

Multidisciplinair forensisch onderzoek van onbekende doden en Cold Cases

Meer met minder

Ing. C.S.M. van Leeuwen, Forensisch Coördinator Cold Case Team, Politie Amsterdam
Prof. dr. R.J. Oostra, arts-anatoom, Amsterdam UMC-locatie AMC, Universiteit van Amsterdam
Prof. dr. D.J. Touw, UMC Groningen, ziekenhuisapotheker en toxicoloog Rijksuniversiteit Groningen
Prof. dr. G.R. Davies, geochemicus, Vrije Universiteit Amsterdam
dr. L.M. Kootker, specialist forensisch isotopenonderzoek, Vrije Universiteit Amsterdam
dr. S.W.L. Palstra, Centrum voor Isotopen Onderzoek, ¹⁴C-onderzoeker, Rijksuniversiteit Groningen
dr. A.J. Kal, DNA-deskundige, het Nederlands Forensisch Instituut
drs. R.R.R. Gerretsen, arts - forensisch antropoloog, het Nederlands Forensisch Instituut
drs. R. van der Hulst, apotheker - forensisch toxicoloog, het Nederlands Forensisch Instituut



Samenvatting

In gevallen waarbij skeletresten of een ontbonden lichaam wordt gevonden is het lastig te achterhalen wie de persoon is en wat er gebeurd. Met forensisch onderzoek op een enkel gebitselement en teennagel kan informatie worden verkregen over het geboortjaar, het sterftejaar, de leeftijd, het geslacht, DNA-profiel, de geografische afkomst tijdens de jeugd en overlijden en het geneesmiddel gebruik. Van zeven personen werden een gebitselement, teennagel en bloed verzameld. Met een selectieve en multidisciplinair gedreven monstervoorbewerking werden de gebitselementen en teennagels verdeeld en onderzocht door vijf disciplines: DNA-, isotopen-, toxicologisch- en antropologisch onderzoek en ¹⁴C-datering.

Het aantal geslaagde uitgevoerde analyses en de resultaten werden na het opstellen van een profiel vergeleken met beschikbare informatie. Alle onderzoeken in teennagel leverden resultaten.

Onderzoeken in het gebitselement gaven minder vaak resultaten: 43 % van de DNA onderzoeken, 83% van ¹⁴C onderzoeken, 57 % van antropologische onderzoeken en 100% van de isotopen- en toxicologisch onderzoeken. In 71% van de gevallen werd een volledig donor profiel verkregen en in 29 % een partieel profiel. Deze profielen konden op 22 punten met medische informatie worden vergeleken waarvan er 18 overeenkwamen (82%). Wij concluderen dat het opwerkingsprotocol en het multidisciplinair onderzoek van waarde is voor de forensische praktijk en ingezet kan worden bij het politieel forensisch onderzoek.

1. Inleiding

Tussen het overlijden van een individu en het aantreffen van een stoffelijk overschot kan een groot tijdsverloop bestaan. Het stoffelijk overschot kan in een dusdanige verregaande staat van ontbinding verkeren dat alleen nog (resten van) skeletdelen en andere delen van het lichaam aanwezig zijn, zoals nagels, gebitselementen en haar.

Dit is bijvoorbeeld het geval bij het aantreffen van onbekende doden, bij clandestiene graven, bij lichaams- en skeletdelen in open water en bij exhumaties. In sommigen gevallen zijn slechts enkele elementen, zoals een gebitselement (tand of kies), beschikbaar voor onderzoek. Deze staat van het lichaam bemoeilijkt het forensisch onderzoek naar de doodsoorzaak, omstandigheden en naar de identiteit van de overleden persoon.

Toch kan door onderzoek op het gebitselement en nagel informatie worden gewonnen over de overledene. DNA blijft in deze lichaamsmaterialen het langst beschermd tegen invloeden van buitenaf zoals vocht en micro-organismen [1, 2]. Door het DNA te extraheren en te onderzoeken kan potentieel de identiteit van de overledene aan de hand van referentie DNA-profielen worden vastgesteld. In de afgelopen tien jaar is de toepassing van stabiele isotopensystemen (zoals koolstof (C), stikstof (N) en zuurstof (O)) en radiogene (zoals strontium (Sr) en lood (Pb)) een belangrijk onderdeel geworden van forensisch onderzoek [3, 4]. Het isotopenonderzoek levert informatie op over de voedingsvoorkeuren en inzichten in de geografische herkomst van het geconsumeerde voedsel op verschillende tijdstippen tijdens het leven. Het tandglazuur geeft inzicht in de geologische/geografische regio waar de kindertijd (0-16 jaar) zijn doorgebracht, aannemende dat het voedsel uit dezelfde regio afkomstig was. Nagels geven daarentegen informatie over het dieet en de geologische/geografische herkomst van het individu in de periode van enkele weken tot maanden voor het overlijden, en zijn dus bijzonder waardevol voor het vernauwen van het zoeken naar vermiste personen voor identificatiedoeleinden. Op basis van een ^{14}C datering (koolstofdatering) kan worden bepaald hoe lang het geleden is dat een individu is overleden of hoe lang het geleden is dat gebitselementen zich hebben gevormd. De techniek wordt al tientallen jaren voor forensisch onderzoek ingezet [5]. Door het dateren van het collageen in de tandwortels (dentine), kan worden bepaald in welke tijdperiode dit materiaal gevormd is en kan vervolgens een schatting worden gemaakt van het geboortjaar van de betreffende persoon. Met het dateren van nagels of botmateriaal kan worden onderzocht in welke tijdperiode de persoon waarschijnlijk is overleden. Het minimumaantal geleefde jaren kan worden bepaald aan de hand van tand cementum annulaties (TCA) [6]. Door het tellen van het aantal lijnen in een histologische coupe van een tandwortel is het (minimum) aantal jaren dat het gebitselement in de kaak heeft gestaan te schatten. Door de bekende eruptietijden van een gebitselement te combineren met het aantal getelde lijnen kan een leeftijdsschatting worden gegeven [7].

