih preiskavah. Pri genetski analizi moramo upoštevati možnost ohranjanja integritete vzorca, zato prikazujemo razlike med klasično destruktivno in sodobno minimalno destruktivno metodo ekstrakcije DNA iz zoba ter prednosti pri uporabi zobnega cementa za pridobitev DNA. Zobni cement omogoča pridobiti visokokakovostno DNA ob ohranjeni integriteti zoba. Metoda ekstrakcije je hitra in učinkovita. Zaradi zmanjšanja števila manualnih korakov pri ekstrakciji iz cementa se zmanjša tudi tveganje za kontaminacijo s sodobno DNA. Prispevek se zaključuje z dognanji s področja razvoja novih tehnik in s perspektivami v prihodnosti.

### Abstract

Teeth are one of the most frequently utilized tissues for DNA isolation and extraction in both forensic science and archaeogenetics, due to their long-term structural integrity and resistance to environmental factors. In skeletal remains, DNA quantity is typically low and often degraded or fragmented, presenting additional challenges for further genetic analysis and identification. In this review article, we present a comprehensive overview of the structural characteristics of dental tissues, factors affecting teeth and DNA preservation, and the applicability of teeth in forensic and archaeological research. In genetic analysis, strategies that ensure the integrity of the samples are especially important. Consequently, conventional, destructive DNA extraction techniques are compared to new, non-destructive approaches, emphasizing the advantages of using tooth cementum. Cementum serves as a reliable, rapidly accessible source of high-quality DNA while maintaining

<sup>1</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

**Korespondenca / Correspondence:** Irena Zupanič Pajnič, e: [irena.zupanic@mf.uni-lj.si](mailto:irena.zupanic@mf.uni-lj.si)

**Ključne besede:** forenzična genetika; arheogenetika; človeški zobje; ekstrakcija DNA; človeški posmrtni ostanki

**Keywords:** forensic genetics; archaeogenetics; human teeth; DNA extraction; human remains

**Prispelo / Received:** 8. 7. 2025 | **Sprejeto / Accepted:** 25. 8. 2025

**Citirajte kot/Cite as:** Brezar H, Mihelič Pečar B, Zupanič Pajnič I. Zobje kot vir DNA za genetske preiskave forenzičnih in starodavnih skeletnih ostankov. Zdrav Vestn. 2025;94(9–10):244–53. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3647>



Avtorske pravice (c) 2025 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

the morphological integrity of the tooth, which is an important consideration. The extraction process, developed with minimal manual handling steps, significantly lowers the risk of contamination with modern DNA. The review article concludes with an insight into recent advancements and future research perspectives in the archaeogenetic and forensic field.

## 1 Uvod

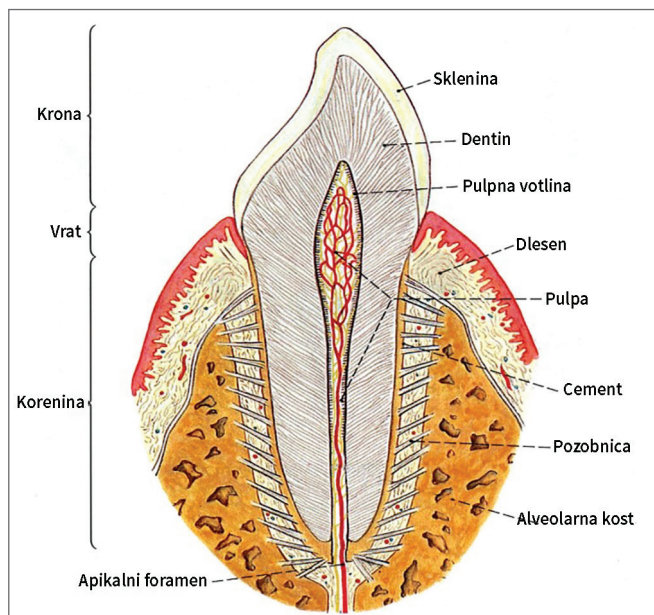
Genetske preiskave DNA skeletnih ostankov so ključnega pomena za identifikacijo posameznikov v forenzičnem kontekstu ter za raziskave genetske zgodovine v arheologiji in paleogenetiki. Arheološki in forenzični ostanki zaradi posmrtnih procesov razgradnje vsebujejo zelo malo DNA, ki je poškodovana in zelo fragmentirana, tako da genetske preiskave niso vedno uspešne. Najbolj obetajoče tarče za izolacijo DNA so zato najbolj obstojna tkiva (1-3). Med vsemi skeletnimi tkivi so zobje eden najbolj zanesljivih virov DNA, predvsem zaradi posebne zgradbe in visoke odpornosti na okoljske vplive. Visoka mineralizacija trdih zobnih tkiv omogoča dolgotrajno ohranjenost tako jedrne kot mitohondrijske DNA (mtDNA) tudi v razmerah, v katerih so mehka tkiva že povsem razpadla (4,5). Zaradi visoke odpornosti in fizične zaščite z okolnimi strukturami (čeljustna kost, jezik in lična sluznica) so zobje eden najboljših virov DNA za identifikacijo močno poškodovanih posmrtnih ostankov (6).

## 2 Zgradba zoba

Zobni organ sestavljata zob in obešalni aparat zoba. Zob anatomsko razdelimo na krono, vrat in korenino (Slika 1). Krono zoba pokriva sklenina, korenino pa cement. V vratu zoba se ti dve strukturi stikata (7,8). Obzobna tkiva so pozobnica, alveolna kost in dlesen. Njihova glavna naloga je, da skupaj s cementom zob vežejo na čeljust (7). Pozobnica, ki jo sestavljajo kolagenska vlakna, ob zobnem vratu prehaja v dlesen. Ob zobu se vpenja na cement, na drugi strani pa v kost. Vsebuje številne fibroblaste, osteoblaste in osteocite ter druge mezenhimske celice (7).

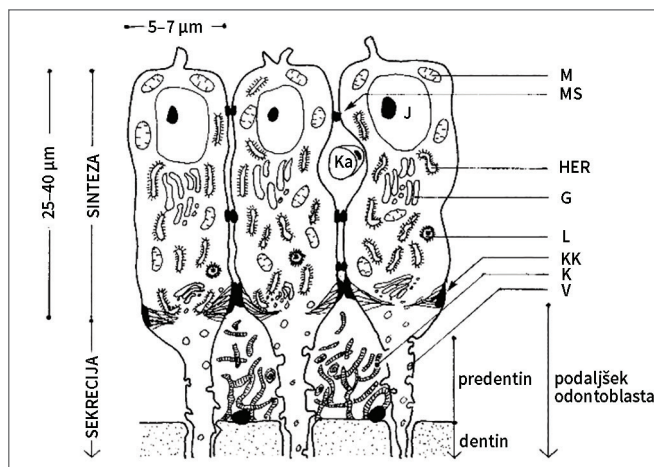
## 3 Distribucija DNA v zobnih tkivih

Histološko zob razdelimo na sklenino, zobovino ali dentin, cement in zobno pulpo (9). Sklenino, ki je najtrša snov v telesu, izdelujejo ameloblasti še pred izrastom zoba v ustno votlino. Po izrastu ameloblasti propadejo (7). Sklenina je v 96 % zgrajena iz anorganskega hidroksiapatita. Ne vsebuje celic in zato ni vir DNA, toda njena integriteta je ključnega pomena za zaščito globljih tkiv (9-11).



