

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Jakub Miškovský

Využití biochemických metod pro odhad věku dožití dospělého člověka ve srovnání
s tradičními morfologickými metodami

The use of biochemical methods for adult age-at-death estimation compared to the traditional
morphological methods

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Anežka Kotěrová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně, na základě uvedené literatury.

V Praze dne 2021

.....

Jakub Miškovský

Na tomto místě děkuji Mgr. Anežce Kotěrové, Ph.D. za čas, který mi věnovala, a za cenné odborné rady a připomínky, které přispěly ke vzniku této bakalářské práce, dále Janě Kotherové za korekturu. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za neustálou podporu během celého studia.

Abstrakt

První zmínky o různých metodách odhadu věku dožití daného jedince na základě jeho kosterních pozůstatků jsou staré jako forenzní vědy samotné. Odhad věku dožití člověka je nedílnou součástí jeho biologického profilu a dá se z něj odvodit mnoho dalších údajů o daném jedinci. Na rozdíl od odhadu věku dožití u pozůstatků dětí je odhad u pozůstatků dospělých jedinců mnohem složitější, nepřesnější a méně spolehlivý – morfologické změny nejsou tak progresivní jako během dospívání. Klasické morfologické metody umožňují odhad pouze v širokých věkových intervalech. Zároveň existuje i několik metod založených na chemickém či molekulárním základu, které jsou pro odhad věku dospělých využitelné. Cílem této bakalářské práce je obecné shrnutí principů a metod založených na makroskopickém vizuálním hodnocení kosterních indikátorů, dále metod chemických či molekulárních a jejich vzájemné porovnání s uvedením jejich výhod, limitů i nevýhod.

Klíčová slova: odhad věku dožití, biologický profil, metody odhadu věku, methylace DNA, racemizace kyseliny asparagové

The abstract

The first mentions of various methods of estimating a person's age-at-death expectancy based on his skeletal remains are as old as forensic science itself. Estimation of a person's age-at-death estimation is an integral part of his biological profile and many other data about a given individual can be derived from it. The estimate for the remains of adults is much more complex, inaccurate and less reliable than expectancy for the remains of children, as morphological changes are not as progressive as during adolescence. Classical morphological methods allow estimation only in wide age intervals. However, there are several methods based on chemical or molecular basis that can be used to estimate the age of adults. The aim of this bachelor thesis is a general summary of principles and methods based on macroscopic visual evaluation of skeletal indicators, as well as chemical, biochemical or molecular methods and their mutual comparison with an indication of their advantages, limits and disadvantages.

The key words: age at death estimation, biological profile, methods of age estimation, DNA methylation, racemization of aspartic acid

Seznam zkratek

AGEs	koncové produkty pokročilé glykace tzv. AGEs (z angl. advanced glycation end-products)
CpG	cytosin-fosfodiester-guanin (z angl. C = cytosin, p = phosphodiester, G = guanin)
CT	výpočetní tomografie (z angl. computed tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
ESC	embryonální kmenové buňky (z angl. embryonic stem cell)
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s analyzátozem doby letu (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight)
mDNA	mitochondriální DNA (z angl. mitochondrial DNA)
MSCT	víceřezová výpočetní tomografie (z angl. multi-slice computed tomography)
mtDNA	mitochondriální DNA (z angl. mitochondrial DNA)
NADH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidu (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
ROS	volné radikály (z angl. reactive oxygen species)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (z angl. ribosomal ribonucleic acid)
TET	rodina jedenácti translokačních methylcytosin dioxygenáz (z angl. ten-eleven translocation)
tRNA	transferová RNA (z angl. transfer RNA)
TTAGGG	sekvence nukleotidů T = thymin, A = adenin, G = guanin (z angl. adenine, thymine, guanine)
Zn-SOD	superoxid dismutáza s kofaktorem zinku (z angl. zinc superoxide dismutase)

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Odhad věku z kosterních pozůstatků u dospělých jedinců	2
3.	Tradiční morfologické metody	2
3.1.	Pubická symfýza.....	3
3.2.	Aurikulární povrch kyčelní kosti.....	5
3.3.	Acetabulum	7
3.4.	Sternální konce žeber	8
3.5.	Dentice.....	9
3.6.	Limity morfologických metod a další možnosti.....	10
4.	Chemické přístupy odhadu věku	12
4.1.	Racemizace kyseliny asparagové	12
4.2.	Collagen crosslinks.....	14
4.3.	Akumulace olova.....	16
4.4.	Další chemické možnosti pro odhad věku dožití.....	17
5.	Přístupy molekulární biologie	18
5.1.	Zkracování telomer.....	18
5.2.	Mutace mitochondriální DNA.....	20
5.3.	Epigenetické modifikace	23
7.	Závěr.....	25
8.	Seznam použitých zdrojů	27
9.	Seznam obrázků a příloh	38

1. Úvod

Při nálezu kosterních pozůstatků je hlavní prioritou forenzní antropologie i bioarcheologie sestavení tzv. biologického profilu. Biologický profil sestává především z analýzy čtyř hlavních demografických parametrů, tzv. velké čtyřky, kam patří odhad pohlaví, výšky postavy, biogeografického původu a věku dožití (Austin & King, 2016). Ve většině případů nám věk daného jedince není přesně znám, a proto jsme nuceni uchýlit se k jeho odhadu (Franklin, 2010). Zatímco ve forenzních vědách nám odhad věku dožití napomáhá při identifikaci daného jedince, v bioarcheologii se stává užitečným nástrojem při náhledu do způsobu života dávných kultur a do jejich socioekonomického či demografického uspořádání (DeWitte, 2018).

Během odhadu věku dožití určujeme tzv. věk biologický, který více či méně koreluje s věkem chronologickým. U něj na rozdíl od odhadu výšky, pohlaví či biogeografického původu narážíme na limity týkající se právě míry korelace biologického věku s chronologickým či značné individuality zkoumaných znaků a to zejména u dospělých jedinců (Brůžek, 2016). U dětí a mladistvých je situace jiná, dětská kostra prochází během dospívání četnými změnami, které jsou charakteristické pro daný věk. Díky těmto změnám se dané kosterní pozůstatky dají oproti dospělým velmi přesně zařadit do relativně úzkých věkových intervalů, které takřka odpovídají věku skutečnému, tedy chronologickému. Jelikož u dospělých jedinců je vývoj kostry již dokončen, je dále možné na kostře sledovat senescenční změny na základě remodelace a degradace, které jsou ovlivňovány mnoha faktory (např. životní styl, pohlaví či biogeografický původ) (Dirkmaat & Cabo, 2013).

Vedle tradičních morfologických metod, které vizuálně zkoumají makroskopické změny na kostře, existují i přístupy, které hledají věkově vázané změny na mnohem hlubší úrovni. Ty jsou založené na molekulární či chemické podstatě (methylace DNA (Márquez-Ruiz et al., 2020), racemizace kyseliny asparagové (Arany & Ohtani, 2010)). Zkoumají struktury či procesy pouhým okem neviditelné. Pro jejich provedení je však potřeba pokročilé laboratorní vybavení a přístroje jako je chromatograf (Ohtani & Yamamoto, 1991), PCR – cycler (Meißner et al., 1997) a mnohé další. Uvedené postupy mohou vynikat poměrně přesnými a spolehlivými výsledky. Naopak morfologické metody vynikají svou jednoduchostí a snadnou proveditelností (Adserias-Garriga et al., 2018).

Tato bakalářská práce přináší obecné shrnutí většiny známých postupů a jejich vzájemné porovnání.

2. Odhad věku z kosterních pozůstatků u dospělých jedinců

Věk dožití patří do tzv. velké čtyřky s jejíž pomocí se sestavuje základní biologický profil jedince (Franklin, 2010). Věk jako takový dělíme na biologický a chronologický (Acsadi, Nemeskeri, 1974). Zatímco chronologický neboli kalendářní věk je přesně definován datem narození, biologický neboli fyziologický věk je ovlivněn mnoha faktory (výživa, vlivy vnějšího prostředí, některé genetické faktory). Antropologická analýza se opírá právě o věk biologický, který v určitém měřítku koreluje s věkem chronologickým (Iscan & Steyn, 2013).

U odhadu věku dožití je důležité, aby navrhované metody poskytovaly výsledky, které co nejvíce odpovídají věku skutečnému. U dětí a mladistvých dosahují i tradiční morfologické metody celkem vysoké přesnosti, zejména díky dynamickým a snadno predikovatelným změnám během vývoje skeletu. U dospělých je nutné tyto metody dále rozvíjet za účelem zvýšení jejich přesnosti a spolehlivosti (Iscan & Steyn, 2013). Kromě dnes již tradičních morfologických přístupů založených na makroskopickém, případně mikroskopickém vizuálním zkoumání degenerativních změn v průběhu senescence, se začaly objevovat i postupy založené na molekulární či biochemické podstatě (Ellingham & Adserias-Garriga, 2019).

Morfologické i molekulární či chemické metody jsou vyvíjené na identifikovaných souborech jedinců, u kterých je jejich věk dožití přesně znám. Mají nadefinované návody, přesně určené proměnné a obsahují i informaci o riziku chyb. Výsledek výše uvedených metod je z pravidla doprovázen doplněním o pravděpodobnosti daného odhadu. U každé metody je dále hodnocena její úspěšnost a spolehlivost. Odhad věku je spojitá proměnná. Jeho úspěšnost definuje velikost intervalu odhadu. Spolehlivost dané metody určuje fakt, zdali skutečný věk spadá do daného intervalu (Brůžek, 2016).

3. Tradiční morfologické metody

Tradiční morfologické metody pracují zejména se snadno viditelnými makroskopickými změnami. Dochází k nim na kostře během života a je možno je vyhodnocovat vizuálně. Morfologické změny, které souvisejí s věkem, se vyskytují zejména v podobě remodelace a degenerace (Brůžek, 2016) kostní či dentální tkáně. Ideální indikátor senescence by měl splňovat tři základní podmínky:

- zkoumané charakteristiky musí s postupujícím věkem vykazovat progresivní, jednosměrnou změnu,
- mělo by být možné spolehlivě klasifikovat (kategoriální data) či měřit (kontinuální data) probíhající morfologické změny (Bertrand et al., 2019),
- změny by měly probíhat u různých jedinců s podobnou rychlostí (Milner & Boldsen, 2012).

Tradiční morfologické metody se neliší jen částmi skeletu, od kterých jsou odvozeny, ale i způsobem vyhodnocování daných pozorování. Z tohoto pohledu dělíme klasické morfologické metody na fázové a komponentní. Hlavním rozdílem je vyhodnocování pozorovaných znaků. Fázové metody je

řadí společně do širokých fází (např. fázová metoda podle Todda), zatímco metody komponentní dělí daný indikátor na několik komponent, které jsou hodnoceny samostatně (např. komponentní metoda podle Gilberta a McKerna) (Gilbert & McKern, 1973; Shirley & Montes, 2015; Todd, 1920a).

Nejčastěji využívanými indikátory pro odhad věku dožití jsou zejména kloubní plochy pánevní kosti (pubická symfýza, aurikulární plocha kyčelní kosti a acetabulum), sternální konce žeber, dentice a lebeční švy. V roce 2011 byl uskutečněn výzkum, ve kterém bylo celkem 145 respondentů dotázáno, kterou z metod pro odhad věku dospělých jedinců nejběžněji používají. Výzkum zjistil, že nejhojněji aplikovanou metodou je metoda Suchey – Brooks (Brooks & Suchey, 1990) pro odhad věku na základě pubické symfýzy. Naopak dříve hojně rozšířený, ale v dnešní době již minimálně používaný, přístup je hodnocení obliterace kraniálních sutur (Garvin & Passalacqua, 2012). Kraniální sutury neboli lebeční švy jsou pevná vazivová spojení kostí lebky (Čihák & Grim, 2001). V průběhu senescence dochází k jejich postupnému srůstání, které s určitou mírou koreluje s věkem daného jedince. Metoda založená na sledování srůstání kraniální sutur je jednou z nejstarších metod pro odhad věku dožití. Nicméně v dnešní době jde také o jeden z nejméně používaných postupů pro odhad věku dožití (Garvin & Passalacqua, 2012) zejména kvůli velmi nízké korelaci s věkem a neznámému mechanismu obliterace (Key et al., 1994; Khandare et al., 2015).

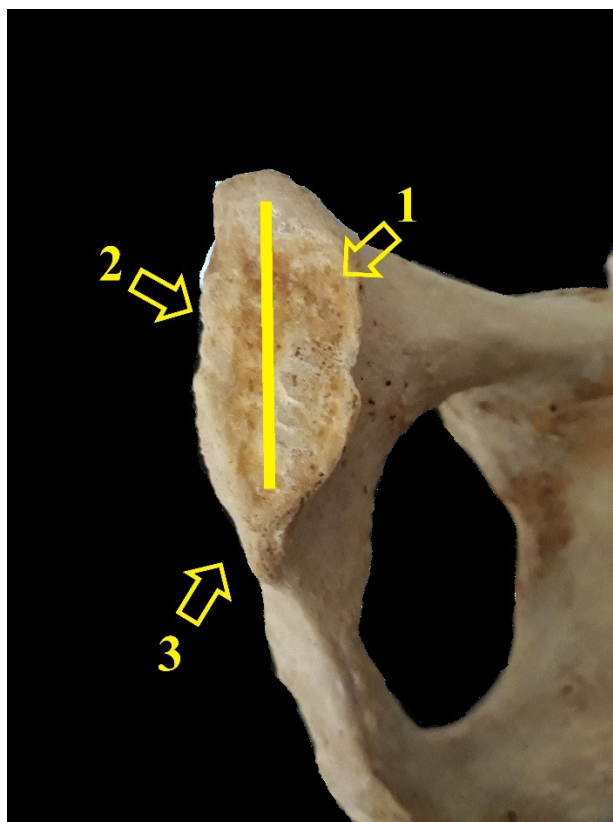
Mezi největší limity tradičních morfologických metod patří fakt, že morfologické změny probíhají u každého jedince jinou rychlostí a s jinou intenzitou. To vede k rozšiřování věkových intervalů, do nichž na základě morfologických změn daného jedince zařazujeme (Ellingham & Adserias-Garriga, 2019). Ruku v ruce se značně širokým věkovým rozpětím skupin, kam jsme daného jedince schopni zařadit, klesá samozřejmě přesnost odhadu (Brůžek, 2016). Změny, ke kterým v průběhu senescence dochází, jsou velmi často závislé na populační afinitě a pohlaví daného jedince (Iscan & Steyn, 2013; Kimmerle et al., 2008; Schmitt & Murail, 2004; a další). Mimo výše zmíněné komplikace, které tradiční morfologické metody odhadu věku dožití provázejí, mohou být dané metody limitovány věkem, do kterého je metoda účinná. Příkladem může být metoda postavená na základě zkoumání pubické symfýzy, kdy je po 40. roku života metoda takřka nepoužitelná (Brooks & Suchey, 1990; Todd, 1920b, 1923, 1930). Kvůli komplikacím, které mohou dané metody provázet, je obecně doporučováno je (pokud to situace dovoluje) kombinovat (Ellingham & Adserias-Garriga, 2019).

3.1. Pubická symfýza

Pubická symfýza (viz. Obr. 1.) neboli stydká spona je velmi silné kloubní spojení skládající se z fibroartilaginozního disku, který se nachází mezi kloubními povrchy stydkých kostí (Čihák & Grim, 2001). Odolává tahu a silným tlakovým silám a za normálních fyziologických podmínek je schopna malého množství pohybu (cca 2mm posun a 1° rotace) (Becker et al., 2010).