Het geneesmiddelen- en drugs gebruik ten tijde van leven kan zowel in gebitselementen als nagels worden gedetecteerd [8-12]. De aanwezigheid van stoffen in nagels geven de blootstelling hieraan maanden voor het overlijden weer, de aanwezigheid in gebitselement geeft een meer recent beeld van de blootstelling voor het overlijden.

Samengevat, kan op basis van onderzoek aan gebitselement en nagel informatie van de individu worden verkregen over: de identiteit, jaar van geboorte, jaar van overlijden, leeftijd, geslacht, geografische herkomst in kindertijd en de maanden voor het overlijden en drugs- en geneesmiddelengebruik.

In de praktijk worden deze laboratoriumonderzoeken onafhankelijk van elkaar en sequentieel ingezet, waarbij elke discipline tenminste één gebitselement of nagel gebruikt. Het kan voorkomen dat er een beperkte hoeveelheid aan onderzoeksmateriaal beschikbaar is, waardoor keuzes in soort onderzoek gemaakt moeten worden. Met een selectieve en multidisciplinaire gedreven

monstervoorbewerking en optimale verdeling van het onderzoeksmateriaal kan al het genoemde forensisch onderzoek tegelijkertijd, en dus sneller, worden uitgevoerd op minder materiaal. Het onderhavige multidisciplinaire onderzoek heeft tot doel een efficiënt, minimaal invasief en multidisciplinair bemonsteringsprotocol te ontwikkelen en te valideren waarbij slechts één gebitselement en/of een nagel nodig is voor het DNA-, antropologisch, isotopen- en toxicologisch onderzoek en de ^{14}C datering, waarbij de kwaliteit van de resultaten geborgd blijft.

2. Materiaal en methoden

2.1. *Onderzoeksmateriaal*

Het onderzoeksmateriaal was afkomstig van stoffelijke overschotten van personen die hun lichaam na het overlijden hebben gedoneerd aan de wetenschap bij het Amsterdam-UMC, locatie AMC. Deze personen hebben bij leven toestemming gegeven dat na overlijden zijn/haar stoffelijk overschot niet wordt begraven of gecremeerd, maar bestemd is voor medisch en forensisch onderzoek.

Lichaamsdonatie en het gebruik hiervan voor wetenschappelijk onderzoek, dat niet WMO-plichtig is, vindt plaats conform de Nederlandse wetgeving en de richtlijnen van de medisch ethische commissie van Amsterdam UMC– locatie AMC.

Zeven personen werden geïnccludeerd in het onderzoek. De initiële inclusiecriteria waren de aanwezigheid van een 1^e molaar (kies) en een teennagel van de grote teen. Echter, door een geringe beschikbaarheid van gebitselementen zijn de intakecriteria verruimd naar de aanwezigheid van een molaar (1^e, 2^e, of 3^e kies), premolaar (valse kies) of een hoektand. De geïnccludeerde personen zijn personen die na binnenkomst in het mortuarium direct konden worden bemonsterd en personen die op een eerder tijdstip overleden, maar waar de lichamen bevroren zijn bewaard. Van alle geïnccludeerde personen werd ook bloed als referentiemateriaal voor het DNA-onderzoek. Het bloed werd op een FTA® Kaart gespot, gedroogd en vervolgens droog en bij kamertemperatuur bewaard. De gebitselementen werden bij kamertemperatuur opgeslagen en de teennagels werden bij -20 °C opgeslagen.

Medische informatie werd door het AMC opgevraagd bij de huisarts van de overledene. Deze medische gegevens werden pas ingezien nadat de verschillende onderzoeken waren afgerond en geïnterpreteerd.