**Slika 1:** Anatomska zgradba zoba. Povzeto po Sobotta J, 1993 (8).

Zobovina ali dentin je v 70 % sestavljena iz organske snovi in tvori glavno zobno maso (10). V kroni zoba dentin pokriva sklenina, v korenini pa cement. Je druga najtrša snov v telesu in ščiti zobno pulpo (7). Odontoblasti na površini zobne pulpe tvorijo nemineraliziran predentin, ki nato mineralizira v dentin (Slika 2). Primarni dentin se oblikuje še pred izraščanjem zoba.



**Slika 2:** Shematski prikaz odontoblastov. Povzeto po Vavpotič M, et al., 2005 (13).

Sledi mu sekundarni dentin, ki tvori ozek pas zoba na meji s pulpo. Terciarni dentin se pojavi kot odziv na poškodbe, mehansko obrabo in karies, kar aktivira fibroblaste, krvne celice in odontoblaste, ki so potencialni vir dednega materiala (12). Poleg tega dentin vsebuje kanale s Tomesovimi podaljški odontoblastov, ki lahko segajo vse do sklenine in vsebujejo veliko mitohondrijev (7,13).

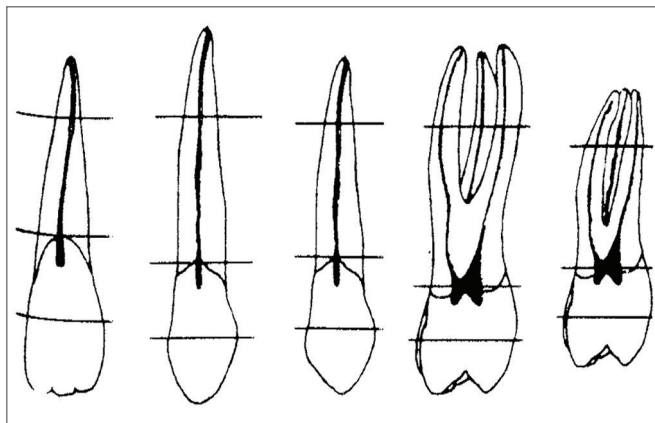
Zobni cement, ki pokriva koreninski dentin, je anatomsko sestavni del zoba, funkcionalno pa spada v obešalni aparat zoba, ker skupaj z obzobnimi tkivi veže zob na čeljust. Njegova zgradba je podobna kosti, saj vsebuje celice, ne vsebuje pa žil in živcev (7). Tvorijo ga cementoblasti in cementociti, ki se v največjem številu pojavljajo na zobnem apeksu, zato je tam plast najdebelejša. Pri hitrem nastajanju cementa se lahko cementoblasti ujamejo v cementu in postanejo cementociti (7). Poleg tega se cement ne remodelira in se v času življenja nalaga in debeli. Po stopnji mineraliziranosti ga uvrščamo med pulpo in dentin (4).

Najgloblje, v središču zoba, je zobna pulpa, mehko vezivno tkivo, ki vsebuje živce in živčne končiče ter drobne krvne žile. Nahaja se v pulpni votlini, ki jo tvorita pulpna komora in koreninski kanal. Apikalni foramen jo povezuje s pozobnico. Poleg glavnega kanala ima vsaka korenina še dodatne, manjše stranske in medkoreninske kanale (7). V primerjavi z ostalimi zobnimi tkivi vsebuje največ genetskega materiala, saj vsebuje največ celic (odontoblasti, fibroblasti, krvne, imunske, dendritične in matične celice ...) (9). Najbogatejši vir DNA v zobeh je prav zobna pulpa. Ta je v pulpni votlini dobro zaščitena, vse dokler je zob trdno zasidran v alveolni kosti. Pulpe večkoreninskih zob je za približno 4-krat več kot pulpe enokoreninskih, količina pa se z leti zmanjšuje zaradi nenehne tvorbe mineralnih plasti dentina (9).

Najprimernejši rezervoarji DNA v zobu so dentin, cement in zobna pulpa, vloga sklenine pa je zaščita tkiv pred okoljskimi dejavniki (9,14,15). Veliko vlogo igra tudi obešalni aparat zoba, saj pritrjuje zob v čeljustne kosti in ga s tem dodatno varuje pred zunanjimi dejavniki, ki spodbujajo razpad (6).

## 4 Intrinzični dejavniki, ki vplivajo na vsebnost DNA v zobeh

Količina DNA močno variira med skupinami zob. Pomembno vlogo pa igrajo tudi zdravje zoba in morebitni endodontski posegi, kronološka starost zoba in čas od odmrta tkiv do ekstrakcije DNA (16).



**Slika 3:** Anatomska delitev zoba. Povzeto po Gaytmenn R, et al., 2003 (6).

### 4.1 Vrsta in posamezni deli zoba

Za genetske analize so najbolj primerni zobje z največjo vsebnostjo zobne pulpe, saj je ta najbolj bogata z genetskim materialom. Pomembno vlogo pri vsebnosti DNA igrajo tudi zobne korenine, predvsem zaradi večje količine celularnega cementa. Zato so po mednarodnih smernicah prva izbira za analizo DNA kočniki in ličniki. Dobra izbira pa so tudi podočniki, saj imajo veliko pulpno votlino (10,17).

Ob upoštevanju anatomske razdelitve zoba sta Gaytmenn in Sweet (2003) ugotavljala, kateri del zoba vsebuje največ DNA. To so: grizna in vratna polovica zobne krone, vratni dve tretjini korenine in apikalna tretjina korenine (Slika 3). Največ DNA sta pridobila iz vratnih dveh tretjin korenine, kjer so prisotni tako pulpa kot dentin in cement. Najmanj DNA je bilo v grizni polovici krone, kjer sta glavni tkivi dentin in sklenina (6).

### 4.2 Kronološka starost

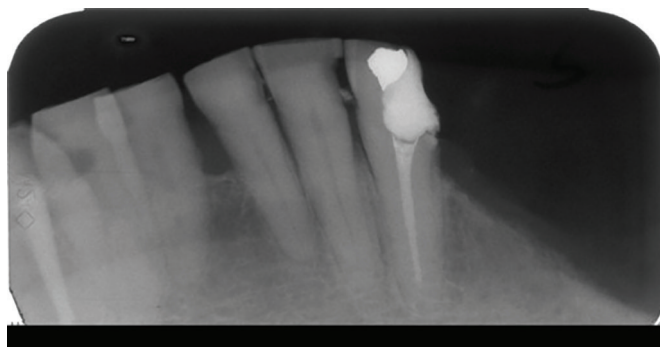
Pri ljudeh se vse od ploda v 10. tednu nosečnosti do pozne starosti v zobeh stalno dogajajo spremembe, ki preko celularnosti zoba vplivajo na vsebnost DNA (18). Leskovar in sodelavci so dokazali višjo vsebnost DNA pri stalnih zobeh odraslih v primerjavi z mlečnimi zobmi (19). Zaradi procesa staranja zoba se prostornina zobne pulpe pri starejših ljudeh (51–59 let) manjša, medtem ko je pri mlajših ljudeh (10–30 let) večja (10,20,21). Starostne spremembe vplivajo tudi na količino DNA v dentinu. Mörnstad (1999) je opisal upadanje količine DNA in predpostavljal, da gre za posledico zapiranja dentinskih kanalov zaradi mineralizacije in degenerativnih sprememb odontoblastnih podaljškov

(22). Starostne spremembe so najbolj očitne predvsem pri sekalcih, manj pa pri podočnikih (20). Nekatere raziskave poročajo o pozitivnem vplivu kronološke starosti zoba na količino pridobljene DNA po smrti posameznika, saj imajo zobje starejših oseb ožje, bolj zaprte apikalne odprtine in so bolj mineralizirani, kar veča odpornost zoba proti okoljskim dejavnikom (10,23).