V současné době je pubická symfýza nejlépe zdokumentovanou a jednou z nejčastěji využívaných částí kostry pro odhad věku dožití u dospělých jedinců (Garvin & Passalacqua, 2012). Její

artikulační plocha se pro odhad věku dožití používá od roku 1920 (Todd, 1920b, 1930). Pubická symfýza prochází s rostoucím věkem pravidelnými morfologickými změnami. Členitý povrch se snadno viditelným horizontálním rýhováním se postupně vytrácí (díky tření kloubních plošek) až k úplnému vyhlazení. Kloubní povrch v průběhu stárnutí degraduje a stoupá míra porozity (Brooks & Suchey, 1990; Christensen et al., 2019). Vše výše uvedené ovšem neprobíhá kontinuálně až do konce života, po 40. roce jsou změny až příliš variabilní (Brooks & Suchey, 1990).



Obr. 1: Pubická symfýza pravé pánevní kosti a části využívané k odhadu. 1 = posteriorní polovina kloubní plochy 2 = anteriorní polovina kloubní plochy 3 = ventrální val.
Upraveno, fotografie Kotěrová A.

Todd pozoroval celkem pět znaků na pubické symfýze a na základě jejich různých kombinací a variací stanovil dohromady deset morfologických fází (od 18 do 50 a více let). Svou metodu následně otestoval na jedincích afroamerického a euroamerického původu. Validací svého přístupu zjistil, že jeho metoda je spolehlivější u mladších jedinců (20–40 let) než u jedinců starších (nad 40 let) (Todd, 1920b, 1923, 1930). V průběhu let byla původní Toddova metoda několikrát revidována (Brooks & Suchey, 1990; Kimmerle et al., 2008).

Dnes je mezi antropology pravděpodobně nejvíce preferována metoda Suchey-Brooks (1990), což potvrzuje i dotazníkový výzkum z roku 2011 (Garvin & Passalacqua, 2012). Suchey-Brooks

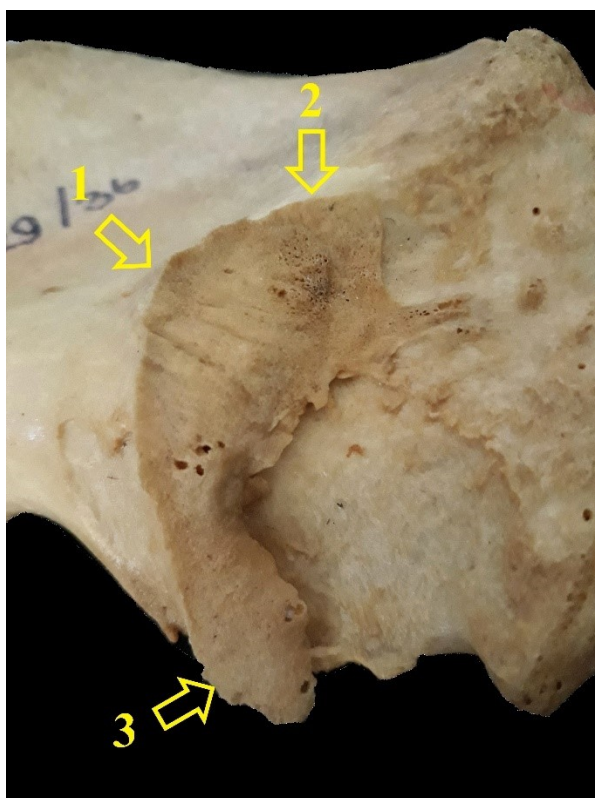
metoda rozděluje morfologické změny na pubické symfýze do šesti fází, ty poté udávají určité věkové rozmezí, do nějž daný jedinec patří (Brooks & Suchey, 1990). Daná rozmezí jsou však velmi široká a s věkem se interval ještě více navyšuje (po 40. roce je metoda téměř nepoužitelná) (Hanihara & Suzuki, 1978). Metoda byla dále testována na mnoha vzorcích různých populací. Bylo zjištěno, že stárnutí je ovlivněno pohlavím i etnickým původem (Kimmerle et al., 2008).

Jedna z nejnovějších studií zkoumající oblast stydké kosti se zaměřila na měření její hustoty pomocí výpočetní tomografie na základě referenčního vzorku čítajícího 400 jedinců. Následně byly vytvořeny vzorce lineární regrese a bylo dosaženo přesnosti odhadu ± 8 let u mužů a ± 11 let u žen. Je tedy zřejmé, že bude nutné tento přístup podrobit dalšímu výzkumu za účelem jeho zpřesnění. Výhodou by mohla být využitelnost u jedinců nad 40 let (Dubourg et al., 2020). Širšímu využití tohoto indikátoru brání navíc fakt, že je tato část pánevní kosti poměrně fragilní a často se nedochovává (Wärmländer & Sholts, 2011).

3.2. Aurikulární povrch kyčelní kosti

Aurikulární povrch *ilia* je součástí křížokyčelního kloubu (Čihák & Grim, 2001). V průběhu senescence prochází řadou morfologických senescenčních změn. Jemně zrnitý, transverzálně organizovaný povrch typický pro mladší jedince v průběhu stárnutí hrubne a pravidelné rýhování se postupně vytrácí. S postupujícím věkem prodělává degenerativní změny i apex (Obr. 2.) a je zpravidla pozorována narůstající mikro a makroporozita povrchu (Christensen et al., 2019).

Odhad věku dožití pomocí pozorování aurikulárního povrchu *ilia* je založen na podobném principu jako metody využívající pubickou symfýzu, kde dochází k podobným morfologickým změnám. Výhodou jeho využití oproti pubické symfýze může být vyšší procento dochovaných aurikulárních povrchů na kosterních pozůstatcích (Buckberry & Chamberlain, 2002).



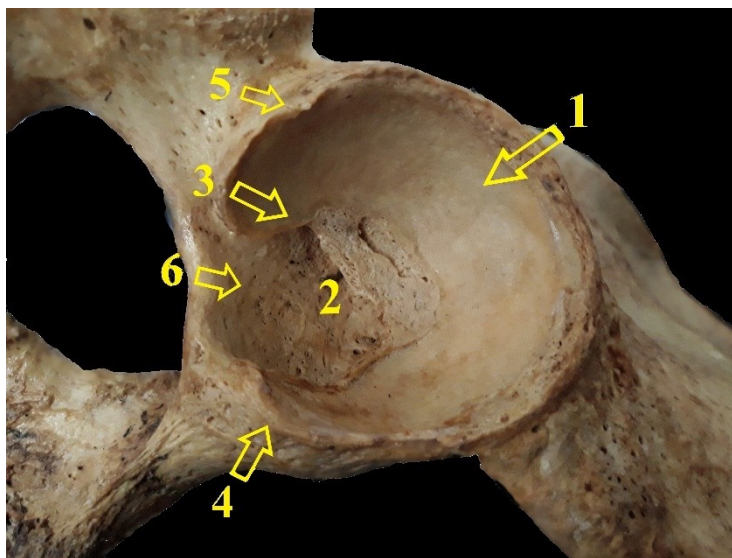
Obr. 2: Aurikulární povrch pravé kyčelní kosti s vyznačenými oblastmi klíčovými pro odhad věku.
1 = Apex, 2 = superiorní polovina kloubní plochy, 3 = inferiorní polovina kloubní plochy
Upraveno, fotografie Kotěrová A.

Autory jedné z metod je tým profesora Lovejoye (Lovejoy et al., 1985), který na základě svého výzkumu stanovil celkem 8 morfologických stádií. Stádia jsou rozdělena do velmi úzkých věkových intervalů: 20–24 let, 25–29 let, 30–34 let, 35–39 let, 40–44 let, 45–49 let, 50–60 let, nad 60 let. Metoda Lovejoy (Lovejoy et al., 1985) byla v roce 2004 (Osborne et al., 2004) otestována celkem na 266 vzorcích z Terryho a Bassovy sbírky tvořené jedinci různého původu, stáří a pohlaví. Úspěšnost byla pouhých 33 %. Tak nízká úspěšnost byla vysvětlena příliš úzkými intervaly původní metody Lovejoy. Proto autoři metodu revidovali, intervaly daných věkových rozmezí rozšířili a počet morfologických fází snížili z osmi na šest. Testování zároveň přineslo zjištění, že na vzhled aurikulárního povrchu nemá pohlaví, původ či sekulární trend žádný vliv. Mimo jiné bylo při témže testování zjištěno, že dílčí komponenty aurikulárního povrchu (např. superiorní a inferiorní polovina kloubní plochy) odpovídají věku každá zvlášť s relativně stejnou pravděpodobností i úspěšností, ovšem kombinované bodování všech komponent dohromady funguje ze všeho nejlépe (Osbourne, 2004). Pravděpodobně nejznámější revizí původní metody Lovejoy je přístup navržený autory Buckberry a Chamberlain (2002). Jejich revize zjednodušuje původní hodnocení na pět komponent a vykazuje nižší chybovost. Testování revidované metody, které proběhlo na kosterní sbírce známého věku z londýnského kostela ve Spitafields, odhalilo značný rozptyl věku dožití, zejména po první dekádě dospělého života (Buckberry & Chamberlain, 2002).

Další posun směrem k úspěšnějšímu, spolehlivějšímu a objektivnějšímu odhadu věku (nejen v případě aurikulární plochy) by mohlo přinést využití moderních technologií, které umožňují podrobné 3D skeny. Jejich použití může nejen usnadnit práci při odhadu věku, ale mohlo by vést k nalezení dalších zkoumaných znaků, na jejichž základě by mohlo dojít k zásadnímu zmenšení věkových intervalů a tím zpřesnění samotného odhadu věku (Bennett, 2020; Villa et al., 2015).

3.3. Acetabulum

Relativně nově objeveným indikátorem senescence je oblast acetabula (Obr. 3.). Jedná se o jamku kyčelního kloubu o průměru cca 5 cm na zevní straně os coxae (Čihák & Grim, 2001). Pozorovatelné změny se nacházejí především v oblasti acetabulárního okraje, kde se kromě rozvíjející se porozity s postupujícím věkem vytváří také acetabulární žlábek. Dále dochází k rozvoji porozity v oblasti fossa acetabuli či k degenerační aktivitě v oblasti apexu. Většina změn je spojena (stejně jako u dříve zmíněných částí skeletu) s postupným opotřebováváním kloubních ploch. Výhodou může být fakt, že se jedná o poměrně chráněnou strukturu, na kterou nepůsobí vnější vlivy v tak značné míře (Rougé-Maillart et al., 2007, 2009).



Obr. 3: Jamka pravého kyčelního kloubu (acetabulum) s vyznačenými klíčovými oblastmi 1 = *facies lunata*, 2 = *fossa acetabuli*, 3 = vnitřní okraj *facies lunata*, 4 = apex, 5 = acetabulární okraj, 6 = acetabulární zářez. Upraveno, fotografie Kotěrová A.

Jednu z prvních studií sepsala Rougé-Maillart a kolektiv. Autoři této studie využili povrch, který zkombinovali právě se studiem znaků na acetabulu. Došli k závěru, že tato metoda je vhodná zejména pro starší jedince. Hlavním důvodem bylo zjištění, že morfologické změny na acetabulu jsou oproti změnám na jiných částech kloubu relativně pomalé. Vzájemnou kombinací studia znaků na acetabulu a aurikulárním povrchu kosti kyčelní dosahuje tato metoda 80% pravděpodobnosti (Rougé-Maillart et al., 2004; Rougé-Maillart et al., 2007, 2009).

Na morfologických změnách acetabula je založena i metoda Rissech a spoluautorů (Rissech et al., 2006, 2007). Metoda byla navržena na celkem 242 mužských pánevních kostech ze sbírky v portugalské Coimbře. Autoři zjistili, že mezi jednotlivými znaky a věkem je významná spjitost. Při testování této metody byla zjištěna i velmi nízká chybovost. Rissech ve své práci uvádí chybu (rozdíl mezi skutečným a odhadnutým věkem) ± 10 let u 89 % jedinců. Využitím této metody na jiných evropských sbírkách bylo zjištěno, že z čím vzdálenější země sbírka pocházela, tím přinášela tato metoda méně spolehlivé výsledky (snížení úspěšnosti okolo 10 %) (Rissech et al., 2007

Další testování, tentokrát na Grantově sbírce v Torontu, přineslo zjištění, že největší spolehlivosti při odhadu věku dosahují pozůstatky starších jedinců (mezi 46–90 lety) (Calce & Rogers, 2011). Testování o rok později vedlo ke konečnému rozdělení odhadu do celkem tří věkových kategorií: 17–39 let, 40–64 let a nad 65 let (Calce, 2012).

Acetabulum je v současné době považováno za jeden ze slibných indikátorů pro odhad věku jedinců starších 60 let (Cunha et al., 2009). Jednou z nejnovějších studií je studie od San-Millán stojící na základě předchozí metody specifické pro muže podle Rissecha a kol., která se snažila o revizi přístupu, aby byl použitelný pro obě pohlaví. Studie přinesla zjištění, že proces stárnutí acetabula sleduje podobné trendy u obou pohlaví, ale míra stárnutí se zdála být u mužů a žen odlišná. Takto revidovaná metoda dosahovala průměrné odchylky 7,28 roku u mužů a 7,09 roku u žen (San-Millán et al., 2017).

3.4. Sternální konce žeber

Degenerativní změny probíhající s rostoucím věkem jsou také sledovány na sternálních koncích žeber, přesněji míra osifikace sternální chrupavky. V průběhu života sternální konce žeber prochází významnými morfologickými změnami (İşcan et al., 1985; İşcan et al., 1984). V mladém adultním věku jsou charakteristické svým plochým či zvlněným povrchem a oblým okrajem. Později se okraje stávají nepravidelnými a ostrými, což je důsledkem osteofytického nárůstu (Kerley, 1970).

První studie zabývající se možností využití sternálních konců žeber pro odhad věku dožití u dospělých jedinců byla publikována v roce 1984 (İşcan et al., 1985; İşcan et al., 1984). Nicméně morfologické změny na sternálních koncích žeber v průběhu života jedince byly pozorovány již v roce 1970 (Kerley, 1970).

Pravděpodobně nejznámější metoda pro odhad věku podle úrovně osifikace sternální chrupavky byl publikována v roce 1984 pod vedením profesora Mehmeta İşcana. Metoda je založena na devíti morfologických fázích sternálního konce čtvrtého žebra, na jejichž základě se určují věkové intervaly, do nichž daný jedinec spadá. Metoda byla navržena na celkem 118 mužských (İşcan et al., 1984) a 86 ženských vzorcích (İşcan et al., 1985), dané věkové intervaly se však navzájem překrývaly a byly značně široké. Provedené analýzy této metody odhalily, že pro každé pohlaví musí být vypracována zvlášť, jelikož proces daných morfologických změn je závislý na pohlaví (İşcan et al.,

1985; İřcan et al., 1984). Metoda vzbudila značný zájem a byla testována mnohými antropology (např. Hartnett, 2010; Oettlé & Steyn, 2000).

Další studie založená na zkoumání sternálního konce čtvrtého žebra prokázala vysokou korelaci mezi hloubkou jamky a věkem, sám autor nicméně dodává, že je vhodné metodu kombinovat s pozorováním dalších aspektů jako je například kvalita kosti (Zahra et al., 2020). Další přístup byl publikován Kunosem a kol. v roce 1999. Ten se na rozdíl od výše zmíněné metody zabýval pozorováním změn na částech prvního žebra. Prvotní výsledky této studie odhalily, že morfologické změny na sternálních koncích prvního páru žeber nejsou nijak významně závislé na pohlaví či populaci (Kunos et al., 1999). Nicméně při dalším testování této metody (konkrétně na populaci obyvatel Thajska) byla úspěšnost odhadu věku dožití pouhých 55 %. To by mohlo naznačovat, že morfologické změny na koncích prvního žebra jsou napříč populacemi variabilnější, než autoři původní studie předpokládali (Schmitt & Murail, 2004).