2.2. *Verdeling onderzoeksmateriaal*

Het onderzoeksmateriaal werd voor de onderzoeken op het NFI schoongemaakt en verdeeld ten behoeve van de verschillende onderzoeken. De gebitselementen werden schoongemaakt door restanten van weefsel te verwijderen met behulp van een tandenborstel en DNA-vrij water en vervolgens gedecontamineerd met een hypochloriet oplossing. De gebitselementen werden daarna aan de lucht gedroogd. Met een steriele DNA-vrije boor (diameter 1,6 mm, 300 rpm) werd via de onderzijde van gebitselement centraal toegang verkregen tot de pulpaholte. Dit gebaseerd op een methode van Boer et al. [13] Het gruis van het gebitselement en materiaal uit de pulpaholte werd verzameld in een DNA vrije AutoLys® tube door lucht over het filter te zuigen. Vervolgens werden de wortel(s) en de kroon van het gebitselement van elkaar gescheiden met een steriele DNA-vrije diamant zaag (Dremel). Als het gebitselement meerdere tandwortels bezat, dan werden deze gehele wortels afgezaagd. Als er sprake was van de aanwezigheid van slechts één wortel, dan werd het gebitselement in vier delen gedeeld in de kroon en drie delen van de tandwortel. De kroon (bevat glazuur of enamel) was bestemd voor het isotopen onderzoek, de worteldelen (bevatten dentine) voor ^{14}C -datering, antropologisch- en toxicologisch onderzoek. Het poeder uit de pulpa was bestemd

voor het DNA-onderzoek. De deelmonsters werden separaat in een geëtiketteerde polypropyleen pot verpakt en getransporteerd naar de verschillende laboratoria.

De nagel van de grote teen werd schoongemaakt door het resterende nagelbed en vuil te verwijderen met een scalpel en pincet en door te wassen met DNA-vrij water. De nagel werd vervolgens met behulp van een schone nagelschaar in de lengte in drie segmenten verdeeld. Het rechtersegment werd overdwars in tweeën verdeeld. Het linker segment was bestemd voor het isotopenonderzoek. Het middelste segment was bestemd voor toxicologisch onderzoek. Het bovenste deel van het rechter segment was bestemd voor DNA-onderzoek en het onderste gedeelte voor ^{14}C datering. De nagelsegmenten werden separaat in een geëtiketteerde polypropyleen pot verpakt en getransporteerd naar de verschillende laboratoria, waar het onderzoeksmateriaal verder werd bewerkt en geschikt werd gemaakt voor de verschillende onderzoeken.

2.3. Analyses

DNA-onderzoek

DNA werd geëxtraheerd uit circa 50 mg poeder van de pulpa van de gebitselementen, circa 50 mg poeder van de nagel en uit een circa 5x5 mm deel van de FTA kaart gezuiverd via silica chemistry (Qiagen). De concentratie humaan autosomaal, Y-chromosomaal en mitochondriaal DNA werd bepaald met een Real-Time PCR assay. DNA-profilering vond plaats met het Promega PowerPlex® Fusion 6C (PPF6C) PCR amplificatie systeem. Dit systeem is een short tandem repeat (STR) multiplex assay dat 23 autosomale STR loci, 3 Y-chromosomale STR loci en het locus Amelogenin (geslachtsbepaling) typeert. De STR-fragment lengte van het DNA werd via capillaire elektroforese gedetecteerd op een 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). DNA-profielen werden geanalyseerd met GeneMarker HID software (version V2.9.8, SoftGenetics).

Leeftijdsschatting

Een wortel werd gefixeerd in plastic om vervolgens op laag toerental en watergekoeld met een diamantzaag (Struers Accutom) 5 plakken van 50 micrometer te maken die vervolgens worden gepolijst. Van deze plakken werden coupes gemaakt, lichtmicroscopisch beoordeeld en werden de TCA-lijnen geteld.

Isotopen onderzoek

Voor het Sr-Pb-O-C isotopenonderzoek is de buitenzijde van de kroon van het gebitselement met een in HCl schoongemaakt diamantboortje schoongemaakt van mogelijk gecontamineerd tandglazuur. Vervolgens is 30 tot 40 mg aan glazuurpoeder bemonsterd en opgeslagen in een glazen 2 ml buisje. Hieruit is 2 ± 1 mg aan poeder bemonsterd voor het Sr isotopenonderzoek, $0.3 \text{ mg} \pm 10\%$ voor het C-O isotopenonderzoek en de rest is gebruikt voor het Pb isotopenonderzoek. De voor het isotopenonderzoek beschikbaar gestelde nagelfragmenten zijn schoongemaakt met aceton indien nagellak aanwezig was. Vervolgens is de binnen- en buitenzijde van de nagel schoongemaakt met een eveneens in HCl schoongemaakt diamantboortje. De gehele nageldeel is vervolgens overgebracht naar het *clean* laboratorium waar het in een combinatie van geconcentreerd HNO_3 , 6-7 M HCl en H_2O_2 , is opgelost. De Sr extractie heeft plaatsgevonden conform het protocol dat gepubliceerd is in Kootker et al. [14]. Voor het Pb isotopenonderzoek is eenzelfde protocol als in Kootker et al. gehanteerd[15]. Van de nagelfragmenten zijn geen specifieke monsters voor het Sr isotopenonderzoek genomen. Tijdens de kolomchromatografie om het lood van de overige elementen te scheiden is de zogenoemde *pre-fractie* opgevangen, droog gedampt en opgenomen in 0.5 ml 3M HNO_3 . De Sr is vervolgens conform het Sr protocol uit Kootker et al. [14] uit deze *pre-fractie* geëxtraheerd.