### 4.3 Zdravje zoba in endodontski posegi

Večina dosedanjih raziskav je pokazala, da bolezni zoba, kot so karies, parodontalna bolezen in okužbe z vnetjem in toksini uničujejo podporna mineralizirana tkiva zob in spodbujajo izgubo cementa ter nastanek terciarnega dentina, kar zmanjšuje količino za ekstrakcijo razpoložljive DNA (10). Najnovejše študije pa v nasprotju s starejšimi nakazujejo pozitiven vpliv nekaterih bolezni (kot je parodontalna bolezen) na integriteto, količino in kakovost izolirane DNA zaradi povečane količine vnetnih celic v zobnih tkivih, kar veča količino razpoložljive DNA v zobni pulpi. Pri tem je ključnega pomena, da bolezen ni tako napredovala, da bi se uničila pulpa (15,17). Pri obolelih zobeh je za izolacijo DNA poleg pulpe najbolj zanesljiv cement, pri katerem pa bolezni zoba nimajo večjega vpliva na razgradnjo DNA, medtem ko v dentinu DNA praktično ni (24).

Veliko vlogo pri uspešnosti pridobivanja DNA imajo tudi morebitni endodontski posegi, ki zmanjšujejo količino razpoložljive DNA (Slika 4). Količina DNA v endodontsko zdravljenih zobeh je zaradi odstranitve pulpe po izsledkih nekaterih študij za kar 100-krat manjša kot v nezdravljenih zobeh (4,25,26). Kljub manjši vsebnosti DNA je te vseeno dovolj za uspešno pomnožitev z reakcijo PCR, kar kaže na morebitno prisotnost DNA v trdih tkivih zoba, saj je zobna pulpa odstranjena. Pri takih vzorcih je tako potrebno DNA izolirati iz trdih



**Slika 4:** Rentgenska slika vitalnih zob (na levem delu slike) in endodontsko zdravljenega – polnjenega zoba (zob skrajno desno). Povzeto po Vavpotič M, et al., 2005 (13).

zobnih tkiv, kot sta cement in dentin (27). Raziskave so pokazale, da karies in plombirni materiali ne vplivajo na ekstrakcijo in kasnejše pomnoževanje DNA (27).

## 5 Ekstrinzični dejavniki, ki vplivajo na vsebnost DNA v zobeh

V živih organizmih se celice neprestano delijo in s popravljivimi mehanizmi ohranjajo integriteto genoma. Po smrti pride, zaradi prenehanja delovanja teh encimov, hidrolize in depurinacije nukleotidov, do delecij nukleotidnega zaporedja, navzkrižnega povezovanja in razgradnje verig DNA z endoceličnimi nukleazami ter fragmentacije do dolžine 40–500 baznih parov. Trdna zobna tkiva pa se zaradi odpornosti na hitro encimsko in temperaturno razgradnjo še dlje časa ohranijo v ekstremnih okoljih. Dodatno stabilnost omogoča močna afiniteta DNA do hidroksiapatita v starih kosteh in zobeh, kjer pride do interakcij med fosfatnimi skupinami DNA in hidroksilnimi mesti na hidroksiapatitu, kar omogoča adsorpcijo DNA na mineralno površino (28).

Stopnja poškodb, ohranjenost in količina genetskega materiala so odvisni od strukturne sestave in zunanjih dejavnikov ter njihovega trajanja, kar vpliva na stabilnost in razgradnjo preiskovanih tkiv (23,29–31).

### 5.1 Temperatura

Raziskave so pokazale, da največ škode mineraliziranim tkivom povzročajo temperaturna nihanja v okolju, okolja s stabilnimi temperaturami pa diagenozo zaustavljajo (2,32–34). V nekaterih študijah poročajo, da temperaturna nihanja v razponu zgolj 2 °C pomembno vplivajo na ohranjanje DNA, pri čemer je izolacija DNA manj uspešna pri vzorcih, izpostavljenih višjim temperaturam (23,31). Vse raziskave pa poudarjajo, da so spremembe v uspešnosti pridobivanja DNA iz zoba zaradi temperature močno odvisne tudi od drugih okoliščin in da hitrosti razgradnje DNA zgolj zaradi temperaturnih vplivov ni mogoče zanesljivo napovedati (23).

Pri obravnavi temperaturnih dejavnikov je zelo pomembno omeniti še kremirane posmrtno ostanke, ki so izpostavljeni zelo visokim temperaturam. Zobna pulpa je obdana z mineraliziranimi tkivi, ki delujejo kot toplotna zaščita in jo do določene mere varujejo pred termično degradacijo. Toda pri temperaturah, višjih od 500 °C, kljub temu pride do karbonizacije zobne pulpe in s tem uničenja DNA (35). Tudi pri cementu je obseg odpornosti na visoke temperature omejen, pri čemer pa nedavne raziskave potrjujejo, da pride pri upepelitvi v zobeh do popolne degradacije DNA (36–38).



## 5.2 Kemijska zgradba okolja in vlažnost tal

Sestava tal ima velik pomen, saj se DNA z vezavo na mineralne komponente zaščiti pred encimsko razgradnjo, še posebej od mikroorganizmov (39). Nizek pH, prisotnost kationov, pozitivno nabitih površin glin ter drugih mineralnih komponent lahko poveča adsorpcijo DNA, ki je v tej obliki manj dostopna encimom in mikroorganizmom (34,39-41). Druge študije kažejo, da se mineralna sestava zoba najbolj ohranja v nevtralnih ali rahlo alkalnih razmerah, saj v kislih razmerah organska tkiva, kot je pulpa, razpadajo hitreje (42).

Režimi zamrzovanja in odtaljevanja ter ciklično močenje in sušenje povzročajo nabrekanje in krčenje snovi, kar vodi do mehanskih napetosti in zato do fizičnih poškodb, kot so razpoke in luščenje zob (2,4,10,33,43). To so pogosto opazili tako pri zobeh, ki niso bili zakopani, kot tudi pri zakopanih zobeh (33,43). Nekatere študije so pokazale, da zobje, izpostavljeni na prostem, dajejo boljše rezultate kot tisti, zakopani v zemlji. Toda ohranjenost je zelo odvisna od zaščite apikalne odprtine zoba (31). V suhem okolju zaradi mumifikacije in dehidracije pulpe ne pride do razkrojnih in nekrotičnih procesov, kar prispeva k dobri ohranitvi DNA. Najnižje koncentracije DNA dajejo vzorci, potopljeni v vodi, predvsem zaradi hidrolize molekul DNA in vpliva vodnih ekosistemov (2,31).