O další rozvoj této metody se zasloužila DiDangi, která se svými spolupracovníky změny na prvním žebře kategorizovala a s využitím statistického hodnocení pravděpodobnosti vyhodnotila (DiGangi et al., 2009). Modifikací původní İřcanovy metody (İřcan et al., 1984, 1985) se zabývali i Dedouit a kol. za využití trojrozměrné víceřezové výpočetní tomografie (MSCT). Jejich přístup umožňuje aplikovat původní vizuální metodu na rekonstruované 3D modely sternálních konců žeber ve virtuálním prostředí. Během testování tohoto postupu dosáhla při skenování již očištěných suchých kostí 58,3% úspěšnosti a 63,9% při vyhodnocování jejich 3D modelů (Dedouit et al., 2008). Hlavní nevýhodou žeber jakožto indikátoru senescence je jejich špatná konzervace (Falys & Lewis, 2011).

3.5. Dentice

Na základě morfologických změn dentice bylo postaveno mnoho metod. Některé z nich mohou být velice prosté (měření výšky a šířky jednotlivých částí zubu) (Cameriere et al., 2004), jiné složitější (metody histologické či radiografické) (Acharya & Kumar, 2011). Na rozdíl od studia kosterních pozůstatků nabízí dentice celkem přesné a spolehlivé výsledky i u dospělých, velmi dobře se zachovává a je tedy velmi cenným zdrojem informací.

Při testování metod založených na měření výšky a šířky jednotlivých částí zubů (konkrétně metody podle Kvaal et al. a Cameriere et al. na vzorcích z Brazílie) byla pro věkové skupiny 20–29 let a 30–39 let přesnější Kvaalova metoda. Pro jedince starší 40 let byla vyhodnocena jako spolehlivější metoda podle Cameriere et al. (Miranda et al., 2020).

Histologické metody jsou založené na základě histologických řezů, na nichž je možno spočítat jednotlivé vrstvy zubního cementu, tato metoda se nazývá cementochronologie (Wittwer-Backofen et al., 2004), nebo pozorovat množství uloženého sekundárního dentinu (Gustafson & Malmö,

1950). Z výše uvedeného vyplývá, že na rozdíl od radiografických metod vyžadují extrakci zubu a nesou s sebou i nevýhodu znehodnocení zubu pro další studium (Panchbhai, 2011).

Radiografické postupy nevyžadují radikální zásahy do zkoumaného zubu a jsou zároveň méně finančně náročné (Panchbhai, 2011). Mnohem častěji se využívají pro odhad věku dožití nezcela vyvinutého chrupu, u dospělého nedosahují zdaleka takové přesnosti a spolehlivosti. Další neinvazivní metodou je snímání dentice a následný odhad věku za využití výpočetní tomografie (CT) (Graham et al., 2010). Již zmíněné metody mohou být dále rozděleny podle zpracování dat. Některé metody využívají grafy (Gustafson et al., 1974), skórovací tabulky (Demirjian et al., 1973) či regresní rovnice (Cameriere et al., 2006).

K dalším způsobům odhadu věku s velmi vysokou úspěšností $\pm 3,6$ let (čím více zkoumaných jedno- či vícekořenových zubů tím lépe) patří metoda podle Gustafsona (1950). Hodnotí se celkem šest zubních znaků, které se v průběhu senescence mění (ukládání sekundárního dentinu, resorpce kořene, atrice, stupeň paradontózy, průsvitnost kořene a vrstvení cementu). Každý zkoumaný znak je na základě svého stavu oskórován (0 až 3). Skóre jsou následně sečtena a vynesena na křivku grafu lineární regrese (Gustafson & Malmö, 1950). Metoda byla mnohokrát modifikována (Lamendin et al., 1992), čímž se dosáhlo úspěšnosti průměrné odchylky $\pm 2,2$ roku.

Další, v posledních letech velmi diskutovanou a přesnou metodou, původně vyvinutou pro zoologické využití (Spinage, 1973), je již zmíněná cementochronologie. Je založena na předpokladu, že depozity zubního cementu odrážejí roční rytmus. Chemické složení cementu je podobné jako u kosti. Na rozdíl od ní však cement nepodléhá procesu remodelace a je neustále tvořen po celý život (Yamamoto et al., 2010; Zander & Hurzeler, 1958). Na příčném řezu zubem je možné sledovat střídání světlejších a tmavších pruhů – jeden pár světlého a tmavého pruhu značí jeden kalendářní rok. Tato metoda dosáhla při svém testování na 363 lidských zubech v 95 % případů přesnosti $\pm 2,5$ roku (Wittwer-Backofen et al., 2004). Navzdory velmi slibným výsledkům opírajícím se i o další testování (např. Bertrand et al., 2019) je tato metoda mezi antropology stále spíše opomíjena (Colard et al., 2018). Nevýhodou této metody je nutnost zub extrahovat a provést histologický řez, to je samo o sobě, hlavně z časových nároků, náročné. Zároveň dojde k nenávratnému porušení struktury zubu a metoda je navíc ve vyšším věku špatně čitelná (Panchbhai, 2011).

3.6. Limity morfologických metod a další možnosti

Téměř všechny zavedené morfologické metody pro odhad věku z kosterních pozůstatků jsou problematické z důvodu nízké úspěšnosti či spolehlivosti (Baker, 1995; Jackes 2001.; Haas et al., 1994). Limituje nás fakt, že na kostře lze pozorovat pouze změny spojené s věkem biologickým. Vysoká interindividuální variabilita vede k chybovým rozpětím, která mohou i u nejuspěšnějších metod dosáhnout intervalu deseti let (Haas et al., 1994; Jackes, 2001; Kemkes-Grottenhaler, 2002). Problém úspěšnosti a spolehlivosti odhadu se prohlubuje ve vyšším věku, například degenerativní změny

na pubické symfýze jsou po 40. roce tak variabilní a nepředvídatelné, že s chronologickým věkem již téměř nekorelují (Brooks & Suchey, 1990; Todd, 1920b, 1923, 1930).

Je tedy zřejmé, že do budoucna je nutno vyvinout metody nové, nebo zdokonalit již existující metody pro odhad věku. Ty by měly být méně citlivé na neustálé, nekvantifikovatelné morfologické změny závislé nejen na věku. Také by bylo záhodno, aby vykazovaly vyšší korelaci mezi věkem biologickým a chronologickým (Colard et al., 2015).

Každá z výše zmíněných metod s sebou přináší své výhody i nevýhody. Mohou vynikat svou jednoduchostí, jiné jsou naopak náročnější ale přesnější a spolehlivější, např. cementochronologie (Yamamoto et al., 2010; Zander & Hurzeler, 1958). Některé přístupy odhadu vyžadují moderní techniku (MSCT, 3D skenování) (Bennett, 2020; Dedouit et al., 2008), někdy nám stačí pouhý pohled. Mnohé přístupy mohou vykazovat rozdíly v závislosti na populační afinitě či pohlaví (například metody založené na pubické symfýze (Kimmerle et al., 2008), některé naopak ne (např. aurikulární povrch kosti kyčelní (Osborne et al., 2004)).

Dalším faktorem, který ovlivní výběr dané metody, může být celkový stav nalezených pozůstatků, pokud jsou dané části vůbec dochované. Pro zvýšení přesnosti a úspěšnosti se antropologové uchylují ke kombinaci více metod. Výsledný odhad věku dožití se nachází v průniku intervalů, které každá z použitých metod určila (Ellingham & Adserias-Garriga, 2019). Kupříkladu Acsádi-Nemeskériho komplexní metoda pracuje s celkem čtyřmi sledovanými kosterními prvky: stupeň uzavření endokraniálních švů, změny související s povrchem stydké kosti a vnitřní strukturální změny pozorovatelné v proximálních částech humeru a femuru. Sami autoři ve své práci uvádějí při použití všech čtyřech sledovaných částí skeletu úspěšnost odhadu $\pm 2,5$ roku (Acsádi et al., 1970). Bližší zkoumání přineslo zjištění, že je přístup choulostivý na nadhodnocování i podhodnocování odhadu u mladších a starších věkových skupin. Nejnovější studie zároveň odhalila, že kombinace tří i pouhých dvou sledovaných indikátorů vykazuje vyšší přesnost oproti kombinaci všech čtyř (Meyer et al., 2021).

Tradiční morfologické metody jsou dále revidovány z hlediska pozorování daných změn i vyhodnocování (Buckberry & Chamberlain, 2002, Meyer et al., 2021, Bennet 2020). Mohou být dále uzpůsobovány pro určité biogeografické skupiny či pro dané pohlaví. To vše by mohlo pomoci ke zpřesnění výsledných odhadů, stejně jako by mohla být přínosná aplikace stále dokonalejších moderních techniky (Dedouit et al., 2008; Dubourg et al., 2020, Bennet 2020).

4. Chemické přístupy odhadu věku

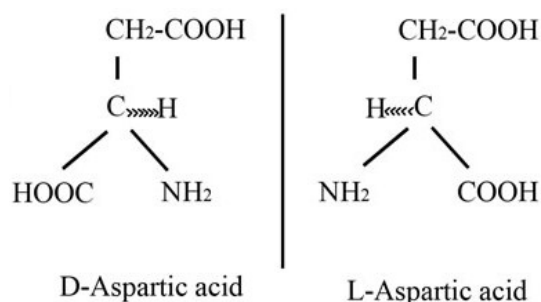
Zatímco tradiční morfologické metody pracují zejména se snadno viditelnými makroskopickými změnami na povrchu a lze je vyhodnocovat vizuálně (Brůžek, 2016), chemické přístupy k odhadu věku umožňují hlubší analýzu. Je možné je využít tam, kde tradiční morfologické přístupy nelze použít (např. velmi zničené kosterní pozůstatky, či jejich fragmenty). Moderní vybavení laboratoří umožňuje širokou analýzu napříč všemi látkami a tkáněmi. Četné studie korelaci mezi koncentracemi či kvalitou jednotlivých zkoumaných sloučenin (případně prvků) našly. Další výzkumy objevily korelaci pouze neprůkaznou a některé korelaci dokonce vyloučily (Baynes, 2001; Drasch & Ott, 1988). I přes veškerou snahu a technologickou vyspělost daných přístupů mají tyto moderní chemické přístupy své limity. Navíc v některých případech dosahují jen stejné nebo nižší přesnosti a spolehlivosti než tradiční morfologické metody. Dalším limitem může být dostupnost, finanční zátěž či časová náročnost daných přístupů. Z dosud zkoumaných přístupů založených na chemické podstatě se zdá být nejvhodnější metodou racemizace kyseliny asparagové dosahující vysoké spolehlivosti i přesnosti a optimální zkoumanou tvrdou tkání dentin (Ellingham & Adserias-Garriga, 2019).

4.1. Racemizace kyseliny asparagové

Aminokyseliny jsou obecně jakékoliv molekuly obsahující aminovou a karboxylovou funkční skupinu. V lidském těle se nachází α -aminokyseliny, kdy α označuje fakt, že je aminoskupina vázaná na α -uhlík – druhý uhlík řetězce dané aminokyseliny. Dále je na α -uhlík navázán atom vodíku a postranní řetězec; α -uhlík je tím pádem tzv. centrem chiralidy. Každá α -aminokyselina tvoří dvě enantiomerní formy, L- a D-, které se mimo prostorového uspořádání liší také svou optickou aktivitou (Obr. 4). L- či D- forma je podmíněna prostorovým uspořádáním chirálního uhlíku (α) odvozené od D- a L-glyceraldehydu (Murray & Harper, 2002). Jako výchozí (nativní) forma většiny aminokyselin v lidském těle je L-forma. Racemizace samotná je proces přechodu aminokyselin z L-forem do D-forem, jejichž počet s přibývajícím věkem roste (Johnson & Miller, 1997). Mění se poměr L- a D-forem lze využít pro odhad věku dožití, jelikož koreluje s věkem chronologickým.

Racemizace kyseliny asparagové je jednou z nejrychlejších metod. To přináší velké výhody ve forenzních vědách právě pro odhad věku dožití (Cloos & Fledelius, 2000). Kyselina asparagová je biogenní, kyselá, polární aminokyselina. Je součástí mnoha bílkovin a substrátem pro řadu biochemických reakcí – například močovinnového cyklu. Dále hraje esenciální roli při syntéze purinových a pyrimidinových bází (Murray & Harper, 2002). Vyskytuje se nejčastěji jako L-enantiomer, podléhá ovšem racemizaci a přechází do D- formy (S. Ohtani & Yamamoto, 1991). Mimo kyselinu asparagovou byl pro odhad věku dožití také použit glutamin a alanin, nicméně výsledky založené na pozorování racemizace ani jednoho z nich nepřinesly tak přesné informace jako pozorování L- a D-forem kyseliny asparagové (Arany & Ohtani, 2010). Pro představu: Helfman a Bada uvádí, že

po 60 letech života daného jedince se přibližně 8 % z celkového obsahu kyseliny asparagové nachází v D- formě (Helfman & Bada, 1975).



Obr. 4: Dvě enantiomerní formy kyseliny asparagové (D'Aniello et al., 2012).

Zjednodušeně se analýza racemizace aminokyselin skládá z přípravy vzorku, izolace požadované aminokyseliny a měření jejího poměru mezi D- a L-formami (Bada & Protsch, 1973). Příprava vzorku zahrnuje identifikaci, extrakci a separaci základních aminokyselin z proteinů, obvykle mletím, což je specifické pro analýzu tvrdých tkání, a následnou kyselou hydrolýzou (Helfman & Bada, 1975). Aminokyselinu lze z produktu hydrolýzy oddělit chromatografií nebo elektroforézou a konkrétní poměr aminokyselin D- ku L- se stanoví buď fluorescencí nebo hmotnostní spektrometrií (zde se ovšem reakce musí účastnit kationty kovu) (Susumu Ohtani & Yamamoto, 2010). Chromatografická a elektroforetická separace proteinů a aminokyselin závisí na velikosti molekul (resp. molekulové hmotnosti) a v menší míře závisí na náboji či tvaru daných aminokyselin.

Výsledná míra racemizace a věk může být kupříkladu vypočítána následovně:

$$\ln \left[\frac{1 + D/L}{1 - D/L} \right] - \ln \left[\frac{1 + D/L}{1 - D/L} \right]_{t=0} = 2 * K_{asp} * t$$

t značí čas, D/L poměr koncentrace mezi D- a L- formami a K_{asp} značí konstantu rychlosti přeměny L-forem na D- formy (Bada & Protsch, 1973).