De Sr isotopencompositie ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) is bepaald met een Thermische Ionisatie Spectrometer (TIMS - ThermoFinnigan Triton Plus). De Pb isotopencompositie ($^{206}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$, $^{207}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$, $^{208}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$, $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ en $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$) is bepaald met een Multicollector Inductively Coupled Plasma Massa Spectrometer (MC-ICP-MS - ThermoFinnigan Neptune). De $\delta^{18}\text{O}$ en $\delta^{13}\text{C}$ waarden zijn gemeten met behulp van een Thermo Finnigan GasBench II gekoppeld aan een Thermo Finnigan Delta+ massaspectrometer.

^{14}C datering

Voor ^{14}C datering van de tandwortel was in het onderzoek tussen 50 en 210 mg materiaal beschikbaar en is zijn geheel in bewerking genomen. Hierbij is de collageenfractie uit de wortel (dentine) geïsoleerd en werden eventuele andere koolstofverbindingen (waaronder vervuilingen) verwijderd. Dit werd gedaan door het oplossen van het restant aan wortelmateriaal en eventueel aanwezige kalkverbindingen in 4% HCl oplossing bij kamertemperatuur. Na spoelen van het overgebleven vaste (collageen)materiaal met gedecarboniseerd water tot neutrale pH-waarde, werd het materiaal gespoeld met 1% NaOH-oplossing, daarna weer met gedecarboniseerd water gespoeld tot pH neutraal en weer met 4% HCl oplossing en vervolgens gedecarboniseerd water. Het collageen materiaal werd vervolgens opgelost in een aangezuurde oplossing bij 80°C. Na filtering van de collageenoplossing voor het verwijderen van eventueel restmateriaal, werd het collageen ingedampt tot vast materiaal in een oven bij 80°C.

Voor ^{14}C datering van het nagelmateriaal was in het onderzoek 15 tot 80 mg materiaal beschikbaar gesteld en hiervan is 10 mg (zonder nagellakresten) geselecteerd voor verdere behandeling en analyse. Het nagelmateriaal is kort gespoeld met 4% HCl oplossing, daarna met gedecarboniseerd water gespoeld tot neutrale pH en vervolgens gedroogd in een oven bij 80°C. Wanneer een ingestuurde nagel deels nagellak had, is het geselecteerde nagellak-loze stukje voor de zekerheid met aceton gespoeld, voorafgaand aan de voorbehandeling met 4% HCl oplossing.

De collageen monsters en voorbehandelde nagels in dit onderzoek zijn afgewogen in tincupjes (max. 5.5 mg) en verbrand met een Elemental Analyzer. De verkregen gezuiverde CO_2 is cryogeen opgevangen en vervolgens gegrafitiseerd tot grafiet. Het grafiet is in een target geperst en samen met een serie kalibratie- en referentiestandaarden gemeten op koolstofisotopen ^{12}C , ^{13}C en ^{14}C met een Accelerator Mass Spectrometer (AMS).

Toxicologisch onderzoek

De onderste delen van de tandwortels van het gebitselement werden vermalen met een Freezer Mill® van SPEX Europe. Aan 50 mg tandwortelpoeder werden 5 µl van een methanolische oplossing met interne standaarden Amfetamine-D8, Carbamazepine-D10, Diazepam-D5, Pentobarbital-D5 en Secobarbital-D5, van Cerilliant, toegevoegd. Vervolgens werd 300 µl precipitatievloeistof toegevoegd, bestaande uit acetonitril, ethanol en mierenzuur (90:10:0,075), gemengd en een uur in ultrasoonbad geplaatst. Na centrifugeren op 2500 rpm voor 10 minuten werd het supernatant overgebracht in een autosampler vial voor analyse.

De nagelsegmenten werden gedurende een uur geweekt om vervolgens verder te ontdoen van weke delen en het nagelbed. De nagelsegmenten werden in kleine segmenten gesneden met een schone scalpel en 40 mg daarvan werd in 30 minuten tot poeder vermalen met een kogeltrilmolen, Retsch MM 400. Aan het poeder werd 50 µl oplossing van bovenstaande interne standaardmix en 1 ml methanol toegevoegd. De monsters werden over de nacht bij 40°C op een nutating mixer geëxtraheerd. Na centrifugeren werd 800 µl van het extract overgebracht in een glazen buis en tot droog ingedampt met een Speedvac® bij 50 °C. Het monster werd vervolgen heropgelost in 200 µl van hierboven beschreven precipitatievloeistof en tenslotte overgebracht in een autosampler vial voor analyse. Als blanco monster werd een mengsel van afgeknipte nagelranden van meerdere

vrijwilligers gebruikt. De controle monster bestond uit blanco nagelranden waaraan 5 µl oplossing met standaarden en 5 µl van bovengenoemd oplossing met interne standaarden werd toegevoegd. De oplossing met standaarden bevatte de volgende stoffen: amfetamine, PMA, buprenorfine, N-desmethyldomipramine, 7-aminoclonazepam, cocaïne, hydrochloorthiazide, ibuprofen, N-desmethyldomipramine, dextromethorfan, methylamfetamine, PMMA, morfine, nortriptyline, oxazepam, paroxetine, pentobarbital, pregabaline, salicylzuur en tramadol.