## 6 Metode ekstrakcije DNA iz zob

V zadnjih desetletjih so se načini pridobivanja DNA iz zob preoblikovali od preprostih in destruktivnih načinov k tehnično dovršenim in manj invazivnim pristopom, prilagojenim različnim znanstvenim področjem. V primeru starosti in slabe ohranjenosti je tako pri analizi zobne DNA pomembna izbira prave metode, postopka ekstrakcije in samega zoba. Zlati standard zaradi največjega volumna zobne pulpe predstavljajo kočniki. Sledijo jim ličniki, podočniki in sekalci (10,17). Osnovni princip preiskav temelji na zmletju celotnega zoba, saj je na tak način možno pridobiti DNA iz vseh, tudi trdnih zobnih tkiv (10). Vključena je tudi demineralizacija prahu s pufrom EDTA, ki deluje kot kelator kovinskih ionov, kot so kalcijevi in magnezijevi ioni (44-46). Končno purifikacijo DNA običajno izvajamo z različnimi komercialnimi kompleti in avtomatiziranimi postopki (15,46-49).

Destruktivni postopki sicer omogočajo pridobiti največje količine vzorca za ekstrakcijo DNA, vendar se ob tem arheološki oz. forenzični vzorci poškodujejo ali povsem uničijo. Zato so preiskave neponovljive, hkrati

pa metode spremljajo etična vprašanja in pomisleki. Poleg posega v kulturno dediščino lahko klasični pristop z mletjem zoba oteži ekstrakcijo DNA, saj lahko prisotnost mineralov in kolagena moti pomnoževanje DNA v reakciji PCR (10,50).

Standardni postopki ekstrakcije DNA iz zob so torej invazivne narave, saj vključujejo mehansko obdelavo (vrtanje ali mletje zoba) in kemijsko lizo pridobljenega materiala (6,10,27). Manj invazivna alternativa je lupljenje, rezanje in vrtanje zoba ali namakanje v komercialnih demineralizacijskih pufrih različnih ponudnikov (15,51). Te metode se poslužujejo forenzični laboratoriji, ki nimajo ustrezne infrastrukture za mletje in procesiranje fino mletih vzorcev (52).

Nove metode temeljijo na minimalno invazivnem pristopu, ohranjanju vzorca in večji občutljivosti pri zelo degradirani DNA. Pri forenzičnih vzorcih je bolj aktualno minimalno vrtanje v zob in dostop do pulpne votline. Pri arheoloških vzorcih, pri katerih pa pulpa, razen pri specifičnih pogojih, ni ohranjena, so zato tarča ekstrakcije DNA druga zobna tkiva (53). Vse več se za analizo DNA uporablja zobni cement, ki je zaradi lege na površini zoba enostavno dostopen in ne zahteva invazivnega poseganja v preostanek zoba. Najnovejše metode tako ohranijo integriteto zoba in s targetiranjem zobnega cementa na površini zobne korenine omogočajo morebitne nadaljnje morfološke raziskave (54). Po namakanju celotnega zoba v demineralizacijske pufre komercialnim lizijskim pufrom izpostavimo le zobno korenino in pridobimo raztopino, ki se uporabi za nadaljnje avtomatizirane postopke ekstrakcije in purifikacije DNA. Ob tem ostane zob ohranjen in vizualno skoraj nepoškodovan, razen če ni že prej poškodovan, ali če gre za krhkejšje vzorce (54,55).

Zaradi ohranitve vzorcev, ki so pogosto predmet neponovljivih (arheo)genetskih analiz, je tudi z etičnega vidika še posebej pomembno čim manjše poseganje vanje. Zato se v takih primerih najpogosteje uporabljajo minimalno destruktivne metode pridobivanja DNA. Ta pristop pa ni omejen zgolj na človeka, temveč se uporablja tudi pri živalskih, zlasti izumrlih vrstah, pri katerih analiza vzorcev prispeva k razumevanju biodiverzitet in filogenetskih povezav, zato je njihovo ohranjanje za prihodnje morfološke in genetske študije ključnega pomena (54,56).

Kontaminacija s sodobno DNA predstavlja enega največjih izzivov pri delu s starodavnimi ali nizkokakovostnimi vzorci, saj je določena stopnja kontaminacije laboratorija s sodobno, eksogeno DNA praktično neizogibna (25,51,57). Ključnega pomena pri izogibanju kontaminacije DNA sta delo v posebnih laboratorijih s

strogimi protokoli in upoštevanje jasnih meril za potrjevanje avtentičnosti DNA (25,52,58). Laboratoriji, namenjeni delu z starodavno DNA, morajo biti fizično ločeni od prostorov za analizo produktov PCR. Vsa oprema se mora uporabljati izključno za delo s starodavno DNA in mora biti, vključno z reagenti, kemično očiščena, sterilizirana in obsevana z UV svetlobo. Pri preprečevanju kontaminacije je pomembno tudi avtomatiziranje metod, saj več ročnih postopkov poveča tveganje za kontaminacijo s sodobno DNA.

Merila za določanje avtentičnosti DNA vključujejo uporabo negativnih ekstrakcijskih kontrol, negativnih kontrol reakcije PCR, dupliciranje preiskav in inverzno korelacijo med količino in dolžino pridobljene DNA. Ker je stara ali poškodovana DNA fragmentirana, pričakujemo namreč veliko krajših fragmentov in manj daljših (30). Za preverjanje morebitne prisotnosti eksogene DNA se pred analizo vzpostavijo izključitvene zbirke vzorcev z genetskimi profili vseh udeleženih v procesu dela z vzorci, in sicer tako na terenu kot v laboratoriju (59).

## 7 Uporaba zob v forenzičnih preiskavah

Iz zob izolirana DNA je ključnega pomena pri identifikaciji žrtev nesreč, zločinov, množičnih nesreč ali naravnih katastrof, kjer drugih tkiv zaradi spremenjenosti ali posmrtnih sprememb ne moremo uporabiti (60,61). Interpol je leta 2002 ustvaril mednarodno bazo DNA z več kot 280.000 profili iz 89 držav, ki se uporabljajo za posmrtno identifikacijo ostankov, poleg tega pa tudi za pomoč pri preiskovanju različnih kaznivih dejanj (62). Zobe kot vir DNA za identifikacijo skeletiziranih posmrtnih ostankov pogosto uporabljajo na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v rutinskih sodnomedicinskih identifikacijskih primerih v Sloveniji. Prav tako jih uporabljajo za identifikacijo posmrtnih ostankov žrtev povojnih grobišč, pri katerih so zobje najboljši vir DNA (63,64).

Analiza posmrtnih ostankov je bila izvedena tudi v hrvaškem naselju Osor na Cresu, kjer je bilo odkrito množično grobišče italijanskih vojakov iz časa druge svetovne vojne. Za identifikacijo so bili uporabljeni kostni in zobni vzorci, iz katerih so pridobili 24 avtosomnih profilov in haplotipov kromosoma Y. Primerjava z DNA domnevnih potomcev je vodila do uspešne identifikacije oz. potrditve očetovske linije pri 10 žrtvah. Poleg vojakov je bilo najdenih tudi 6 ženskih okostij, domnevno lokalnih prebivalc, a brez sorodstvenih povezav do drugega reda (65).