Poměr L- a D-forem kyseliny asparagové se využívá pro odhad věku již několik desítek let (Arany a kol., 2004). Různé studie byly prováděny na mnohých typech tkání a samotná korelace racemizace s věkem je tkáňově specifická. Tento přístup je vhodný pro zubní cement (Ohtani a kol., 1995), sklovinu (Griffin a kol., 2009) či dentin (Arany et al., 2004). Poslední vzorek vykazoval nejvyšší přesnost (± 3 roky) (S. Ohtani & Yamamoto, 1991). Během testování odhadu věku podle dentinu bylo zjištěno, že je daný přístup přesnější u vzorků starších 40 let a průměrná chybovost odhadu napříč všemi věkovými kategoriemi je $\pm 1,5-4$ roky (Ritz-Timme et al., 2000). Při výběru tkáně je nutné vzít v potaz přibližnou dobu, která uplynula od smrti daného jedince (tzv. posmrtný interval), jelikož přesnost

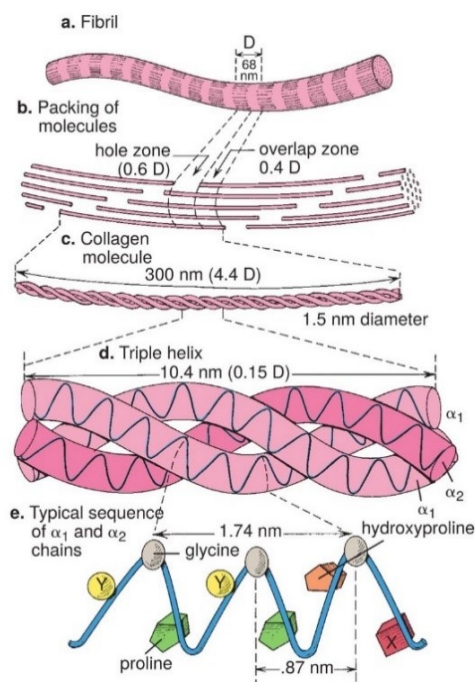
výrazně klesá pokud je tento interval větší než 20 let. V takovém případě se jeví jako vhodná tkáň sklovina, o níž se předpokládá, že je odolnější vůči posmrtným změnám (Griffin et al., 2008).

Metodu je možné použít i na další tvrdé tkáni – kosti. Ta ovšem oproti zubům dosahuje menší přesnosti (± 11 let) (Tawachai et al., 2019) a její přesnost se liší i napříč pohlavím (muži vykazují přesnější výsledky než ženy) (S. Ohtani et al., 1998) či typem použité kosti. Racemizace kyseliny asparagové byla studována u mnohých typů kostí (lebka, kost hrudní, kost stehenní, bederní obratle a kostrč) (Susumu Ohtani et al., 2002). Nejvyšší korelace mezi poměrem D- a L-forem a věkem vykazoval *femur* ($r=0,853$) (S. Ohtani et al., 1998).

Další testování tohoto přístupu přineslo zjištění, že rozdíly v životním prostředí, výživě, podnebí a původu mohou u každé populace způsobit odlišnosti v rychlosti racemizace (Susumu Ohtani & Yamamoto, 2005; Sakuma et al., 2012, 2015). Jeden z nejnovějších výzkumů odhalil možný vliv zubních patologií na přesnost odhadu, kdy zubní kaz může ovlivňovat koncentraci D-enantiomeru (Katkova & Shanina, 2020). Racemizace je též teplotně závislá a nižší teplota může výrazně zpomalit její průběh (Griffin et al., 2009). Metoda je nepoužitelná v případě spálených ostatků nebo u jedince, který zemřel před velmi dlouhou dobou (Ritz-Timme et al., 2000).

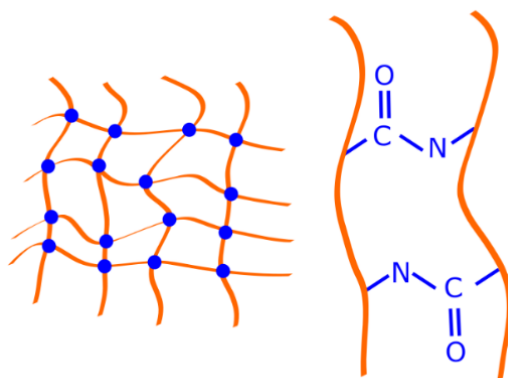
4.2. Collagen crosslinks

Kolagen je hojně rozšířený extracelulární, ve vodě nerozpustný skleroprotein. Skládá se z řetězců α_1 a α_2 , které se vzájemně ovíjejí kolem společné osy za vzniku pravotočivé trojšroubovice (tropokolagen) o průměru okolo 1,5 nm. Výsledná kolagenní vlákna (fibrily) skládající se z tropokolagenu jsou měkká, ohebná, nepružná a vysoce pevná v tahu (Obr. 5.). Vyskytují se ve všech typech pojivových tkání a tvoří celkem třetinu celkového obsahu proteinů v těle. Tloušťka kolagenního vlákna dosahuje hodnot 1-20 μm a délka je značně variabilní (Shoulders & Raines, 2009).



Obr. 5: Struktura kolagenu (Gueltekin, 2018).

Mechanická pevnost kolagenních fibril se odvíjí od mechanismu mezimolekulárního zesíťování (collagen crosslinking). Jeho základem je tvorba kovalentních vazeb mezi jednotlivými vlákny (Obr. 6.) (Eyre & Wu, 2005).



Obr. 6: Kolagenové zesíťení (vlevo) a kovalentní vazby mezi vlákny (vpravo)
(Vlastní tvorba podle Diogo et al., 2018).

Celkem je známo minimálně 27 různých typů kolagenu přičemž tzv. collagen crosslinks tvoří zejména kolageny typu IV, VIII a X (Khoshnoodi et al., 2006). Kvalita a míra zesíťování kolagenních fibril v kostech je objektem zkoumání mnoha studií. V nich byla například zjištěna spojitost mezi mírou, kvalitou a zastoupením jednotlivých typů zesíťování a osteoporózou (Oxlund et al., 1996) či korelace mezi zhoršováním kvality kosti (na základě změn poměrů mezi jednotlivými příčnými vazbami a jejich ubýváním) a věkem jedince (Wang et al., 2002). Postupné ubývání, degradace a změny kolagenových

příčných vazeb byly prokázány v různých tkáních jako například u chrupavky (David R. Eyre et al., 2010), dentice (Martin-de las Heras et al., 1999) či kosti, kde kost kompaktní vykazuje vyšší výskyt příčných vazeb než kost spongiózní (Eyre et al., 1988).

Pro využití kolagenního zesíťování v odhadu věku dožití jsou zkoumány jeho různé složky (Eyre & Wu, 2005), příkladem může být deoxyypyridinolin či lysylpyridinolin, který je pro kostní tkáň a dentin specifický (Açil et al., 2002). Výsledky odhadu věku dožití na základě koncentrace deoxyypyridinolinu v dentinu dosahovaly 65% přesnosti s odchylkou 14,9 let (Martin-de las Heras et al., 1999). Další studie zkoumající koncentraci pyridinolinu v chrupavkách přinesla zjištění, že jeho obsah stoupá až do tzv. fyziologické dospělosti (cca 20 let věku). Poté klesá, což může být způsobeno přechodem na jinou formu příčných vazeb nebo jejich zánikem (Moriguchi & Fujimoto, 1978). Naopak studie postavené na měření koncentrace složek lysylpyridinolinu a hydroxylysylpyridinolinu nepřinesly výsledky, které by naznačovaly změnu koncentrací v závislosti na věku. Naopak bylo zjištěno, že koncentrace příčných vazeb je vysoce individuální, jelikož byly naměřeny různé koncentrace napříč vzorky stejného stáří (Açil et al., 2002).

Na základě výsledků studií zabývajících se výzkumem tzv. collagen crosslinks zatím jasně nebyla prokázána možnost jejich praktického využití při odhadu věku dožití. Navíc jsou časově i finančně náročné a zatím dosahují nízké přesnosti a spolehlivosti. Je tedy zřejmé, že pro možné praktické využití daných postupů je třeba dalších výzkumů (Adserias-Garriga, 2019).

4.3. Akumulace olova

Další možností odhadu věku je postup založený na depozici olova v dentinu, který je jednou z nejčastějších tkání kam se olovo během života ukládá (AL-Qattan & Elfawal, 2010). Olovo je těžký toxický kov hojně využívaný v širokém spektru průmyslových odvětví (Greenwood et al., 1993). Při kontaktu s organismem se ukládá hlavně v kostech, zubech a v určitém množství se nachází v krvi (Korrick et al., 2002). Existují studie o životním prostředí, kde byly zuby použity jako indikátory znečištění olovem. Z toho lze usoudit, že výsledná metoda pro odhad věku bude silně závislá na životním prostředí, v němž se daný jedinec během života nacházel, a jaké dávce olova byl vystaven (Haavikko et al., 1984). Jelikož koncentrace olova v dentinu je v závislosti na věku kumulativní, je možné najít jistou korelaci mezi věkem a koncentrací olova v zubech (Steenhout & Pourtois, 1981).

Nejčastější technikou analýzy akumulace olova v zubech je atomová absorpční spektrofotometrie (AL-Qattan & Elfawal, 2010; Bercovitz & Laufer, 1991; Steenhout & Pourtois, 1981). Mnohé studie testující tento přístup korelaci s věkem našly (AL-Qattan & Elfawal, 2010; Bercovitz & Laufer, 1991; Drasch & Ott, 1988), některé naopak ne (Nusbaum et al., 1965). Například studie založená na měření koncentrace olova v dentinu, která byla aplikována na kuvaitské populaci, vykazovala přesnost odhadu $\pm 4,8$ roku a přinesla zjištění, že koncentrace olova v dentinu je vyšší u mužské části populace (AL-Qattan & Elfawal, 2010).

Postup odhadu věku na základě měření koncentrace olova byl také použit na kostech (přesněji kosti pánevní, stehenní a spánkové). Nevykazovaly ovšem tak dobré výsledky jako dentin (Drasch & Ott, 1988). Stejně jako u výše zmíněných přístupů je nutné provést další výzkum a upravit daný postup pro jednotlivé populace (Adserias-Garriga, 2019).

4.4. Další chemické možnosti pro odhad věku dožití

Jelikož odhad věku dožití na základě kosterních pozůstatků je i přes využití vyspělých chemických postupů celkem problematický, je zde snaha o nalezení dalších, přesnějších, rychlejších i levnějších biochemických postupů (Adserias-Gariga, 2019).

Jednou z dalších možností pro odhad věku dožití na základě kosterních pozůstatků je sledování změn v jejich složení. Během stárnutí prochází dentin i jinými změnami. V průběhu života se směrem od špičky kořene zubu postupně vytváří transparentní dentin (Vasiliadis et al., 1983). Následnou průhlednost zubů způsobuje mineralizace peritubulárního dentinu a ubývání hmoty dentinových tubulů (Amprino & Engström, 1952). Studie založené na elektronové skenovací mikroskopii odhalily, že dentinové tubuly se skutečně ztenčují s přibývajícím věkem, avšak nikterak významně. Všechny tyto změny jsou zároveň doprovázeny změnami v chemickém složení dentinu (Kósa et al., 1990). V průběhu senescence například dochází ke snížení poměru vápníku ku fosforu (Kósa et al., 1989). Pro studium chemického složení zubu se jeví jako nejvhodnější způsob Ramanova spektrometrie (Tramini et al., 2001). Ramanovu spektrometrii použili i Ager a kol. při analýze kompaktní kosti. S její pomocí zjistili, že v této tkáni také dochází ke změnám v chemickém složení spojených se stárnutím (Ager et al., 2006).

Další možností by mohl být přístup založený na zkoumání koncových produktů pokročilé glykace tzv. AGEs (advanced glycation end-products). Nejméně polovina nám známých AGEs se v průběhu senescence shromažďuje v kolagenu rychlostí, která koreluje s jeho poločasem rozpadu (Baynes, 2001). Většina studií týkajících se AGEs a jejich možného využití pro odhad věku dožití zjistila, že akumulace AGEs je trvalá a dlouhodobá. Mezi hlavní AGEs, které by mohly být použity pro odhad věku dožití, patří např. pentosidin či furosin. Jsou uloženy v dentinu a mezi hlavní metody pro jejich studium patří fluorescenční analýza, imunologické barvení či elektronová mikroskopie (Miura et al., 2014). Předností této metody je její využití u spálených ostatků (Sato et al., 2001).

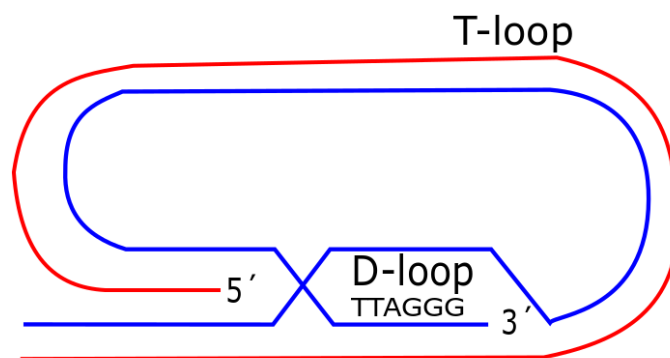
5. Přístupy molekulární biologie

Ruku v ruce s pokroky na poli molekulární biologie a stále ucelenějšími znalostmi o procesech, ke kterým dochází, je možné uvažovat o nových markerech senescence a tím i o vývoji nových přístupů k odhadu věku (Ellingham & Adserias-Garriga, 2019). Mnohé studie byly původně zaměřeny na vzorky krve a slin (Tsuji et al., 2002) zejména díky jednodušší izolaci DNA ze vzorků. Později byly metody upraveny pro použití na tvrdých tkáních (Takasaki et al., 2003). Některé na svou revizi a použití na tvrdých tkáních čekají (Lipovich et al., 2014; Sarg et al., 2002).

U vzorků kostí se využívají zejména kompaktní vrstvy kortikálních kostí, jelikož obsahují osteocyty – jediné buňky které si zachovají svou DNA i po expozici nepříznivým podmínkám. Nejčastěji používané jsou kosti dlouhé, jelikož jsou hutnější a lépe tak odolávají nepříznivým podmínkám (Latham & Miller, 2019). Zuby jsou oproti kostím více odolné vůči nepříznivým vlivům okolního prostředí a často bývají zdrojem kvalitnější DNA (nejkvalitnější extrakt můžeme získat z dřevové dutiny) (Boles et al., 1995). Existují také přístupy, které fungují i při vyšším věku (Corral-Debrinski et al., 1992) a naopak u některých úspěšnost metody s růstem věku klesá (Márquez-Ruiz et al., 2020). I přes veškerou snahu a technologickou vyspělost daných přístupů mají zmíněné přístupy, které jsou založené většinou na již téměř tradičních laboratorních postupech jako je například real-time PCR (Meißner et al., 1997), southern-blot (Tsuji et al., 2002) a další, své limity. V některých případech dosahují jen stejné, či dokonce nižší přesnosti a spolehlivosti než tradiční morfologické či biochemické metody. Dalším limitem může být dostupnost, finanční zátěž či časová náročnost daných přístupů. Z dosud zkoumaných přístupů založených na molekulárně biologické podstatě se zdají být nejvhodnější a neúspěšnější metody založené na methylaci DNA a (s o něco menší úspěšností odhadu) zkracování telomer (Márquez-Ruiz et al., 2020).

5.1. Zkracování telomer

Telomery jsou koncové, nekódující části eukaryontní chromozomální DNA skládající se z opakující se sekvence nukleotidů „TTAGGG“ (Alberts, 2002). Na konci telomery se nachází cca 300 bází dlouhý jednovláknový úsek, který formuje tzv. D-loop (Obr.7.) (Greider, 1999). Tato smyčka stabilizuje telomery a zajišťuje, aby nebyly rozpoznány jako poškozená DNA, která je jinak degradována reparačními mechanismy. Telomery mohou být obnoveny telomerázou, což je DNA dependentní DNA polymeráza neboli reverzní transkriptáza (Greider, 1996). Nutno podotknout, že je aktivní pouze u zárodečných buněk, některých kmenových buněk (např. ESC) či některých bílých krvinek (Alberts, 2002).