De extracten van de gebitselementen, nagels, controle- en blanco monsters werden in positieve en negatieve ionisatie modus geanalyseerd met een LC-ToF-MS 6230A systeem van Agilent op twee verschillende chromatografische kolommen: een HSS T3, 1,8 µm, 2,1 x 150 mm, Acquity UPLC® en een Biphenyl, 1,7 µm 100 Å, 100 x 2,1 mm, Acquity Kinetex®. Deze methode is een routinematig gebruikte screeningsmethode voor forensisch onderzoek die volledig is gevalideerd voor bloed, urine en leverweefsel.

2.4. Donor-profiel en vergelijking met medische informatie

De primaire uitkomst van het onderzoek is het aantal succesvol analyses waarbij geldige resultaten zijn verkregen. Door het combineren van de verschillende meetresultaten kan een profiel van de donor worden opgemaakt. Het profiel bevat een schatting van geboortjaar, sterftejaar en leeftijd, een forensisch DNA-profiel, een mogelijke geolocatie in de kinderjaren en het jaar van overlijden en een overzicht van ingenomen of toegediende geneesmiddelen en drugs. De onderzoeken zijn zonder kennis van de medische informatie en het werkelijke profiel uitgevoerd. Het opgemaakte profiel werd daarna vergeleken met beschikbare informatie op de volgende uitkomsten: geboortjaar, sterftejaar, geslacht, geolocatie in de kinderjaren en het jaar van overlijden en het medicatiegebruik.

3. Resultaten

Stoffelijke overschotten van zeven personen werden geïncludeerd in het onderzoek. In tabel 1 staan de type gebitselementen en herkomst van de teennagels weergegeven die onderzocht zijn.

Tabel 1: Type gebitselementen en herkomst nagel

casus	type gebitselement	herkomst nagel
1	1 ^e molaar, links boven	teennagel rechter grote teen
2	1 ^e premolaar, links boven	teennagel rechter grote teen
3	1 ^e molaar links boven	teennagel rechter grote teen
4	hoektand, rechts boven	teennagel rechter grote teen
5	1 ^e premolaar, links boven	teennagel linker grote teen
6	hoektand links boven	teennagel linker grote teen
7	2 ^e molaar links boven	teennagel linker grote teen

De geïncludeerde personen bleken kwalitatief slechte gebitselementen te bezitten. De gebitselementen waren goed hanteerbaar en de procedure kon goed worden gevolgd. Door de variatie in grootte en type gebitselement varieerde de hoeveelheid beschikbaar onderzoeksmateriaal per element. De gebitselementen van casus 1 en 3 hadden meerdere tandwortels. De andere gebitselementen bezaten 1 of 2 aan elkaar vastzittende tandwortels. Hierdoor moest per gebitselement afgewogen worden hoe het verdeeld moest worden. In casus 4 was de hoeveelheid tandwortel te klein om alle onderzoeken uit te kunnen voeren en is een keuze gemaakt om alleen toxicologisch onderzoek en een leeftijdsschatting op basis van TCA uit te voeren. In casus 1 was de teennagel deels gelakt met rode nagellak. Dit is niet nadelig gebleken voor de uitvoering van de analyses of er kon, zoals bij ¹⁴C datering, worden gewerkt met een ongelakt deel van de nagel.

Op de verschillende deelmonsters van de gebitselementen werden, op casus 4 na, isotopenonderzoek, ¹⁴C datering, DNA-onderzoek, leeftijdsonderzoek en toxicologisch onderzoek uitgevoerd. Bij casus 4 was te weinig wortelmateriaal beschikbaar voor ¹⁴C datering. Op alle deelmonsters van de nagels werd ¹⁴C datering, DNA-onderzoek en toxicologisch onderzoek uitgevoerd. Het isotopen onderzoek kon door technische redenen niet uitgevoerd worden en worden op een later tijdstip uitgevoerd, de resultaten worden het wetenschappelijk artikel meegenomen. In totaal zijn er 34 onderzoeken ingezet op de gebitselementen en 21 onderzoeken ingezet op de teennagels. 26 van de 34 (76%) van uitgevoerde onderzoeken in het gebitselement gaf geldig resultaat. 21 van de 21 (100%) van de onderzoeken in de teennagel was succesvol. Hieronder zal specifiek worden ingegaan op de resultaten van de verschillende type onderzoeken.

3.1. DNA-onderzoek

Met het DNA-onderzoek werd in drie van de zeven gevallen (43%) uit de pulpa-poeder een volledig of partieel forensisch DNA profiel verkregen. Het geslacht in deze gevallen worden bepaald. In vier gevallen was de DNA-concentratie dusdanig laag en dat er geen profiel kon worden opgemaakt. De nagels leverden in alle gevallen een volledig DNA-profiel. In tabel 2 worden de resultaten van het DNA-onderzoek in bloed, pulpa-poeder en nageldeel weergegeven. In tabel 3 is weergegeven of de gevonden DNA-profielen overeenkomen met die van het bloed op de FTA[®]-kaarten.