Z analizo označevalcev STR so iz 4 kočnikov in 2

kostnih vzorcev na Inštitutu za sodno medicino identificirali moško okostje iz leta 1944, ki je bilo odkrito skupaj z ženskim skeletom leta 2015. Okostja njegove soproge zaradi pomanjkanja primerjalnih vzorcev sorodnikov sprva ni bilo možno identificirati. Z dodatno izvedenimi metodami NGS za napoved barve las in oči pa jo je bilo mogoče primerjati s portretom slikarke Ivane Kobilce in dodatno prispevati k potrditvi njene identitete (64).

Čeprav so zobje dragoceni vir DNA, je z etičnega in humanitarnega vidika pomembno uporabiti metode za pridobivanje DNA brez uničenja zob, saj je s tem svojem omogočeno vračanje kompletnih posmrtnih ostankov. Kombinacija molekularnogenetskih preiskav je bistvenega pomena za uspešno identifikacijo skeletnih ostankov žrtev množičnih pobojev, ne le zaradi zgodovinskega, ampak tudi zaradi pravnega in antropološkega vidika.

## 8 Uporaba zob v arheogenetskih preiskavah

Arheogenetika je interdisciplinarna veda, ki vključuje strokovnjake več področij – arheologe, genetike in bioinformatike – ter se ukvarja z analizo starodavne DNA. Gre za analizo DNA, izolirane iz slabo ohranjenih, lahko več stoletij ali tisočletij starih vzorcev; arheološki vzorci so po nekaterih virih vzorci, starejši od 50 let, po Bouwmanu pa za arheološke opredelimo tudi vzorce, starejše od 70 let po smrti osebe (66,67). V Sloveniji se za arheološko najdbo smatra arheološka ostalina, ki prispeva k odkrivanju zgodovinskega razvoja, je hranjena pod zemljo ali pod vodo vsaj 100 let in ima lastnosti dediščine. Poleg tega se za ostalino smatrajo tudi predmeti, povezani z grobišči, ki so bili hranjeni pod zemljo ali vodo vsaj 50 let (68). Z analizo starodavne DNA lahko preučujemo tudi selitve človeških populacij, njihove genetske značilnosti in bolezni ter evulucijske procese (69).

Visoka stopnja degradacije DNA poleg kontaminacije s sodobno DNA pomeni poseben izziv za raziskovalce. Zato so potrebni dodatni koraki na področju raziskovalnih procesov in previdnostnih ukrepov za preprečevanje kontaminacije. Komercialni ekstrakcijski kompleti pogosto ne dosegajo učinkovite izolacije DNA, saj so postopki avtomatizacije optimizirani za kakovostnejše vzorce. Ob uporabi avtomatiziranih postopkov lahko pride do izgube podatkov, interference z inhibitorji in do suboptimalnih rezultatov, zato v arheogenetiki ostaja ključnega pomena kombinirani pristop (70).

V arheogenetskih preiskavah fragmentirane starodavne DNA se tako najpogosteje uporabljajo kratki označevalci SNP, saj je pomnoževanje kratkih odsekov zaradi degradiranosti DNA uspešnejše. Poleg analize avtosomske DNA pa sorodstvenim linijam sledimo tudi s kromosomom Y in mtDNA, ki se skozi generacije prenašata v nespremenjeni obliki (4).

Na Slovenskem je bila leta 2011 opravljena prva arheogenetska molekularna preiskava slabo ohranjenih delov skeletov (kosti in zob) iz 17. stoletja, najdenih v Auerpergovki kapeli (sedanja kapela cerkve Frančiškanskega samostana). Iz zob so izolirali DNA in uspešno tipizirali mikrosatelit avtosomov in kromosoma Y ter DNA (63).

Kombinacija več arheoloških in molekularnih preiskav pa omogoča tudi vpogled v precej starejša, in sicer v antična obdobja; analiza skeletov 4 oseb, pokopanih na grobišču Pristava na Bledu, je okostja časovno umestila v 5. in 6. stoletje. Pokop več skeletov v enem grobu je redka najdba. V tem primeru pa je šlo glede na rezultate preiskav za hkraten pokop družinskih članov. V pomoč pri umestitvi so bili: nakit, najden v grobovih, makroskopske in histološke analize ter preiskave DNA. Z analizo starodavne DNA so bili določeni spol in sorodstvena razmerja vseh 4 okostij (71,72). Poleg tega pa je bilo prek analize stabilnih izotopov možno tudi oceniti njihove prehranjevalne navade in stres, ki so bili v večji meri odvisni od takratne klimatske situacije in družbenozgodovinskega konteksta (60,61).

V svetovnem merilu izstopa najnovejša študija sekvenciranja celotnega genoma iz zoba moškega višjega sloja staroegipčanske družbe, ki je doživela svoj razcvet okoli 3.000 let pr. n. št. K izvrstno ohranjeni DNA je verjetno prispeval pokop v keramični posodi v grobnici, vklesani v skalo. Rezultati sekvenciranja so pokazali genetske povezave z zgodnjimi severnoafriškimi ljudstvi ter prebivalstvom območja rodovitnega polmeseca, kar kaže ne le na kulturno-trgovske stike, temveč tudi na migracije prebivalstva (73).

V arheogenetskih preiskavah je še posebej pomembno interdisciplinarno sodelovanje, saj je, še posebej pri slabše ohranjenih vzorcih, dopolnjevanje analiz ključnega pomena. Iz zgodovinskega konteksta je možno sklepati o kompleksnih družbenih, kulturnih in političnih dogodkih ter naravnih procesih svetovne razsežnosti, kar omogoča boljši vpogled v delovanje družbenih struktur skozi čas.

## 9 Izzivi in omejitve

Ker so zobje pogosto boljše zaščiteni pred vplivi okolja kot druge kostne strukture, predstavljajo enega

najbolj zanesljivih virov starodavne DNA. Kljub temu pa je izbira zoba in natančnost pri postopkih ekstrakcije ključnega pomena, saj neprimeren pristop lahko povzroči dodatno izgubo dragocenega genetskega materiala ali poveča tveganje za kontaminacijo. Omejitev količine in kakovosti vzorca je prisotna predvsem pri študijah starodavne DNA, saj so razpoložljivi vzorci nemalokrat degradirani in poškodovani do te mere, da iz njih ni mogoče pridobiti zadostne količine DNA za genetske preiskave (61). Ob tem lahko pride tudi do kontaminacije s sodobno DNA ob izkopavanju skeletov, pri transportu, shranjevanju in ob samih laboratorijskih postopkih. Pri tem je pomembno upoštevati standardne ukrepe in večkrat preveriti avtentičnost preiskovane DNA.

Sodobne analize zaradi svoje kompleksnosti nemalokrat zahtevajo visoko stopnjo izkušenosti in natančnosti, za kar je potrebna skupina strokovnjakov več področij in njihovo medsebojno dopolnjevanje. Optimizacija in nove metode pa so lahko tudi večji strošek za laboratorije (74).

## 10 Najnovejša dognanja in prihodnje perspektive

Z večletnim razvojem novih tehnik, od reakcije PCR in sekvenciranja prve generacije vse do proteomike, lipodomike, izotopske analize in sekvenciranja tretje generacije, je možna tudi analiza zelo kratkih fragmentov starodavne DNA (75).