Obr. 7: Jednoduchá struktura telomery (Vlastní tvorba podle Cleal et al., 2018)

Telomery slouží jako mechanická ochrana konců chromozomů, brání rekombinaci s ostatními chromozomy a v neposlední řadě zamezují zkracování kódujících částí chromozomu, ke kterému dochází v průběhu replikace. Při níž jsou telomery zkracovány místo důležitých částí DNA. Při absenci kompenzačních mechanismů (reverzní transkripce) se telomery zkracují s každým dělením buněk. Samotná buňka je v průměru schopna absolvovat 50–70 procesů dělení (Snustad, 2009). Postupné zkracování telomer vede až k programované buněčné smrti (Counter et al., 1992), které se účastní tumor-supresorové geny p53 a Rb (Alberts, 2002).

Možná korelace zkracování telomer se zvyšujícím se věkem jedince se stala tématem mnoha studií. Poukázaly na zkracování telomer během procesu senescence v různých typech buněk jako jsou fibroblasty (Harley et al., 1990), buňky periferní krve (Iwama et al., 1998; Ren et al., 2009), jaterní buňky (Takubo et al., 2000) či v zubní dřeni (Takasaki et al., 2003). Samotná délka telomer se liší napříč živočišnými druhy, v rámci jednoho druhu i mezi orgány konkrétního jedince. Takový jev je dán tím, že délku telomer ovlivňuje široké spektrum faktorů ať již genetických, epigenetických či environmentálních (Shammas, 2011). Délka telomer je tudíž během života ovlivňována stresem, obezitou, kvalitou potravin, kouřením, či nemocí (Valdes et al., 2005). Proces zkracování telomer, ke kterému během senescence dochází, není lineární. V raném dětství se délka telomer zmenšuje rychleji. Později výrazně zkracování zpomaluje až do mladé dospělosti a postupně ubývá po celý dospělý život s různou rychlostí v závislosti na životní situaci, v níž se daný jedinec v danou dobu nachází (Ishikawa et al., 2016).

Studie z roku 1998 našla inverzní korelaci (zvětšení jedné proměnné vyvolá vždy zmenšení druhé proměnné) mezi délkou telomer a věkem jedinců v krevních a kožních buňkách. Dále bylo zjištěno, že přesnost a spolehlivost odhadu s narůstajícím věkem klesá (Butler et al., 1998) Další studie (Tsuji et al.), která byla provedena s pomocí metody „southern blot“ (biochemická hybridizační metoda využívaná při práci s DNA) na vzorcích periferní krve jedinců s věkovým rozmezím 0–85 let, též prokázala inverzní korelaci mezi délkou telomer a věkem. Navzdory nalezeným spojitostem byl rozdíl mezi chronologickým a odhadovaným věkem v průměru 7,04 let, což jsou podobné výsledky, kterých dosahují tradiční morfologické metody. Navíc bylo zjištěno, že zkracování telomer je zásadně

ovlivněno environmentálními faktory působícími během života jedince a zkracování v redukované formě probíhá i po smrti (Tsuji et al., 2002).

Studie založené na použití tohoto přístupu na tvrdých tkáních bohužel nejsou tak početné jako studie provedené na fluidních vzorcích především kvůli jednodušší extrakci DNA. Studie zaměřená zejména na forenzní využití daného přístupu odhadu věku pracovala též pomocí metody „southern blot“, kterou použila na vzorky zubní dřevě. Jako u předchozího výzkumu Tsuji et. al. se prokázala téměř stejná korelace délky telomer a věku jako studie předchozí. Odchylka mezi chronologickým a odhadovaným věkem byla též podobná, tedy 7,52 let (Takasaki et al., 2003).

Hlavními nevýhodami přístupu odhadu věku dožití na základě sledování zkracování telomer je fakt, že příčina smrti a vnější podmínky, kterým jsou pozůstatky vystavené, mohou odhad významně ovlivnit. Proto ji nelze použít například u případů utonutí (Takasaki et al., 2003). Dalším limitem je pokles úspěšnosti metody s přibývajícím věkem vzhledem k metodě založené na methyloaci DNA (obě aplikovány na vzorky zubů) a neschopnost dosáhnout alespoň srovnatelné úspěšnosti (Márquez-Ruiz et al., 2020). Dalším slabým bodem výzkumu je nemožnost použití daného přístupu odhadu na různé populace, neboť při testování odhadu na vzorcích periferní krve jedinců z různých populací chyba odhadu vzrostla na 9,83 let (Ren et al., 2009).

5.2. Mutace mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (též mtDNA či mDNA) se nachází uvnitř mitochondrií a patří tedy mezi mimojadernou genetickou informaci. Je zpravidla dvouřetězcová, cirkulární a svým charakterem je podobná prokaryotnímu chromozomu (nukleoidu) (Alberts, 2002). V jedné mitochondrii se mohou nacházet až desítky molekul mtDNA. Zároveň nejsou asociovány s proteiny a jejich genetický kód se od jaderného kódu mírně liší: kupříkladu UGA není stop-kodonem (Snustad, 2002). Lidská mitochondriální DNA obsahuje 16 569 bází, které dohromady tvoří celkem 37 genů kódujících 16S a 23S rRNA, tRNA či proteiny účastníci se oxidativní fosforylace (např. NADH dehydrogenáza (Anderson et al., 1981)). U mtDNA dochází k tzv. maternální dědičnosti. To znamená, že drtivá většina mitochondriální genetické informace je děděna pouze po matce (Giles et al., 1980) a ve forenzních vědách je běžně užívána k identifikaci jedince (Koyama et al., 2002).

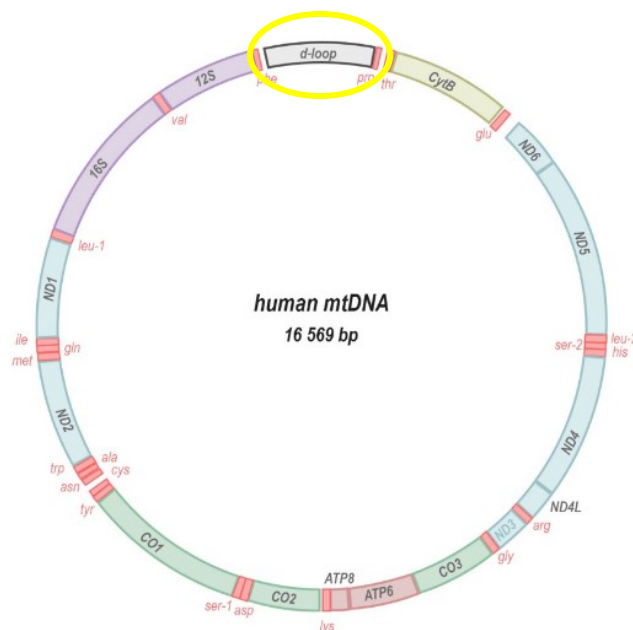
V mitochondriích nedochází (oproti jádru) k některým důležitým reparačním procesům (Anderson et al., 1981), např. rekombinaci či opravě pyrimidinových dimerů (Clayton et al., 1974) a mtDNA není vázána na histony. Proto se vyznačuje vysokou mutační rychlostí, která je až 10x vyšší než u jaderné DNA, kde reparační procesy probíhají (Sigurđardóttir et al., 2000).

Hned několik studií poukázalo na jistou spojitost mezi akumulací mutací v mtDNA, věkem a chorobami, které jsou s procesem stárnutí spojené (Del Bo et al., 2002; Dobson et al., 2020; Harman, 1960; Michikawa, 1999). Na základě teorie volných radikálů je jejich produkce přímo úměrná věku. Nadměrná produkce ROS má za následek postupnou ztrátu účinnosti různých molekulárních procesů

v buňce (Harman, 1960). Výsledkem jsou stárnutí a související degenerativní onemocnění (např. osteoporóza), které se objevují během senescence (Dobson et al., 2020). Výskyt a hojnost těchto mutantních mtDNA se zvyšuje s věkem kvůli postupnému snižování produkce a aktivity antioxidantních enzymů (např. Zn-SOD, kataláza a glutathionperoxidáza). Změny se týkají zejména tkání s velkou poptávkou po energii (Wei et al., 2001).

V současné době existuje varianta právě popsané teorie aplikována právě na mitochondriální DNA – tzv. „mitochondriální teorie stárnutí“ (Beckman & Ames, 1998). Základem je produkce ROS během procesů, které probíhají v elektronovém transportním řetězci mitochondrií, s následnou indukci poškození fosfolipidů, proteinů a nukleových kyselin. To má mimo jiné za následek vznik nových mutací mtDNA (Chistiakov et al., 2014). Takto poškozená mtDNA produkuje funkčně poškozené proteinové podjednotky dýchacího řetězce, což má za následek dále se zvyšující produkci ROS a tím pádem vyšší akumulaci neopravených poškozených mtDNA. Právě tato poškozená mtDNA má veliký podíl na stárnutí a vzniku onemocnění souvisejících se senescencí (Horan et al., 2012). Různé studie prokázaly značnou rozmanitost typu mutací vzniklých právě působením ROS: alterace, bodové mutace, rozsáhlé delece či tandemové duplikace (Calloway et al., 2000; Wei et al., 2009). Ačkoliv ROS způsobují různé typy mutací, studie zkoumající jejich spojitost s odhadem věku se zaměřují zejména na delece (Simonetti et al., 1992), alterace (Thèves et al., 2006) a miniduplikace (Lacan et al., 2011). Jelikož mtDNA nemá adekvátní opravné mechanismy, právě pro takové typy mutací během replikace je jejich vznik oproti jaderné DNA usnadněn, výhodou při jejich sledování může být absence intronů (Anderson et al., 1981; Clayton et al., 1974). Nejčastějším místem mtDNA, kde k mutacím dochází, je tzv. D-loop (Obr. 8.). Na tuto oblast se výzkumy zaměřují (Arbeithuber et al., 2020).

Studie analyzující delece mtDNA se zaměřují převážně na detekci delece v místě 4977 bp (tzv. „běžná delece“) (Simonetti et al., 1992). Detekce takových delecí probíhá pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (Meißner et al., 1997), což je enzymatický proces, který umožňuje amplifikaci (namnožení) specifického fragmentu DNA (v našem případě mtDNA okolo místa delece 4977 bp) (Mullis, 1990). Různé studie analyzující tuto deleci prokázaly nárůst výskytu mutace s věkem (Corral-Debrinski et al., 1992; Lee et al., 1994) a o jejím možném využití ve forenzním odhadu věku provedl studii Meißner et al. (Meißner et al., 1997). Na jistou možnost využití metody detekce delecí na kosterní pozůstatky poukázal Papiha a kol., když se podařilo nalézt specifické delece u tří z pěti jedinců starších 60 let (Papiha et al., 1998).



Obr. 8: Molekula mtDNA s vyznačenými geny, oblast D-loop zvýrazněna (Hahn & Zuryn, 2019).

Další mutací analyzovanou pomocí forenzních aplikací byl přechod (alterace) mezi adeninem a toguaninem v poloze 189 (označováno též „A189G“). Tato mutace byla za pomoci technik southern blot a real-time PCR analyzována a nejlépe detekována v kosterním svalu. Její nárůst byl prokázán opět u podstatně starších jedinců (Thèves et al., 2006). Možnost využití tohoto postupu v kostní tkáni testoval Lacan a kol., kterým se podařilo prokázat korelaci nárůstu počtu A189G s věkem. Alteraci bylo možné detekovat u kostí patřícím minulým populacím přibližně od věku jedince 60 let a u recentnějších kostí již od 38 let (Lacan et al., 2008). Další výzkum provedl taktéž Lacan a kol. a byl založen na detekci tří různých typů duplikací v kostech a svalech pomocí kapilární elektroforézy. Přítomnost daných duplikací bylo možné sledovat od věku 20 let ve svalech a 38 let u kostí (Lacan et al., 2011).

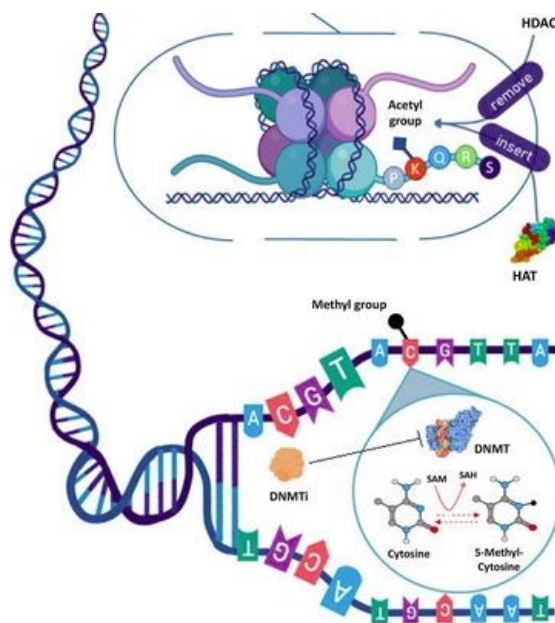
Posledním možným markerem pro odhad věku na základě mtDNA je pokles množství mtDNA během senescence (Cree et al., 2008). Přístup byl aplikován na tvrdé tkáně. S pomocí PCR a elektroforézy byly analyzovány vzorky dentinu extrahované ze zubů moudrosti osob ve věku mezi 2085 lety (Mörnstad et al., 1999). Výsledky studie Mörnstad a kol. potvrdil Zapico & Ubelaker, když prokázali silnou negativní korelaci (-0,83 na vzorcích dentinu z Asturie a -0,81 na vzorcích dentinu z Katalánska) mezi množstvím mtDNA a věkem. Studie dále našla rozdíly v korelaci napříč populacemi a mezi vzorky dentinu a zubní dřevě (-0,37 Asturie a -0,45 Katalánsko) (Zapico & Ubelaker, 2016).

Výsledky výše zmíněných studií očividně potvrzují, že v mtDNA lze detekovat několik mutací souvisejících s věkem a otevírají cestu pro použití molekulárních markerů pro odhad věku při forenzní nebo antropologické identifikaci. Je ovšem nutný další výzkum, aby bylo možné navrhnout konkrétní metodu odhadu (Lacan et al., 2011). Dalšímu pokroku dále také brání chybovost sekvenování, která se pohybuje okolo jedné chyby na 100–1000 párů bází (Arbeithuber et al., 2020).

5.3. Epigenetické modifikace

Epigenetika je podobor genetiky zkoumající změny struktury genů a jejich exprese, aniž by se měnila sekvence nukleotidů. Jinými slovy: epigenetické modifikace ovlivňují fenotyp, aniž by se měnil genotyp daného jedince (Alberts, 2002). Epigenetické modifikace nachází své uplatnění v široké škále molekulárních procesů před i po transkripci nebo translaci (Snustad, 2009). Hrají důležitou roli v genové expresi, morfogenezi a diferenciaci buněk (Halusková, 2010). Mohou se také podílet na vzniku celé řady nemocí (např. rakovina, kardiovaskulární onemocnění, některá autoimunitní onemocnění, reprodukční či neurobehaviorální onemocnění). Mezi látky, které mohou epigenetické modifikace ovlivňovat, patří těžké kovy, výfukové plyny spalovacích motorů, tabákový kouř, radioaktivita, některé viry či bakterie a mnoho dalších (Weinhold, 2006). Podobně jako u mtDNA existuje tzv. „epigenetická teorie stárnutí“. Na jejím základě jsou epigenetické modifikace zásadní pro proces stárnutí, kdy se společně s rostoucím věkem akumuluje stále více epigenetických mutací a dochází k aktivaci genů, které byly dříve inhibovány (Salpea et al., 2012).