Tabel 2: Resultaten DNA onderzoek in bloed, gebitselementen en nagel

Casus	Matrix	gewicht poeder (mg)	Concentratie (ng/μl) totaal DNA	mannelijk DNA	Resultaat Profiel	Geslacht
1	bloed 1 ^e molaar teennagel rechts	46 115	4,83 0,448 11,61	nd nd nd	volledig volledig volledig	vrouw vrouw vrouw
2	bloed 1 ^e premolaar teennagel rechts	10 65	2,04 <0,001 1,72	0,947 nd 0,911	volledig geen volledig	man - man
3	bloed 1 ^e molaar teennagel rechts	2 86	7,17 <0,001 9,45	3,81 nd 4,57	volledig geen volledig	man - man
4	bloed hoektand teennagel rechts	47 50	0,21 <0,001 16,75	0,156 nd 8,79	volledig geen volledig	man - man
5	bloed 1 ^e premolaar teennagel links	10 29	2,53 <0,001 6,72	2,33 nd 4,53	volledig geen volledig	man - man
6	bloed hoektand teennagel links	15 10	6,31 0,363 2,12	nd nd nd	volledig volledig volledig	vrouw - vrouw
7	bloed 2 ^e molaar teennagel links	3 43	0,994 0,009 7,99	1,08 0,005 4,44	volledig gedeeltelijk volledig	man man man

nd= niet gedetecteerd

Tabel 3: Overeenstemming van verkregen DNA-profielen met bloedspot op FTA-kaart

Casus	pulpa poeder	teennagel
1	✓	✓
2	nd	✓
3	nd	✓
4	nd	✓
5	nd	✓
6	✓	✓
7	✓	✓

nd= niet gedetecteerd, ✓ = DNA match met bloed.

3.2. Leeftijdsschatting

In coupes van vier van de zeven tandwortels konden cementlijnen worden geteld (57%) en heeft er een schatting van de minimumleeftijd in jaren kunnen plaatsvinden.

De zichtbaarheid van de cementlijnen in de drie van de gebitselementen was in meerdere coupes slecht en niet telbaar. Dit leverde daarom geen resultaten op. Door de mediane leeftijd waarop drie kwart van de tandwortel is gevormd[7] bij de getelde lijnen op te tellen, kan de minimum aantal geleefde jaren worden geschat. In tabel 4 worden de resultaten van de leeftijd schatting weergegeven. De casus 1,2,5 en 7 zijn respectievelijk geschat op ouder dan 46, 59, 54 en 57 jaar.

Tabel 4: Type gebitselement, getelde cementlijnen en berekende minimum leeftijd

casus	type gebitselement	Aantal getelde lijnen	R ¾	Geschatte minimum leeftijd in jaren
1	1 ^e molaar, links boven	38/40	7,5	46
2	1 ^e premolaar, links boven	47	11,5	59
3	1 ^e molaar links boven	-	7,5	-
4	hoektand, rechts boven	-	11,5	-
5	1 ^e premolaar, links boven	43	11,5	54
6	hoektand links boven	-	11,5	-
7	2 ^e molaar links boven	44/42	12,5	57

R ¾ = mediane leeftijd in jaren waarop ¾ van de wortel is gevormd

- = geen telling mogelijk

3.3. Isotopenonderzoek

De resultaten van het isotopenonderzoek staan in tabel 5. Op het moment van schrijven waren nog niet alle data beschikbaar. Het zuurstof- en koolstofisotopenonderzoek is enkel op het tandglazuur uitgevoerd. De resultaten van de Sr-Pb analyses op de nagels laten door technische redenen nog even op zich wachten en zullen later in het wetenschappelijk artikel mee worden genomen. De hoeveelheid beschikbaar materiaal van teennagels was beperkt en de concentratie Sr-Pb over het algemeen relatief laag. Door defecten van de ICP-MS om de element concentraties te meten, alsmede van de MC-ICP-MS die gebruikt wordt voor het bepalen van de loodisotopensamenstelling, is ervoor gekozen het zekere voor het onzekere te nemen en te wachten tot beide machines weer optimale resultaten geven. Zodra de Sr-Pb concentraties van de teennagels bekend is, zal een monster genomen worden voor het strontiumisotopenonderzoek. Door exact te weten hoeveel Sr-Pb in de nagels aanwezig is, kunnen zowel het laboratoriumwerk als de analyses aangepast worden om de slagingskans zo hoog mogelijk te laten zijn.

Tabel 5: Resultaten isotopen onderzoek

Casus	Sample	Gemiddelde triplicaten				⁸⁷ Sr/ ⁸⁶ Sr	2SE	²⁰⁶ Pb/ ²⁰⁴ Pb	SE	²⁰⁷ Pb/ ²⁰⁴ Pb	SE	²⁰⁸ Pb/ ²⁰⁴ Pb	SE
		δ ¹³ C	SD	δ ¹⁸ O	SD								
1	nagel	-	-	-	-								
	tand	-13.7	0.1	-5.3	0.2	0.70918	0.00001	18.003	0.001	15.587	0.001	37.903	0.001
3	nagel	-	-	-	-								
	tand	-12.9	0.1	-5.1	0.1	0.70916	0.00001	18.014	0.001	15.594	0.001	37.965	0.001
4	nagel	-	-	-	-								
	tand	-13.3	0.1	-6.4	0.1	0.70927	0.00001	17.996	0.004	15.590	0.003	37.920	0.008
6	nagel	-	-	-	-								
	tand	-13.9	0.1	-5.8	0.1	0.70886	0.00001	18.035	0.004	15.602	0.003	37.993	0.008
7	nagel	-	-	-	-								
	tand	-15.2	0.1	-6.6	0.1	0.70900	0.00001	17.957	0.003	15.590	0.003	37.888	0.007
8	nagel	-	-	-	-								
	tand	-13.3	0.0	-5.0	0.1	0.70912	0.00001	17.963	0.003	15.592	0.003	37.906	0.007
9	nagel	-	-	-	-								
	tand	-13.7	0.1	-5.6	0.1	0.70947	0.00001	18.121	0.003	15.620	0.003	38.116	0.007