V arheogenetskih preiskavah pridobiva na pomembnosti proteomika, tj. veda o analizi proteinov, ki izkorišča dolgo obstojnost proteinov in z njihovo analizo dopolnjuje morfološke in genetske študije. Novodobni masni spektrometri omogočajo visoko ločljivost in občutljivost pri analizi proteinov ter omogočajo določanje sorodstvenih povezav na podlagi podobnosti proteinskih zaporedij (76,77). Posebno vlogo ima v analizi zob, saj je sklenina zaradi svoje obstojnosti dober vir proteinskih označevalcev. V paleoproteomiki je možna določitev spola na podlagi vsebnosti amelogenina, proteina zobne sklenine, ki se nahaja v specifičnih oblikah X (AMELX) in Y (AMELY) (78,79).

V procesu ekstrakcije velja nameniti poudarek tudi avtomatizaciji postopkov, kar poleg zmanjšanja verjetnosti za kontaminacijo omogoči precizno in hitrejšo izvedbo raziskovalnega procesa. To je še posebej pomembno na forenzičnih področjih (74). Za razliko od forenzičnih vzorcev, ki so pogosteje boljše ohranjeni, pa se na področju paleogenetike fokus usmerja predvsem v razvoj novih tehnik za sekvenciranje močno fragmentiranih

odsekov DNA, saj so avtomatizirani procesi pogosto manj učinkoviti (70).

V skladu z naprednimi novimi metodami ekstrakcije poteka tudi razvoj nedestruktivnih metod in standardiziranih protokolov le-teh z namenom povzročiti čim manj sprememb na arheološkem vzorcu. Pri zobeh to pomeni optimizacijo postopkov, ki omogočajo pridobiti čim večji nabor podatkov že iz enega samega zoba ob minimalnem posegu v njegovo strukturo, kar je ključnega pomena tako z vidika ohranjanja občutljive kulturne dediščine kot etičnosti raziskovanja (80).

## 11 Zaključki

Identifikacija vzorcev skeletnih ostankov je pomembna tako z zgodovinskega kot tudi s pravnega in etičnega vidika, še zlasti v primerih, ko se ohranijo le delni, degradirani skeletni ostanki in DNA postane ključni vir

informacij. Med enega najzanesljivejših virov uvrščamo zobe, ki kljub številnim intrinzičnim in ekstrinzičnim dejavnikom zaradi svoje mineraliziranosti dobro ohranjajo genetski material tudi v neugodnih okoljih. Glede na ohranjenost in etične zadržke je pomembna tudi izbira pravilne tehnike ekstrakcije DNA, ki sega od popolne destrukcije zoba do zgolj minimalnega poseganja v tkivo z minimalno destruktivnimi metodami. Razvoj novih metod omogoča analiziranje krajših in slabše ohranjenih fragmentov DNA, uporabnost novih tkiv ter optimizacijo na področju postopkov ekstrakcije DNA. Nenazadnje pa ponuja možnost ohraniti integriteto zoba za vrnitev vzorcev svojcem, za uvrstitev v muzejske zbirke ali shranjevanje v arhivih.

## Izjava o navzkrižju interesov

Avtorice nimamo navzkrižja interesov.

## Literatura

- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. Ancient DNA. *Nat Rev Genet.* 2001;2(5):353-9. DOI: [10.1038/35072071](#) PMID: [11331901](#)
- Kendall C, Eriksen AM, Kontopoulos I, Collins MJ, Turner-Walker G. Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 2018;491:21-37. DOI: [10.1016/j.palaeo.2017.11.041](#)
- Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MT. DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat.* 2012;194(1):7-16. DOI: [10.1016/j.aanat.2011.07.003](#) PMID: [21855309](#)
- Zupanič Pajnič I. Molekularnogenetska identifikacija skeletnih ostankov. *Med Razgl.* 2013;52(2):213-34.
- Pfeiffer H, Hühne J, Seitz B, Brinkmann B. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med.* 1999;112(2):142-4. DOI: [10.1007/s004140050219](#) PMID: [10048676](#)
- Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci.* 2003;48(3):622-5. DOI: [10.1520/JFS2002372](#) PMID: [12762534](#)
- Petrovič D, Zorc M. Histologija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo; 2005.
- Sobotta J. Atlas der Anatomie des Menschen. Vol. 1. München: Urban&Schwarzenberg; 1993.
- Chiego J. Essentials of Oral Histology and Embryology: A Clinical Approach. 6th ed. Amsterdam: Elsevier; 2024.
- Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Sci Justice.* 2013;53(4):433-41. DOI: [10.1016/j.scijus.2013.06.001](#) PMID: [24188345](#)
- Bertacci A, Chersoni S, Davidson CL, Prati C. In vivo enamel fluid movement. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(3):169-73. DOI: [10.1111/j.1600-0722.2007.00445.x](#) PMID: [17587290](#)
- Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat Med J.* 2003;44(3):306-9. PMID: [12808723](#)
- Vavpotič M, Balažič J. Zob kot vir DNA. In: 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plačnika. Ljubljana. 30. november - 2. december 2005;
- Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR, Holland MM. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *J Forensic Sci.* 1993;38(5):1194-209. DOI: [10.1520/JFS13524J](#) PMID: [8228888](#)
- Pinchi V, Torricelli F, Nutini AL, Conti M, Iozzi S, Norelli GA. Techniques of dental DNA extraction: some operative experiences. *Forensic Sci Int.* 2011;204(1-3):111-4. DOI: [10.1016/j.forsciint.2010.05.010](#) PMID: [20558019](#)
- Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszkowski L, McNally L, Kobylinsky L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci.* 1991;36(4):979-90. DOI: [10.1520/JFS13113J](#) PMID: [1680960](#)
- Heathfield LJ, Haikney TE, Mole CG, Finaughty C, Zachou AM, Gibbon VE. Forensic human identification: investigation into tooth morphology and DNA extraction methods from teeth. *Sci Justice.* 2021;61(4):339-44. DOI: [10.1016/j.scijus.2021.05.005](#) PMID: [34172122](#)
- Altini M. Age determination from the teeth - a review. *J Dent Assoc S Afr.* 1983;38(5):275-9. PMID: [6356483](#)
- Leskovaar T, Pajnič IZ. Comparative analysis of DNA preservation in permanent and deciduous teeth of adults and non-adults: implications for archaeological and forensic research. *Forensic Sci Int.* 2023;353. DOI: [10.1016/j.forsciint.2023.111882](#) PMID: [37979239](#)
- Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(4):474-82. DOI: [10.1067/moe.2002.120974](#) PMID: [12029288](#)
- Štampelj I, Vidmar G, Cvetko E, Gašperšič D. Cementum thickness in multiracial human molars: a histometric study by light microscopy. *Ann Anat.* 2008;190(2):129-39. DOI: [10.1016/j.aanat.2007.10.006](#) PMID: [18413266](#)
- Mörnstad H, Pfeiffer H, Yoon C, Teivens A. Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int J Legal Med.* 1999;112(2):98-100. DOI: [10.1007/s004140050209](#) PMID: [10048666](#)
- Higgins D, Rohrlach AB, Kaidonis J, Townsend G, Austin JJ. Differential nuclear and mitochondrial DNA preservation in post-mortem teeth with implications for forensic and ancient DNA studies. *PLoS One.* 2015;10(5). DOI: [10.1371/journal.pone.0126935](#) PMID: [25992635](#)