Mezi epigenetické projevy patří například modifikace histonů, methylace DNA (Obr. 9.) či nekódující RNA (Alberts, 2002). Nejnovější publikace naznačují, že právě úroveň methylované DNA úzce koreluje s chronologickým věkem a má tedy potenciál pro odhad věku (Dias et al., 2020; Márquez-Ruiz et al., 2020).



Obr. 9: Methylace DNA a acetylace konců histonu (Furtado et al., 2019)

Methylace DNA je pojem, kterým rozumíme modifikaci cytosinu nebo adeninu kovalentním připojením methylového zbytku (u cytosinu na čtvrtý dusík či pátý uhlík) (Kim et al., 2008). Takto methylované cytosiny se nejčastěji nachází v oblastech bohatých na cytosin a guanin, takzvaných CpG

ostrůvcích. Ty najdeme v regulačních oblastech genů (promotory, intergenové regiony a repetitivní elementy) (Buck-Koehntop & Defossez, 2013; Jabbari & Bernardi, 2004).

Methylované CpG ostrůvky dokáží inaktivovat transkripci nebo naopak, pokud dojde k demethylaci, transkripci aktivovat. K demethylaci cytosinu může dojít během replikace nebo pomocí TET enzymů, které se podílí na hydroxylaci methylcytosinu (Ziller et al., 2011).

Míra methylace DNA je tkáňově specifická, studie byly provedeny na různých typech tkání jako jsou sliny (Bocklandt et al., 2011), krev (Weidner et al., 2014) či tvrdé tkáně jako jsou kosti, dentin či zubní cement (Bekaert et al., 2015). Studie zabývající se slinami byla postavena na základě sledování 88 methylačních míst v 80 genech ze vzorků slin homozygotních dvojčat ve věkovém rozmezí 21–55 let. Nalezla významnou spojitost míry methylace s věkem. Ze tří methylačních míst (v promotorech ADARADD, TOM1L1 a NPTX2 EDARADD), u kterých míra methylace lineárně korelovala s věkem, bylo dosaženo nejvyšší přesnosti u promotoru EDARADD s chybou odhadu 5,2 let mezi chronologickým a odhadovaným věkem (Bocklandt et al., 2011). Další autoři analyzovali změny methylace různých genů, které se podílejí na stárnutí, například ELOVL2 ve vzorcích krve či promotory genů ASPA a ITG2B, s velmi podobnými výsledky a odchylkou odhadu okolo 5 let (Weidner et al., 2014).

Další studie poukázaly na fakt, že navýšení počtu zkoumaných genů by mohlo vést k vyšší přesnosti odhadu věku (Bacalini et al., 2015). Na základě této skutečnosti byly provedeny další studie za využití zkoumání methylace na genech ELOVL2, Clorf132, TRIM59, KLF14 a FHL2 a EDARADD a bylo dosaženo přesnosti 3,9 let (Zbieć-Piekarska, Spólnicka, Kupiec, Parys-Proszek, et al., 2015) a 3,75 let (Bekaert et al., 2015).

Výzkum methylované DNA ve tvrdých tkáních (postaven na předchozích výzkumech fluidních vzorků) je poměrně nový. Studie zabývající se touto tematikou nejsou početné, ale někdy v případě lidských kosterních pozůstatků jsou tyto tkáně jedinými zdroji DNA. Při výzkumu míry methylace na vzorcích zubů dosáhli Bekaert a kol. průměrné odchylky 4,86 let odhadovaného věku od skutečného (Bekaert et al., 2015). Bližší výzkum zkoumající methylaci na genech ELOVL2, FHL2 a PENK (za pomoci metody MALDI-TOF spektrometrie) dosáhl průměrné chyby odhadu 2,25 let na vzorcích z dřene, při zkoumání zubního cementu 2,45 let a 7 let u dentinu. Situace poukazuje na užitečnost daného přístupu při forenzní a antropologické aplikaci. Vezmeme-li v potaz, že při kombinaci využití dat ze vzorků cementu a dřene zároveň dosáhl tento přístup odhadu průměrné odchylky 1,20 let, jeví se tato metoda jako jedna z nejslibnějších ze všech molekulárních přístupů k odhadu věku dožití na základě kosterních pozůstatků (Giuliani et al., 2016).

Díky velmi slibným výsledkům je výzkum této možnosti odhadu věku stále aktuální, nicméně údaj úspěšnosti odhadu s odchylkou 1,20 let se zdá být značně optimistickým. U nejnovějších studií se totiž průměrná odchylka pohybuje okolo 4,5 let, konkrétně 4,97 let u studie Dias et al. (2020) a 3,8 let u Jung et al. (2019). Nutno podotknout, že obě studie byly postaveny na vzorcích krve a slin (Dias et al., 2020; Jung et al., 2019). Metoda byla porovnána a následně i kombinována se sledováním změn délky

telomer. Bylo zjištěno, že délka telomer má pouze omezenou užitečnost jako doplňkový marker pro odhad věku, jelikož přispěla jen malým zlepšením úspěšnosti odhadu (Márquez-Ruiz et al., 2020). Data jedné z posledních studií, která byla založena na porovnání výsledků mezi korejskou a portugalskou populací, též naznačují, že míra methylace je populačně závislá (Dias et al., 2020). Je více než jasné, že pro možné využití tohoto přístupu na vzorky tvrdých tkání je potřeba provést další studie a navrhnout konkrétní postupy, větší zastoupení studií založených na fluidních vzorcích vysvětluje náročnější a složitější extrakce ze vzorků tvrdých tkání.

7. Závěr

Tato bakalářská práce přináší přehled a základní definici metod odhadu věku dožití u dospělých kosterních pozůstatků. Zároveň diskutuje o jejich výhodách i nevýhodách. Z výše napsaného je zřejmé, že odhad věku dožití stále zůstává problematickým a je nutné stávající metody dále rozvíjet a hledat spolehlivější a přesnější přístupy, optimalizovat (např. na různé populace), kombinovat či přicházet s novými postupy. Jednotlivé metody lze rozdělit do několika kategorií – na jedné straně stojí tradiční morfologické metody, které vynikají svou jednoduchostí a finanční nenáročností. Navíc byly několikrát testovány, upravovány a optimalizovány. Nicméně, i přes výše zmíněné, naráží tradiční morfologické metody na své limity, jako je velké rozpětí intervalů a s tím spojené snížení přesnosti odhadu, destrukce či absence námi zkoumaných částí kostry a mnohé další.

Mezi nejčastěji používané patří metoda Suchey-Brooks sledující změny na pubické symfýze, velmi slibně se také jeví přístup založený na sledování acetabula. V současné době se výzkumy ubírají cestou virtuálních 3D skenovaných modelů či použití MSCT a jejich vyhodnocováním, což přináší zlepšení spolehlivosti a úspěšnosti daných metod.

Na straně druhé jsou to přístupy chemické a molekulární, které jsou, co se výsledků týče, mnohdy takřka srovnatelné (mohou dosahovat i vyšší úspěšnosti odhadu) s tradičními morfologickými přístupy. Velkou nevýhodou moderních biochemických přístupů je fakt, že jsou často náročné na techniku, čas, znalosti i finance. Neméně důležitou nevýhodou je poměrně nízká početnost provedených studií a nutnost jejich optimalizace na kosterní pozůstatky. Jako nejslibnější přístupy se z chemických přístupů jeví racemizace kyseliny asparagové a z molekulárních metod methylace DNA.

Výše zmíněných metod existuje široká škála a každý postup má své limity, střední chybu odhadu či věkové rozpětí pro poskytnutí nejpřesnějších výsledků. Mnohdy jsou některé metody nevyužitelné ve vyšším věku, naopak některé jsou úspěšnější u starších jedinců. Existují metody, které dosahují stejné úspěšnosti napříč populacemi, u některých se jejich výsledky značně liší. V některých případech mohou být metody zcela nepoužitelné (např. požár, utonutí, absence či nedostatečná kvalita části skeletu, která má být sledována), nebo jsou výsledky značně ovlivněny vnějším prostředím.

Problematika odhadu věku u kosterních pozůstatků dospělých jedinců je každý den aktuálním tématem napříč širokou vědeckou společností. Stále modernější přístupy, technika a rostoucí znalosti

širokého spektra procesů, ke kterým během života jedince dochází, nám v dlouhodobém výhledu přináší naději, že přístupy k odhadu věku kosterních pozůstatků budou dosahovat stále vyšší přesnosti a úspěšnosti.

8. Seznam použitých zdrojů

- Alberts, Bruce , et al. The Molecular Biology of the Cell. [s.l.]: *Garland Science*, 2002.(4th. ed).
- Açil, Y., Springer, I. N. G., Prasse, J. G., Hedderich, J., & Jepsen, S. (2002). Concentration of collagen cross-links in human dentin bears no relation to the individual age. *International Journal of Legal Medicine*, 116(6), 340–343. <https://doi.org/10.1007/s00414-002-0333-8>
- Acsádi, G. (1970). History of human life span and mortality. *Akad. Kiadó*.
- Adserias-Garriga, J., Thomas, C., Ubelaker, D. H., & C. Zapico, S. (2018). When forensic odontology met biochemistry: Multidisciplinary approach in forensic human identification. *Archives of Oral Biology*, 87, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.001>
- Ager, J. W., Nalla, R. K., Balooch, G., Kim, G., Pugach, M., Habelitz, S., Marshall, G. W., Kinney, J. H., & Ritchie, R. O. (2006). On the Increasing Fragility of Human Teeth With Age: A Deep-UV Resonance Raman Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(12), 1879–1887. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060816>
- Acharya, A. B., & Kumar, K. K. (2011). Age estimation in Indians from extracted unsectioned teeth. *Forensic Science International*, 212(1), 275.e1-275.e5. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.06.021>
- AL-Qattan, S. I., & Elfawal, M. A. (2010). Significance of teeth lead accumulation in age estimation. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 17(6), 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2010.05.001>
- Amprino, R., & Engström, A. (1952). STUDIES ON X RAY ABSORPTION AND DIFFRACTION OF BONE TISSUE. *Cells Tissues Organs*, 15(1–2), 1–22. <https://doi.org/10.1159/000140734>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Arany, S., & Ohtani, S. (2010). Age Estimation by Racemization Method in Teeth: Application of Aspartic Acid, Glutamate, and Alanine. *Journal of Forensic Sciences*, 55(3), 701–705. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01324.x>
- Arbeithuber, B., Hester, J., Cremona, M. A., Stoler, N., Zaidi, A., Higgins, B., Anthony, K., Chiaromonte, F., Diaz, F. J., & Makova, K. D. (2020). Age-related accumulation of de novo mitochondrial mutations in mammalian oocytes and somatic tissues. *PLOS Biology*, 18(7), e3000745. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000745>
- Austin, D., & King, R. E. (2016). The Biological Profile of Unidentified Human Remains in a Forensic Context. *Academic Forensic Pathology*, 6(3), 370–390. <https://doi.org/10.23907/2016.039>
- Bada, J. L., & Protsch, R. (1973). Racemization Reaction of Aspartic Acid and Its Use in Dating Fossil Bones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(5), 1331–1334. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.5.1331>
- Baker, B. J. (1995). Review of Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains Research Series 44 [Review of *Review of Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains Research Series 44*, recenzoval J. E. BUIKSTRA & D. H. UBELAKER]. *Southeastern Archaeology*, 14(2), 209–211.
- Baynes, J. W. (2001). The role of AGEs in aging: Causation or correlation. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1527–1537. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00138-3)

- Becker, I., Woodley, S. J., & Stringer, M. D. (2010). The adult human pubic symphysis: A systematic review: The pubic symphysis. *Journal of Anatomy*, 217(5), 475–487.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01300.x>
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). Mitochondrial Aging: Open Questionsa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 118–127. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09897.x>
- Bekaert, B., Kamalandua, A., Zapico, S. C., Voorde, W. V. de, & Decorte, R. (2015). Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*, 10(10), 922–930. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>
- Bennett, K. (2020). Estimation of Age From the Auricular Surface of the Ilium Through the Utilization of 3D Scanning and GIS. *LSU Master's Theses*.
https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/5112
- Bercovitz, K., & Laufer, D. (1991). Age and gender influence on lead accumulation in root dentine of human permanent teeth. *Archives of Oral Biology*, 36(9), 671–673.
[https://doi.org/10.1016/0003-9969\(91\)90020-U](https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90020-U)
- Bertrand, B., Cunha, E., Bécart, A., Gosset, D., & Hédouin, V. (2019). Age at death estimation by cementochronology: Too precise to be true or too precise to be accurate? *American Journal of Physical Anthropology*, 169(3), 464–481. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23849>
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sánchez, F. J., Sinsheimer, J. S., Horvath, S., & Vilain, E. (2011). Epigenetic Predictor of Age. *PLOS ONE*, 6(6), e14821.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821>
- Boles, T. C., Snow, C. C., & Stover, E. (1995). Forensic DNA Testing on Skeletal Remains from Mass Graves: A Pilot Project in Guatemala. *Journal of Forensic Science*, 40(3), 349–355.
<https://doi.org/10.1520/JFS13786J>
- Brooks, S., & Suchey, J. M. (1990). Skeletal age determination based on the os pubis: A comparison of the Acsádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Human Evolution*, 5(3), 227–238.
<https://doi.org/10.1007/BF02437238>
- Brůžek, J. (2016). Biologický profil jedince – první krok k identifikaci ve forenzní antropologii a bioarcheologii. 4. *Academia, SSČ AV ČR*, v. v. i., 2016
- Buckberry, J. L., & Chamberlain, A. T. (2002). Age estimation from the auricular surface of the ilium: A revised method. *American Journal of Physical Anthropology*, 119(3), 231–239.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.10130>
- Buck-Koehntop, B. A., & Defossez, P.-A. (2013). On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics*, 8(2), 131–137. <https://doi.org/10.4161/epi.23632>
- Butler, M. G., Tilburt, J., DeVries, A., Muralidhar, B., Aue, G., Hedges, L., Atkinson, J., & Schwartz, H. (1998). Comparison of Chromosome Telomere Integrity in Multiple Tissues from Subjects at Different Ages. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 105(2), 138–144.
[https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(98\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(98)00029-6)
- Calce, S. E. (2012). A new method to estimate adult age-at-death using the acetabulum. *American Journal of Physical Anthropology*, 148(1), 11–23. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22026>
- Calce, S. E., & Rogers, T. L. (2011). Evaluation of age estimation technique: Testing traits of the acetabulum to estimate age at death in adult males. *Journal of Forensic Sciences*, 56(2), 302–311. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01700.x>
- Calloway, C. D., Reynolds, R. L., Herrin, G. L., & Anderson, W. W. (2000). The Frequency of Heteroplasmy in the HVII Region of mtDNA Differs across Tissue Types and Increases with Age. *The American Journal of Human Genetics*, 66(4), 1384–1397.
<https://doi.org/10.1086/302844>