Vervolg tabel 5: Resultaten isotopen onderzoek

Casus	Sample	$^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	SE	$^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	SE	$^{204}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	$^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$
1	nagel						
	tand	0.86582	0.00001	2.10538	0.00003	1.155	2.432
3	nagel						
	tand	0.86569	0.00001	2.10753	0.00003	1.155	2.435
4	nagel						
	tand	0.86630	0.00003	2.10719	0.00007	1.154	2.432
6	nagel						
	tand	0.86509	0.00003	2.10661	0.00009	1.156	2.435
7	nagel						
	tand	0.86819	0.00003	2.10994	0.00008	1.152	2.430
8	nagel						
	tand	0.86803	0.00003	2.11021	0.00008	1.152	2.431
9	nagel						
	Tand	0.86197	0.00003	2.10339	0.00007	1.160	2.440

3.4. ^{14}C datering

Het ^{14}C dateringsonderzoek van het collageen van de tandwortel leverde in vijf van de zes gevallen (83%) een geldig meetresultaat op. Casus 4 kon niet op ^{14}C in het wortelmateriaal onderzocht worden, doordat er te weinig materiaal beschikbaar was om te verdelen over alle verschillende disciplines in het onderzoek. Van de zes in bewerking genomen wortelmonsters, konden er vijf gemeten worden op ^{14}C . Het ingestuurde materiaal van casus 3 gaf te weinig collageen voor een betrouwbare meting en is daarom niet uitgevoerd. Het deelmonster van casus 2 was ook erg klein (50 mg) en leverde daardoor te weinig collageen op die nodig is voor een reguliere AMS-meting (meting als grafiet en met minimale meetfout). Het verkregen collageemonster van casus 2 is verbrand tot CO_2 met een Elemental Analyzer en daarna direct als CO_2 met de AMS gemeten en dus niet als grafiet zoals de andere monsters. Door de zeer kleine hoeveelheid koolstof die bij dit type CO_2 meting wordt gemeten, is de meetfout erg groot. Dit geeft een grote spreiding in de tijdsperiode die wordt bepaald uit de gemeten hoeveelheid ^{14}C en dit beïnvloedt de nauwkeurigheid van het resultaat. De opbrengst van collageen van het deelmonster van casus 3 was ook erg klein en dit monster is daarom in een speciale batch voor zeer kleine grafietmonsters gemeten. Dit type monsters heeft een iets grotere meetfout dan monsters van reguliere grootte (voor AMS-meting). Alle zeven ^{14}C dateringsonderzoeken van de teennagels gaven een geldig resultaat.

In tabel 6 is een overzicht gegeven van de resultaten van het ^{14}C dateringsonderzoek. De tabel geeft de tijdsperiodes weer, waarmee de gemeten ^{14}C hoeveelheid met 95% waarschijnlijkheid overeenkomt bij vergelijking met de ^{14}C kalibratiecurve 'IntCal20' [16] voor de periode voorafgaand aan 1955 AD en kalibratiecurve 'Bomb NH1' [17] voor de periode tussen 1955 en 2020. Voor de tijdperiode van 2020 en 2021 is gebruik gemaakt van atmosferische $^{14}\text{CO}_2$ waarden die zijn gemeten door de Rijksuniversiteit Groningen (Centrum voor Isotopen Onderzoek) bij monitoringstation 'Lutjewad' in Nederland. Doordat de relatieve hoeveelheid ^{14}C in de atmosfeer vanaf de jaren 1950 tot 1963 sterk toenam (door bovengrondse nucleaire bomproeven) en daarna weer afnam tot op dit moment het niveau van rond 1950, kunnen ^{14}C meetresultaten zowel overeenkomen met de huidige tijdsperiode (>2019) als met de tijdperiode voor 1955. Dit maakt een eenduidige datering (d.w.z. het kunnen toewijzen van 1 tijdperiode, met een zo minimaal mogelijk aantal jaren) op basis van alleen de ^{14}C datering in die gevallen dan niet goed mogelijk. In dit onderzoek werd alleen voor de nagelmonsters van casus 1 en 5 een eenduidige tijdperiode verkregen, namelijk 2019 – 2022. De overige onderzochte monsters hadden allemaal 2 mogelijke tijdsperiodes (bij interpretatie op basis van alleen het ^{14}C meetresultaat en geen overige tijdsindicatoren/context).