24. Higgins D, Kaidonis J, Austin J, Townsend G, James H, Hughes T. Dentine and cementum as sources of nuclear DNA for use in human identification. *Aust J Forensic Sci.* 2011;43(4):287-95. DOI: [10.1080/00450618.2011.583278](https://doi.org/10.1080/00450618.2011.583278)
25. Corte-Real A, Anjos MJ, Vieira DM, Gamero JJ. The tooth for molecular analysis and identification : a forensic approach. *J Forensic Odontostomatol.* 2012;30(1):22-8. PMID: [23000808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23000808/)
26. Zupanič Pajnič I. Molecular genetic aspects of ancient dna analyses. *Zdr Vestn.* 2020;89(3-4):171-89. DOI: [10.6016/ZdravVestn.2923](https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.2923)
27. Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. *J Forensic Sci.* 1998;43(6):1199-202. DOI: [10.1520/JFS14385J](https://doi.org/10.1520/JFS14385J) PMID: [9846398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9846398/)
28. Götherström A, Collins MJ, Angerbjörn A, Lidén K. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry.* 2002;44(3):395-404. DOI: [10.1111/1475-4754.00072](https://doi.org/10.1111/1475-4754.00072)
29. Dabney J, Meyer M, Pääbo S. Ancient DNA damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(7):a012567-012567. DOI: [10.1101/cshperspect.a012567](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012567) PMID: [23729639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23729639/)
30. Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet.* 2004;38(1):645-79. DOI: [10.1146/annurev.genet.37.110801.143214](https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143214) PMID: [15568989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15568989/)
31. Alvarez García A, Muñoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodríguez-Calvo MS, Carracedo A. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med.* 1996;109(3):125-9. DOI: [10.1007/BF01369671](https://doi.org/10.1007/BF01369671) PMID: [8956985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8956985/)
32. Kunadiya MB, Burgess TI, Dunstan WA, White D, Hardy GE. Persistence and degradation of *Phytophthora cinnamomi* DNA and RNA in different soil types. *Environ DNA.* 2021;3(1):92-104. DOI: [10.1002/edn3.127](https://doi.org/10.1002/edn3.127)
33. Fernández-Jalvo Y, Andrews P, Pesquero D, Smith C, Marín-Monfort D, Sánchez B, et al. Early bone diagenesis in temperate environments: Part I: Surface features and histology. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 2010;288(1):62-81. DOI: [10.1016/j.palaeo.2009.12.016](https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2009.12.016)
34. Nielsen-Marsh C, Gernaey A, Turner-Walker G, Hedges R, Pike A, Collins M. The chemical degradation of bone. In: Cox M, Mays S, eds. *Human osteology in archaeology and forensic science.* London: Greenwich Medical Media Ltd; 2000.
35. Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002;23(3):268-71. DOI: [10.1097/0000433-200209000-00013](https://doi.org/10.1097/0000433-200209000-00013) PMID: [12198355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12198355/)
36. von Wurmb-Schwark N, Ringleb A, Gebühr M, Simeoni E. Genetic analysis of modern and historical burned human remains. *Anthropol Anz.* 2005;63(1):1-12. DOI: [10.1127/anthranz/63/2005/1](https://doi.org/10.1127/anthranz/63/2005/1) PMID: [15830583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15830583/)
37. Sandholzer M. Heat-induced alterations of dental tissues: thesis for doctor of philosophy. Birmingham: University of Birmingham; 2014.
38. Gasque K. Human identification analysis using PCR from the root portion of dental elements under different conditions of temperature and exposure time. *Rev Sul-Bras Odontol.* 2012;9:67.
39. Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH, Hart MM, Powell JR, Kironomos JN, et al. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol Biochem.* 2007;39(12):2977-91. DOI: [10.1016/j.soilbio.2007.06.020](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020)
40. Emmons AL. The Preservation and Persistence of Human DNA in Soil during Cadaver Decomposition. *Sci Justice.* 2017;57(5):341-8. DOI: [10.1016/j.scijus.2017.05.002](https://doi.org/10.1016/j.scijus.2017.05.002) PMID: [28889863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28889863/)
41. Turner-Walker G. The chemical and microbial degradation of bones and teeth. In: *Advances in human palaeopathology.* John Wiley & Sons; 2007. pp. 3-29. DOI: [10.1002/9780470724187.ch1](https://doi.org/10.1002/9780470724187.ch1)
42. Burger J, Hummel S, Hermann B, Henke W. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis.* 1999;20(8):1722-8. DOI: [10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991201\)20:18%3C3483::AID-ELPS3483%3E3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18%3C3483::AID-ELPS3483%3E3.0.CO;2-R) PMID: [10435438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10435438/)
43. Pokines JT, Faillace K, Berger J, Pirtle D, Sharpe M, Curtis A, et al. The effects of repeated wet-dry cycles as a component of bone weathering. *J Archaeol Sci Rep.* 2018;17:433-41. DOI: [10.1016/j.jasrep.2017.11.025](https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.11.025)
44. Serper A, Calt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. *J Endod.* 2002;28(7):501-2. DOI: [10.1097/00004770-200207000-00002](https://doi.org/10.1097/00004770-200207000-00002) PMID: [12126374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12126374/)
45. Pang S, Su FY, Green A, Salim J, McKittrick J, Jasiuk I. Comparison of different protocols for demineralization of cortical bone. *Sci Rep.* 2021;11(1):7012. DOI: [10.1038/s41598-021-86257-4](https://doi.org/10.1038/s41598-021-86257-4) PMID: [33782429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33782429/)
46. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):191-5. DOI: [10.1016/j.fsigen.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006) PMID: [19083754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19083754/)
47. Amory S, Huel R, Bilić A, Loreille O, Parsons TJ. Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(3):398-406. DOI: [10.1016/j.fsigen.2011.08.004](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.004) PMID: [21885362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21885362/)
48. Pajnič IZ. Extraction of DNA from Human Skeletal Material. *Methods Mol Biol.* 2016;1420:89-108. DOI: [10.1007/978-1-4939-3597-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_7) PMID: [27259733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27259733/)
49. Zupanič Pajnič I, Leskovaar T, Zupanc T, Podovšovnik E. A fast and highly efficient automated DNA extraction method from small quantities of bone powder from aged bone samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2023;65. DOI: [10.1016/j.fsigen.2023.102882](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102882) PMID: [37141673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37141673/)
50. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci.* 2010;55(1):25-33. DOI: [10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x) PMID: [20015162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20015162/)
51. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc.* 2007;2(7):1756-62. DOI: [10.1038/nprot.2007.247](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247) PMID: [17641642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17641642/)
52. Harrel M, Hughes-Stamm S. A Powder-free DNA Extraction Workflow for Skeletal Samples. *J Forensic Sci.* 2020;65(2):601-9. DOI: [10.1111/1556-4029.14197](https://doi.org/10.1111/1556-4029.14197) PMID: [31577371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31577371/)
53. Higgins D, Kaidonis J, Townsend G, Hughes T, Austin JJ. Targeted sampling of cementum for recovery of nuclear DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures. *Investig Genet.* 2013;4(1):18. DOI: [10.1186/2041-2223-4-18](https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-18) PMID: [24139166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24139166/)
54. Hofreiter M. Nondestructive DNA Extraction from Museum Specimens. London: Springer Nature; 2012 [cited 2025 July 4]. Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-516-9\\_13](https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-516-9_13). DOI: [10.1007/978-1-61779-516-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-516-9_13)
55. Harney É, Cheronet O, Fernandes DM, Sirak K, Mah M, Bernardos R, et al. A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. *Genome Res.* 2021;31(3):472-83. DOI: [10.1101/gr.267534.120](https://doi.org/10.1101/gr.267534.120) PMID: [33579752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33579752/)
56. Rohland N, Siedel H, Hofreiter M. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *Biotechniques.* 2004;36(5):814-6. DOI: [10.2144/04365ST05](https://doi.org/10.2144/04365ST05) PMID: [15152601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15152601/)
57. Deguilloux MF, Ricaud S, Leahy R, Pemonge MH. Analysis of ancient human DNA and primer contamination: one step backward one step forward. *Forensic Sci Int.* 2011;210(1-3):102-9. DOI: [10.1016/j.forsciint.2011.02.010](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.02.010) PMID: [21367547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21367547/)
58. Pääbo S. Ancient DNA. *Sci Am.* 1993;269(5):86-92. DOI: [10.1038/scientificamerican1193-86](https://doi.org/10.1038/scientificamerican1193-86) PMID: [8235556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8235556/)
59. Zupanič Pajnič I, Zupanc T, Balažic J, Geršak ŽM, Stojković O, Skadrić I, et al. Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2017;27:17-26. DOI: [10.1016/j.fsigen.2016.11.004](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.11.004) PMID: [27907810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27907810/)
60. Zavala EI, Thomas JT, Sturk-Andreaggi K, Daniels-Higginbotham J, Meyers KK, Barrit-Ross S, et al. Ancient DNA Methods Improve Forensic DNA Profiling of Korean War and World War II Unknowns. *Genes (Basel).* 2022;13(1):129. DOI: [10.3390/genes13010129](https://doi.org/10.3390/genes13010129) PMID: [35052469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35052469/)
61. Latham KE, Madonna ME. DNA Survivability in Skeletal Remains. Boca Raton: CRC Press; 2013.