- Cameriere, R., Ferrante, L., & Cingolani, M. (2004). Variations in pulp/tooth area ratio as an indicator of age: A preliminary study. *Journal of Forensic Sciences*, 49(2), 317–319.
- Cameriere, R., Ferrante, L., & Cingolani, M. (2006). Age estimation in children by measurement of open apices in teeth. *International Journal of Legal Medicine*, 120(1), 49–52. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0047-9>
- Clayton, D. A., Doda, J. N., & Friedberg, E. C. (1974). The Absence of a Pyrimidine Dimer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(7), 2777–2781. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.7.2777>
- Cleal, K., Norris, K., & Baird, D. (2018). Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 482. <https://doi.org/10.3390/ijms19020482>
- Cloos, P. A., & Fledelius, C. (2000). Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: A biological clock of protein aging with clinical potential. *The Biochemical Journal*, 345 Pt 3, 473–480.
- Colard, T., Bertrand, B., Naji, S., Delannoy, Y., & Bécart, A. (2018). Toward the adoption of cementochronology in forensic context. *International Journal of Legal Medicine*, 132(4), 1117–1124. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1172-8>
- Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M. T., Shoffner, J. M., Flint Beal, M., & Wallace, D. C. (1992). Mitochondrial DNA deletions in human brain: Regional variability and increase with advanced age. *Nature Genetics*, 2(4), 324–329. <https://doi.org/10.1038/ng1292-324>
- Cree, L. M., Patel, S. K., Pyle, A., Lynn, S., Turnbull, D. M., Chinnery, P. F., & Walker, M. (2008). Age-related decline in mitochondrial DNA copy number in isolated human pancreatic islets. *Diabetologia*, 51(8), 1440–1443. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1054-4>
- Cunha, E., Baccino, E., Martrille, L., Ramsthaler, F., Prieto, J., Schuliar, Y., Lynnerup, N., & Cattaneo, C. (2009). The problem of aging human remains and living individuals: A review. *Forensic Science International*, 193(1–3), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.09.008>
- Čihák, R., & Grim (prof.MUDr), M. (2001). *Anatomie I*. Grada.
- D’Aniello, G., Ronsini, S., Notari, T., Grieco, N., Infante, V., D’Angel, N., Mascia, F., Fiore, M. M. D., Fisher, G., & D’Aniello, A. (2012). *D-Aspartate, a Key Element for the Improvement of Sperm Quality*. 2012. <https://doi.org/10.4236/asm.2012.24008>
- Dedouit, F., Bindel, S., Gainza, D., Blanc, A., Joffre, F., Rougé, D., & Telmon, N. (2008). Application of the Iscan Method to Two- and Three-Dimensional Imaging of the Sternal End of the Right Fourth Rib. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2), 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00642.x>
- Del Bo, R., Bordoni, A., Boneschi, F. M., Crimi, M., Sciacco, M., Bresolin, N., Scarlato, G., & Comi, G. P. (2002). Evidence and age-related distribution of mtDNA D-loop point mutations in skeletal muscle from healthy subjects and mitochondrial patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 202(1–2), 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(02\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(02)00247-2)
- Demirjian, A., Goldstein, H., & Tanner, J. M. (1973). A New System of Dental Age Assessment. *Human Biology*, 45(2), 211–227.
- Destruction of microstructure in archaeological bone: A case study from Portugal—Jackes—2001—International Journal of Osteoarchaeology—Wiley Online Library*. (b.r.). Získáno 8. března 2021, z <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/oa.583>
- DeWitte, S. N. (2018). Demographic anthropology. *American Journal of Physical Anthropology*, 165(4), 893–903. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23317>
- Dias, H. C., Cordeiro, C., Pereira, J., Pinto, C., Real, F. C., Cunha, E., & Manco, L. (2020). DNA methylation age estimation in blood samples of living and deceased individuals using a

- multiplex SNaPshot assay. *Forensic Science International*, 311, 110267.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110267>
- DiGangi, E. A., Bethard, J. D., Kimmerle, E. H., & Konigsberg, L. W. (2009). A new method for estimating age-at-death from the first rib. *American Journal of Physical Anthropology*, 138(2), 164–176. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20916>
- Diogo, G. S., López-Senra, E. L., Pirraco, R. P., Canadas, R. F., Fernandes, E. M., Serra, J., Pérez-Martín, R. I., Sotelo, C. G., Marques, A. P., González, P., Moreira-Silva, J., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2018). Marine Collagen/Apatite Composite Scaffolds Envisaging Hard Tissue Applications. *Marine Drugs*, 16(8), 269. <https://doi.org/10.3390/md16080269>
- Dirkmaat, D. C., & Cabo, L. L. (b.r.). *Forensic Anthropology: Embracing the New Paradigm. Dirkmaat/A Companion to Forensic Anthropology, 2012*, 1–40.
- Dobson, P. F., Dennis, E. P., Hipps, D., Reeve, A., Laude, A., Bradshaw, C., Stamp, C., Smith, A., Deehan, D. J., Turnbull, D. M., & Greaves, L. C. (2020). Mitochondrial dysfunction impairs osteogenesis, increases osteoclast activity, and accelerates age related bone loss. *Scientific Reports*, 10(1), 11643. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68566-2>
- Drasch, G. A., & Ott, J. (1988). Lead in human bones. Investigations on an occupationally non-exposed population in Southern Bavaria (F.R.G) II. Children. *Science of The Total Environment*, 68, 61–69. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(88\)90361-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(88)90361-0)
- Dubourg, O., Faruch-Bilfeld, M., Telmon, N., Savall, F., & Saint-Martin, P. (2020). Technical note: Age estimation by using pubic bone densitometry according to a twofold mode of CT measurement. *International Journal of Legal Medicine*, 134(6), 2275–2281. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02349-2>
- Electron Probe Microanalysis of Human Teeth for the Determination of Individual Age—Ferenc Kosa, Albert Antal, Imre Farkas, 1990.* (b.r.). Získáno 14. listopad 2020, z <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002580249003000205>
- Ellingham, S., & Adserias-Garriga, J. (2019). Complexities and considerations of human age estimation. In *Age Estimation* (s. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814491-6.00001-7>
- Eyre, D. R., Dickson, I. R., & Van Ness, K. (1988). Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochemical Journal*, 252(2), 495–500. <https://doi.org/10.1042/bj2520495>
- Eyre, David R., Weis, M. A., & Wu, J.-J. (2010). Maturation of Collagen Ketoimine Cross-links by an Alternative Mechanism to Pyridinoline Formation in Cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16675–16682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111534>
- Eyre, David R., & Wu, J.-J. (2005). Collagen Cross-Links. In J. Brinckmann, H. Notbohm, & P. K. Müller (Ed.), *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly* (s. 207–229). Springer. <https://doi.org/10.1007/b103828>
- Falys, C., & Lewis, M. (2011). Proposing a way forward: A review of standardisation in the use of age categories and ageing techniques in osteological analysis (2004–2009). *International Journal of Osteoarchaeology*, 21, 704–716. <https://doi.org/10.1002/oa.1179>
- Franklin, D. (2010). Forensic age estimation in human skeletal remains: Current concepts and future directions. *Legal Medicine*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.09.001>
- Furtado, C. L. M., Luciano, M. C. D. S., Santos, R. D. S., Furtado, G. P., Moraes, M. O., & Pessoa, C. (2019). Epidrugs: Targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164–1176. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>
- Garvin, H. M., & Passalacqua, N. V. (2012). Current practices by forensic anthropologists in adult skeletal age estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), 427–433. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01979.x>

- Gilbert, B. M., & McKern, T. W. (1973). A method for aging the female Os pubis. *American Journal of Physical Anthropology*, 38(1), 31–38. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330380109>
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>
- Giuliani, C., Cilli, E., Bacalini, M. G., Pirazzini, C., Sazzini, M., Gruppioni, G., Franceschi, C., Garagnani, P., & Luiselli, D. (2016). Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth. *American Journal of Physical Anthropology*, 159(4), 585–595. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22921>
- Graham, J. P., O'Donnell, C. J., Craig, P. J. G., Walker, G. L., Hill, A. J., Cirillo, G. N., Clark, R. M., Gledhill, S. R., & Schneider-Kolsky, M. E. (2010). The application of computerized tomography (CT) to the dental ageing of children and adolescents. *Forensic Science International*, 195(1–3), 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.11.011>
- Greenwood, N. N., Earnshaw, A., & Jursík, F. (1993). *Chemie prvku*. Informatorium. <https://is.muni.cz/publication/140342/cs/Chemie-prvku/Greenwood-Earnshaw-Jursik>
- Greider, C. W. (1996). ^{TEL}omere Length Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002005>
- Greider, C. W. (1999). Telomeres Do D-Loop–T-Loop. *Cell*, 97(4), 419–422. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80750-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80750-3)
- Griffin, R. C., Moody, H., Penkman, K. E. H., & Collins, M. J. (2008). The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth. *Forensic Science International*, 175(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.04.226>
- Gueltekin, O. (2018). *Computational Inelasticity of Fibrous Biological Tissues with a Focus on Viscoelasticity, Damage and Rupture*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32171.18724>
- Gustafson, G., & G, K. (1974). Age Estimation up to 16 years of age based on dental development.
- Gustafson, G., & Malmö, D. O. (1950). Age Determinations on Teeth. *The Journal of the American Dental Association*, 41(1), 45–54. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1950.0132>
- Haas, J., Buikstra, J. E., Ubelaker, D. H., Aftandilian, D., & Field Museum of Natural History (Ed.). (1994). *Standards for data collection from human skeletal remains: Proceedings of a seminar at the Field Museum of Natural History, organized by Jonathan Haas*. Arkansas Archeological Survey.
- Haavikko, K., Anttila, A., Helle, A., & Vuori, E. (1984). Lead Concentrations of Enamel and Dentine of Deciduous Teeth of Children from Two Finnish Towns. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 39(2), 78–84. <https://doi.org/10.1080/00039896.1984.10545839>
- Hahn & Zuryn. (2019). Mitochondrial Genome (mtDNA) Mutations that Generate Reactive Oxygen Species. *Antioxidants*, 8, 392. <https://doi.org/10.3390/antiox8090392>
- Halusková, J. (2010). Epigenetic studies in human diseases. *Folia Biologica*, 56(3), 83–96.
- Hanihara, K., & Suzuki, T. (1978). Estimation of age from the pubic symphysis by means of multiple regression analysis. *American Journal of Physical Anthropology*, 48(2), 233–239. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330480218>
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–460. <https://doi.org/10.1038/345458a0>
- Harman, D. (1960). The Free Radical Theory of Aging: The Effect of Age on Serum Mercaptan Levels. *Journal of Gerontology*, 15(1), 38–40. <https://doi.org/10.1093/geronj/15.1.38>
- Hartnett, K. M. (2010). Analysis of age-at-death estimation using data from a new, modern autopsy sample--part I: Pubic bone. *Journal of Forensic Sciences*, 55(5), 1145–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01399.x>

- Helfman, P. M., & Bada, J. L. (1975). Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(8), 2891–2894. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.8.2891>
- History of Human Life Span and Mortality. Gy. Acsadi, J. Nemeskeri. (1974). *Current Anthropology*, 15(4), 495–507. <https://doi.org/10.1086/201508>
- Horan, M. P., Pichaud, N., & Ballard, J. W. O. (2012). Review: Quantifying Mitochondrial Dysfunction in Complex Diseases of Aging. *The Journals of Gerontology: Series A*, 67(10), 1022–1035. <https://doi.org/10.1093/gerona/qlr263>
- Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Revin, V. V., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2014, duben 10). *Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of Mitochondria* [Review Article]. BioMed Research International; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2014/238463>
- Christensen, A. M., Passalacqua, N. V., & Bartelink, E. J. (2019). *Forensic Anthropology: Current Methods and Practice*. Academic Press.
- İşcan, M. Y., Loth, S. R., & Wright, R. K. (1984). Metamorphosis at the sternal rib end: A new method to estimate age at death in white males. *American Journal of Physical Anthropology*, 65(2), 147–156. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330650206>
- İşcan, M. Y., Loth, S. R., & Wright, R. K. (1985). Age estimation from the rib by phase analysis: White females. *Journal of Forensic Sciences*, 30(3), 853–863.
- Işcan, M. Y., & Steyn, M. (2013). *THE HUMAN SKELETON IN FORENSIC MEDICINE: (3rd Ed.)*. Charles C Thomas Publisher.
- Ishikawa, N., Nakamura, K.-I., Izumiya-Shimomura, N., Aida, J., Matsuda, Y., Arai, T., & Takubo, K. (2016). Changes of telomere status with aging: An update. *Geriatrics & Gerontology International*, 16(S1), 30–42. <https://doi.org/10.1111/ggi.12772>
- Iwama, H., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J. H., Hayashi, S., Yahata, N., Ando, K., Toyama, K., Hoshika, A., Takasaki, M., Mori, M., & Shay, J. W. (1998). Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Human Genetics*, 102(4), 397–402. <https://doi.org/10.1007/s004390050711>
- Jabbari, K., & Bernardi, G. (2004). Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene*, 333, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.02.043>
- Johnson, B. J., & Miller, G. H. (1997). ARCHAEOLOGICAL APPLICATIONS OF AMINO ACID RACEMIZATION. *Archaeometry*, 39(2), 265–287. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1997.tb00806.x>
- Jung, S.-E., Lim, S. M., Hong, S. R., Lee, E. H., Shin, K.-J., & Lee, H. Y. (2019). DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 1–8. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.010>
- Kerley. (1970). *Estimation of skeletal age: After about age 30 years*.
- Key, C. A., Aiello, L. C., & Molleson, T. (1994). Cranial suture closure and its implications for age estimation. *International Journal of Osteoarchaeology*, 4(3), 193–207. <https://doi.org/10.1002/oa.1390040304>
- Khandare, D. S. V., Bhise, D. S. S., & Shinde, D. A. B. (2015). *Age estimation from cranial sutures – a Postmortem study*. 03(03), 11.
- Khoshnoodi, J., Cartailier, J.-P., Alvares, K., Veis, A., & Hudson, B. G. (2006). Molecular recognition in the assembly of collagens: Terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38117–38121.
- Kim, J. K., Samaranyake, M., & Pradhan, S. (2008). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(4), 596. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8432-4>

- Kimmerle, E. H., Konigsberg, L. W., Jantz, R. L., & Baraybar, J. P. (2008). Analysis of age-at-death estimation through the use of pubic symphyseal data. *Journal of Forensic Sciences*, 53(3), 558–568. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00711.x>
- Kósa, F., Farkas, I., & Wittman, G. (1989). Microprobe study of bones in the determination of individual age. *Morphologiai es igazságyi orvosi szemle*, 29(3), 227–232. Scopus.
- Koyama, H., Iwasa, M., Ohtani, S., Ohira, H., Tsuchimochi, T., Maeno, Y., Isobe, I., Matsumoto, T., Yamada, Y., & Nagao, M. (2002). Personal Identification from Human Remains by Mitochondrial DNA Sequencing. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 23(3), 272–276.
- Kunos, C. A., Simpson, S. W., Russell, K. F., & Hershkovitz, I. (1999). First rib metamorphosis: Its possible utility for human age-at-death estimation. *American Journal of Physical Anthropology*, 110(3), 303–323. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199911\)110:3<303::AID-AJPA4>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199911)110:3<303::AID-AJPA4>3.0.CO;2-O)
- Lacan, M., Thèves, C., Amory, S., Keyser, C., Crubézy, E., Salles, J.-P., Ludes, B., & Telmon, N. (2008). Detection of the A189G mtDNA heteroplasmic mutation in relation to age in modern and ancient bones. *International Journal of Legal Medicine*, 123(2), 161. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0266-y>
- Lacan, M., Thèves, C., Keyser, C., Farrugia, A., Baraybar, J.-P., Crubézy, E., & Ludes, B. (2011). Detection of age-related duplications in mtDNA from human muscles and bones. *International Journal of Legal Medicine*, 125(2), 293–300. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0440-x>
- Lamendin, H., Baccino, E., Humbert, J. F., Tavernier, J. C., Nossintchouk, R. M., & Zerilli, A. (1992). A simple technique for age estimation in adult corpses: The two criteria dental method. *Journal of Forensic Sciences*, 37(5), 1373–1379.
- Latham, K. E., & Miller, J. J. (2019). DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts. *Forensic Sciences Research*, 4(1), 51–59. <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1515594>
- Lee, H.-C., Pang, C.-Y., Hsu, H.-S., & Wei, Y.-H. (1994). Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1226(1), 37–43. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90056-6)
- Lipovich, L., Tarca, A. L., Cai, J., Jia, H., Chugani, H. T., Sterner, K. N., Grossman, L. I., Uddin, M., Hof, P. R., Sherwood, C. C., Kuzawa, C. W., Goodman, M., & Wildman, D. E. (2014). Developmental changes in the transcriptome of human cerebral cortex tissue: Long noncoding RNA transcripts. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 24(6), 1451–1459. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs414>
- Lovejoy, C. O., Meindl, R. S., Pryzbeck, T. R., & Mensforth, R. P. (1985). Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: A new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1), 15–28. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330680103>
- Márquez-Ruiz, A. B., González-Herrera, L., Luna, J. de D., & Valenzuela, A. (2020). DNA methylation levels and telomere length in human teeth: Usefulness for age estimation. *International Journal of Legal Medicine*, 134(2), 451–459. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02242-7>
- Martin-de las Heras, S., Valenzuela, A., & Villanueva, E. (1999). Deoxypyridinoline crosslinks in human dentin and estimation of age. *International Journal of Legal Medicine*, 112(4), 222–226. <https://doi.org/10.1007/s004140050240>