62. Interpol. DNA. Lyon: Interpol; 2019 [cited 2025 July 8]. Available from: <https://www.interpol.int/en/How-we-work/Forensics/DNA>.
63. Pajnič IZ. Molekularnogenetska preiskava 300 let starih skeletov iz Auerspergove grobnice. *Zdrav Vestn*. 2013;82:796-808.
64. Zupanič Pajnič I. Identification of a Slovenian prewar elite couple killed in the Second World War. *Forensic Sci Int*. 2021;327. DOI: [10.1016/j.forsciint.2021.110994](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110994) PMID: 34536754
65. Di Stefano B, Bertoglio B, Melchionda F, Concato M, Sorçaburu Ciglieri S, Bosetti A, et al. Molecular Identification of the Italian Soldiers Found in the Second World War Mass Grave of Ossevo. *Genes (Basel)*. 2025;16(3):326. DOI: [10.3390/genes16030326](https://doi.org/10.3390/genes16030326) PMID: 40149477
66. Márquez-Grant N, Webster H, Truesdell J, Fibiger L. Archaeogenetics in evolutionary medicine. *Int J Osteoarchaeol*. 2016;26(6):1078-88.
67. Bouwman A, Rühli F. Archaeogenetics in evolutionary medicine. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(9):971-7. DOI: [10.1007/s00109-016-1438-8](https://doi.org/10.1007/s00109-016-1438-8) PMID: 27289479
68. Republika Slovenija. Zakon o varstvu kulturne dediščine. Ur l. 2008(16); 2008(123); 2011(8).
69. Liu Y, Bennett EA, Fu Q. Evolving ancient DNA techniques and the future of human history. *Cell*. 2022;185(15):2632-5. DOI: [10.1016/j.cell.2022.06.009](https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.009) PMID: 35868268
70. Danielewski M, Żuraszek J, Zielińska A, Herzig KH, Słomski R, Walkowiak J, et al. Methodological Changes in the Field of Paleogenetics. *Genes (Basel)*. 2023;14(1):234. DOI: [10.3390/genes14010234](https://doi.org/10.3390/genes14010234) PMID: 36672975
71. Leskovaar T, Knific T, Zupanič Pajnič I, Potočnik D, Črešnar M. Potencial interdisciplinarnih raziskav človeških skeletnih posmrtnih ostankov: četverni grob s poznoantičnega grobišča Bled – Pristava. *Arheol Vestn*. 2024;75:323-54. DOI: [10.3986/AV.75.11](https://doi.org/10.3986/AV.75.11)
72. Zupanič Pajnič I, Geršak ŽM, Leskovaar T, Črešnar M. Kinship analysis of 5th- to 6th-century skeletons of Romanized indigenous people from the Bled-Pristava archaeological site. *Forensic Sci Int Genet*. 2023;65. DOI: [10.1016/j.fsigen.2023.102886](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102886) PMID: 37137206
73. Morez Jacobs A, Irish JD, Cooke A, Anastasiadou K, Barrington C, Gilardet A, et al. Whole-genome ancestry of an Old Kingdom Egyptian. *Nature*. 2025;644(8077):714-21. DOI: [10.1038/s41586-025-09195-5](https://doi.org/10.1038/s41586-025-09195-5) PMID: 40604286
74. Brevnov M, Mundt J, Benfield J, Treat-Clemons L, Kalusche G, Meredith J, et al. Automated Extraction of DNA from Forensic Sample Types Using the PrepFiler Automated Forensic DNA Extraction Kit. *J Assoc Lab Autom*. 2009;14(5):294-302. DOI: [10.1016/j.jala.2009.06.006](https://doi.org/10.1016/j.jala.2009.06.006)
75. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)*. 2023;12(7):997. DOI: [10.3390/biology12070997](https://doi.org/10.3390/biology12070997) PMID: 37508427
76. Froment C, Hourset M, Sáenz-Oyhéréguy N, Mouton-Barbosa E, Willmann C, Zanolli C, et al. Analysis of 5000-year-old human teeth using optimized large-scale and targeted proteomics approaches for detection of sex-specific peptides. *J Proteomics*. 2020;211. DOI: [10.1016/j.jprot.2019.103548](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103548) PMID: 31626997
77. Welker F. Palaeoproteomics for human evolution studies. *Quat Sci Rev*. 2018;190:137-47. DOI: [10.1016/j.quascirev.2018.04.033](https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.04.033)
78. Lagúnez-Otero J, Díaz-Villaseñor A, Renugopalakrishnan V. Specialized Biology From Tandem -Turns. *Arch Med Res*. 2002;33(3):245-9.
79. Zupanič Pajnič I, Mlinšek T, Počivavšek T, Leskovaar T. Genetic sexing of subadult skeletal remains. *Sci Rep*. 2023;13(1):20463. DOI: [10.1038/s41598-023-47836-9](https://doi.org/10.1038/s41598-023-47836-9) PMID: 37993531
80. Esposito C, Higgins OA, Galbusera A, Gigante M, Lugli F, Müller W, et al. NOthing goes to WASTE (NOWA): A protocol to optimise sampling of ancient teeth. *J Archaeol Sci*. 2024;171. DOI: [10.1016/j.jas.2024.106087](https://doi.org/10.1016/j.jas.2024.106087)