- Meißner, C., von Wurmb, N., & Oehmichen, M. (1997). Detection of the age-dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine*, 110(5), 288–291. <https://doi.org/10.1007/s004140050089>
- Meyer, A., van der Merwe, A., & Steyn, M. (2021). An evaluation of the Acsádi and Nemeskéri Complex Method of adult age estimation in a modern South African skeletal sample. *Forensic Science International*, 321, 110740. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110740>
- Michikawa, Y. (1999). Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication. *Science*, 286(5440), 774–779. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.774>
- Milner, G. R., & Boldsen, J. L. (2012). Transition analysis: A validation study with known-age modern American skeletons. *American Journal of Physical Anthropology*, 148(1), 98–110. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22047>
- Miranda, J. C. de, Azevedo, A. de C. S., Rocha, M., Michel-Crosato, E., Biazevic, M. G. H., Miranda, J. C. de, Azevedo, A. de C. S., Rocha, M., Michel-Crosato, E., & Biazevic, M. G. H. (2020). Age estimation in Brazilian adults by Kvaal's and Cameriere's methods. *Brazilian Oral Research*, 34. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0051>
- Miura, J., Nishikawa, K., Kubo, M., Fukushima, S., Hashimoto, M., Takeshige, F., & Araki, T. (2014). Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Archives of Oral Biology*, 59(2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.10.012>
- Moriguchi, T., & Fujimoto, D. (1978). Age-Related Changes in the Content of the Collagen Crosslink, Pyridinoline. *The Journal of Biochemistry*, 84(4), 933–935. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132206>
- Mörnstad, H., Pfeiffer, H., Yoon, C., & Teivens, A. (1999). Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *International Journal of Legal Medicine*, 112(2), 98–100. <https://doi.org/10.1007/s004140050209>
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Murray, R. K., & Harper, H. A. (2002). *Harperova biochemie*. <http://www.medvik.cz/link/MED00131245>
- Oettlé, A. C., & Steyn, M. (2000). Age estimation from sternal ends of ribs by phase analysis in South African Blacks. *Journal of Forensic Sciences*, 45(5), 1071–1079.
- Ohtani, S., Matsushima, Y., Kobayashi, Y., & Kishi, K. (1998). Evaluation of aspartic acid racemization ratios in the human femur for age estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 43(5), 949–953.
- Ohtani, S., & Yamamoto, K. (1991). Age Estimation Using the Racemization of Amino Acid in Human Dentin. *Journal of Forensic Science*, 36(3), 792–800. <https://doi.org/10.1520/JFS13089J>
- Ohtani, Susumu, Matsushima, Y., Kobayashi, Y., & Yamamoto, T. (2002). Age estimation by measuring the racemization of aspartic acid from total amino acid content of several types of bone and rib cartilage: A preliminary account. *Journal of Forensic Sciences*, 47(1), 32–36.
- Ohtani, Susumu, & Yamamoto, T. (2010). Age Estimation by Amino Acid Racemization in Human Teeth. *Journal of Forensic Sciences*, 55(6), 1630–1633. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01472.x>
- Osborne, D. L., Simmons, T. L., & Nawrocki, S. P. (2004). Reconsidering the Auricular Surface as an Indicator of Age at Death. *Journal of Forensic Science*, 49(5), JFS2003348-7. <https://doi.org/10.1520/JFS2003348>

- Oxlund, H., Sekilde, Li., & Ørtoft, G. (1996). Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone*, *19*(5), 479–484. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(96\)00283-9](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00283-9)
- Panchbhai, A. (2011). Dental radiographic indicators, a key to age estimation. *Dentomaxillofacial Radiology*, *40*(4), 199–212. <https://doi.org/10.1259/dmfr/19478385>
- Papiha, S. S., Rathod, H., Briceno, I., Pooley, J., & Datta, H. K. (1998). Age related somatic mitochondrial DNA deletions in bone. *Journal of Clinical Pathology*, *51*(2), 117–120. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.2.117>
- PhD, R. E. N., MD, E. M. B., AB, T. C. G., & AB, S. L. D. (1965). Relation of Air Pollutants to Trace Metals in Bone. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, *10*(2), 227–232. <https://doi.org/10.1080/00039896.1965.10663989>
- Ren, F., Li, C., Xi, H., Wen, Y., & Huang, K. (2009). Estimation of Human Age According to Telomere Shortening in Peripheral Blood Leukocytes of Tibetan: *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, *30*(3), 252–255. <https://doi.org/10.1097/PAF.0b013e318187df8e>
- Rissech, C., Estabrook, G. F., Cunha, E., & Malgosa, A. (2007). Estimation of Age-at-Death for Adult Males Using the Acetabulum, Applied to Four Western European Populations. *Journal of Forensic Sciences*, *52*(4), 774–778. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00486.x>
- Rougé-Maillart, C., Telmon, N., Rissech, C., Malgosa, A., & Rougé, D. (2004). The Determination of Male Adult Age at Death by Central and Posterior Coxal Analysis—A Preliminary Study. *Journal of Forensic Science*, *49*(2), 1–7. <https://doi.org/10.1520/JFS2002056>
- Rougé-Maillart, Clotilde, Jousset, N., Vielle, B., Gaudin, A., & Telmon, N. (2007). Contribution of the study of acetabulum for the estimation of adult subjects. *Forensic Science International*, *171*(2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.10.007>
- Rougé-Maillart, Clotilde, Vielle, B., Jousset, N., Chappard, D., Telmon, N., & Cunha, E. (2009). Development of a method to estimate skeletal age at death in adults using the acetabulum and the auricular surface on a Portuguese population. *Forensic Science International*, *188*(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.03.019>
- Salpea, P., Russanova, V. R., Hirai, T. H., Sourlingas, T. G., Sekeri-Pataryas, K. E., Romero, R., Epstein, J., & Howard, B. H. (2012). Postnatal development- and age-related changes in DNA-methylation patterns in the human genome. *Nucleic Acids Research*, *40*(14), 6477–6494. <https://doi.org/10.1093/nar/gks312>
- San-Millán, M., Rissech, C., & Turbón, D. (2017). New approach to age estimation of male and female adult skeletons based on the morphological characteristics of the acetabulum. *International Journal of Legal Medicine*, *131*(2), 501–525. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1406-4>
- Sarg, B., Koutzamani, E., Helliger, W., Rundquist, I., & Lindner, H. H. (2002). Postsynthetic Trimethylation of Histone H4 at Lysine 20 in Mammalian Tissues Is Associated with Aging*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(42), 39195–39201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205166200>
- Sato, Y., Kondo, T., & Ohshima, T. (2001). Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the hippocampus. *Histopathology*, *38*(3), 217–220. Scopus. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2001.01059.x>
- Shammas, M. A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *14*(1), 28–34. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834121b1>

- Shirley, N. R., & Montes, P. A. R. (2015). Age Estimation in Forensic Anthropology: Quantification of Observer Error in Phase Versus Component-Based Methods. *Journal of Forensic Sciences*, 60(1), 107–111. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12617>
- Schmitt, A., & Murail, P. (2004). Is the first rib a reliable indicator of age at death assessment? Test of the method developed by Kunos et al (1999). *HOMO*, 54(3), 207–214. <https://doi.org/10.1078/0018-442X-00070>
- Sigurðardóttir, S., Helgason, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K., & Donnelly, P. (2000). The mutation rate in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1599–1609. <https://doi.org/10.1086/302902>
- Simonetti, S., Chen, X., DiMauro, S., & Schon, E. A. (1992). Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: Analysis by quantitative PCR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1180(2), 113–122. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(92\)90059-V](https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90059-V)
- Spinage, C. A. (1973). A review of the age determination of mammals by means of teeth, with especial reference to Africa. *African Journal of Ecology*, 11(2), 165–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.1973.tb00081.x>
- Steenhout, A., & Pourtois, M. (1981). Lead accumulation in teeth as a function of age with different exposures. *Occupational and Environmental Medicine*, 38(3), 297–303. <https://doi.org/10.1136/oem.38.3.297>
- Takasaki, T., Tsuji, A., Ikeda, N., & Ohishi, M. (2003). Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *International Journal of Legal Medicine*, 117(4), 232–234. <https://doi.org/10.1007/s00414-003-0376-5>
- Takubo, K., Nakamura, K.-I., Izumiyama, N., Furugori, E., Sawabe, M., Arai, T., Esaki, Y., Mafune, K.-I., Kammori, M., Fujiwara, M., Kato, M., Oshimura, M., & Sasajima, K. (2000). Telomere Shortening With Aging in Human Liver. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(11), B533–B536. <https://doi.org/10.1093/gerona/55.11.B533>
- Thèves, C., Keyser-Tracqui, C., Crubézy, E., Salles, J.-P., Ludes, B., & Telmon, N. (2006). Detection and Quantification of the Age-Related Point Mutation A189G in the Human Mitochondrial DNA. *Journal of Forensic Sciences*, 51(4), 865–873. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00163.x>
- Todd, T. W. (1920a). Age changes in the pubic bone. I. The male white pubis. *American Journal of Physical Anthropology*, 3(3), 285–334. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330030301>
- Todd, T. W. (1920b). Age changes in the pubic bone. I. The male white pubis. *American Journal of Physical Anthropology*, 3(3), 285–334. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330030301>
- Todd, T. W. (1923). Age Changes in the Pubic Symphysis. *Journal of Anatomy*, 57(Pt 3), 274–294.12.
- Todd, T. W. (1930). Age changes in the pubic bone. VIII. Roentgenographic differentiation. *American Journal of Physical Anthropology*, 14(2), 255–271. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330140205>
- Tramini, P., Bonnet, B., Sabatier, R., & Maury, L. (2001). A method of age estimation using Raman microspectrometry imaging of the human dentin. *Forensic Science International*, 118(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00352-2](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00352-2)
- Tsuji, A., Ishiko, A., Takasaki, T., & Ikeda, N. (2002). Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Science International*, 126(3), 197–199. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00086-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00086-5)
- Valdes, A., Andrew, T., Gardner, J., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L., Aviv, A., & Spector, T. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *The Lancet*, 366(9486), 662–664. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66630-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66630-5)

- Vasiliadis, L., Darling, A. I., & Levers, B. G. H. (1983). The amount and distribution of sclerotic human root dentine. *Archives of Oral Biology*, 28(7), 645–649. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(83\)90013-4](https://doi.org/10.1016/0003-9969(83)90013-4)
- Vi, K., & Sn, S. (2020). [L- and D-amino acids in the composition of dental bioapatite and the determination of human age]. *Sudebno-Meditsinskaia Ekspertiza*, 63(4), 30–33. <https://doi.org/10.17116/sudmed20206304130>
- Villa, C., Buckberry, J., Cattaneo, C., Frohlich, B., & Lynnerup, N. (2015). Quantitative Analysis of the Morphological Changes of the Pubic Symphyseal Face and the Auricular Surface and Implications for Age at Death Estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 60(3), 556–565. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12689>
- Wang, X., Shen, X., Li, X., & Mauli Agrawal, C. (2002). Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00697-4](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00697-4)
- Wärmländer, S. K. T. S., & Sholts, S. B. (2011). Sampling and statistical considerations for the Suchey–Brooks method for pubic bone age estimation: Implications for regional comparisons. *Science & Justice*, 51(3), 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2010.12.001>
- Wei, Y. H., Ma, Y. S., Lee, H. C., Lee, C. F., & Lu, C. Y. (2001). Mitochondrial theory of aging matures—Roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi = Chinese Medical Journal; Free China Ed*, 64(5), 259–270.
- Wei, Y.-H., Wu, S.-B., Ma, Y.-S., & Lee, H.-C. (2009). Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Medical Journal*, 32(2), 113–132.
- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K.-H., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brümmendorf, T. H., & Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology*, 15(2), R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspectives*, 114(3), A160–A167.
- Wittwer-Backofen, U., Gampe, J., & Vaupel, J. W. (2004). Tooth cementum annulation for age estimation: Results from a large known-age validation study. *American Journal of Physical Anthropology*, 123(2), 119–129. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10303>
- Yamamoto, T., Li, M., Liu, Z., Guo, Y., Hasegawa, T., Masuki, H., Suzuki, R., & Amizuka, N. (2010). Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontology*, 98(2), 102–109. <https://doi.org/10.1007/s10266-010-0134-3>
- Zahra, K., Shahid, M., Kazmi, S., & Malik, A. R. (b.r.). *Age Estimation from Macroscopically Examining Sternal End of Right Fourth Rib by Using Pit Depth in Deceased males*. 5.
- Zander, H. A., & Hurzeler, B. (1958). Continuous cementum apposition. *Journal of Dental Research*, 37(6), 1035–1044. <https://doi.org/10.1177/00220345580370060301>
- Zapico, S. C., & Ubelaker, D. H. (2016). Relationship Between Mitochondrial DNA Mutations and Aging. Estimation of Age-at-death. *The Journals of Gerontology: Series A*, 71(4), 445–450. <https://doi.org/10.1093/gerona/glv115>
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Makowska, Ż., Spas, A., Parys-Proszek, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., & Branicki, W. (2015). Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, 14, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.002>
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Ż., Pałeczka, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., & Branicki, W. (2015). Development of a forensically useful age

prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>

Ziller, M. J., Müller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., Boyle, P., Epstein, C. B., Bernstein, B. E., Lengauer, T., Gnirke, A., & Meissner, A. (2011). Genomic Distribution and Inter-Sample Variation of Non-CpG Methylation across Human Cell Types. *PLoS Genetics*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002389>

9. Seznam obrázků a příloh

Obrázek1.Fotografie pubické symfýzy	4
Obrázek2.Fotografie aurikulární plochy	6
Obrázek 3.Fotografie oblasti acetabula	7
Obrázek 4. L- a D-enantiomerní formy kyseliny asparagové	12
Obrázek 5. Struktura kolagenních vláken.	14
Obrázek 6. Náčrt „collagen crosslinks“.....	15
Obrázek 7. Struktura telomer	18
Obrázek 8. Molekula mtDNA	21
Obrázek 9. Schéma methylace a acetylace.....	23