De resultaten van ^{14}C -metingen in teennagel leverden voor casus 3 en 7 een eenduidige tijdsperiode op, namelijk de tijdsperiode tussen 2019 en 2022. Voor alle overige monsters, tandwortel en nagel, waren er twee verschillende tijdsperiodes waarmee de hoeveelheid ^{14}C overeenkomt. Dat komt door het ^{14}C verloop in de atmosfeer door de tijd heen, variabel is geweest in de afgelopen eeuwen, maar name in de afgelopen 70 jaar (verschillende oorzaken). De ^{14}C waarden uit de huidige tijdsperiode (rond 2020) overeenkomen met die uit de jaren 50 van de vorige eeuw.

Tabel 6: ^{14}C hoeveelheid (uitgedrukt als % relatief t.o.v. gestandaardiseerd referentiemateriaal) in het collageen tandwortels en nagels en overeenkomende tijdsperiodes.

Casus	Materiaal	F ^{14}C (%)	\pm (1-sigma)	overeenkomende tijdsperiode(n); 95% waarschijnlijkheid	
1	tandwortel	1.0343	0.0026	1955–1956	2011–2014
	teennagel	1.0092	0.0026		2019–2022
2	tandwortel	0.9812	0.0126	1521–1587 1955	1621–1955
	teennagel	1.0175	0.0029		2015–2019
3	tandwortel	1.1683	0.0038	1958 -1959 1954–1955	1988 - 1990
	teennagel	1.0088	0.0024		2018–2022
4	tandwortel	niet uitgevoerd	0.0026	1954–1955	2020–2022
	teennagel	1.0024			
5	tandwortel	0.9949	0.0026	1698–1910	1953–1955
	teennagel	1.0092	0.0026		2019–2022
6	tandwortel	1.0043	0.0027	1954–1955 1954–1955	2018–2022
	teennagel	1.002	0.0027		2020–2022
7	tandwortel	niet uitgevoerd	0.0026	1954–1955	2020–2022
	teennagel	1.003			

3.5. Toxicologisch onderzoek

Het toxicologische onderzoek gaf zowel in een tandworteldeel als in een nageldeel geldige resultaten. De meeste stoffen werden teruggevonden in de nagel. De resultaten van het kwalitatieve toxicologisch onderzoek zijn weergegeven in tabel 7. Bij een positieve identificatie (+) is de stof teruggevonden bij beide chromatografische methoden. Bij een indicatie (+/-), is de stof gevonden bij slechts één chromatografische methode en is er meer onzekerheid over de aanwezigheid en identiteit van de stof. In de tandwortel werd de identiteit van de stof minder vaak vastgesteld als in de nagel, omdat de hoeveelheid geëxtraheerde geneesmiddel of drug laag was in de tandwortel en dichtert tegen de bepalingsgrens van de methode zat.

Tabel 7: Resultaten toxicologisch onderzoek

Casus	Stoffen	Resultaat teennagel	Resultaat tandwortel
1	cafeïne	+	+
	fentanyl	+	+/-
	morfine	+	+
	paracetamol	+	+/-
	midazolam	+	+
	oxazepam	+	
	metoclopramide	+	
	propofol- β -glucuronide	+/-	
	tramadol	+	
	O-desmethyltramadol	+	
	zolpidem	+	
	theofylline	+	
	piracetam		+/-
	pregabalin		+/-
2	cafeïne	+/-	
	efedrine	+	
	MDA	+	
	MDMA	+/-	
	theobromine	+/-	
3	cafeïne	+	
	cotinine	+/-	+
	3-OH-cotinine	+/-	
	lidocaïne	+	+
	desethylidocaïne	+	
	rocuronium	+	+
	paracetamol	+	
	bisoprolol	+	
	hydrochloorthiazide	+	
	theobromine	+/-	

+ = geïdentificeerd, +/- = aanwijzing, identiteit niet met zekerheid vastgesteld.

Casus	Stoffen	Resultaat teennagel	Resultaat tandwortel
4	cafeïne	+	
	rocuronium	+	+
	paracetamol	+	+/-
	pregabalin	+	
5	cafeïne	+	
	amlodipine	+	
	losartan	+	
6	cafeïne	+	+/-
	paracetamol	+	+
7	cafeïne	+	
	metoclopramide	+	+
	pentobarbital	+	+
	temazepam	+	+
	paracetamol	+	+
	paroxetine	+	+
	morfine	+	
	efedrine	+/-	
	theobromine	+/-	

3.6. Het donor-profiel

Per casus kan, op basis van de resultaten van de uitgevoerde onderzoeken, een profiel worden opgemaakt over de donor. In tabel 8 staan de verkregen profielen. Tot zover werd in vijf van de zeven gevallen (71 %) gevallen een volledig profiel verkregen en twee van de zeven (28%) een partieel profiel.

Om het geboortjaar te kunnen inschatten op basis van het ^{14}C dateringsresultaat, moet rekening gehouden worden met de periode waarin de tandwortel van een gebitselement wordt gevormd. De tandwortels worden aangemaakt nadat de kronen van de volwassen gebitselementen zijn gevormd. Bij het groeien van de tandwortel zal het gebitselement doorbreken en zal daarna verder groeien tot de wortel compleet is, dit is afhankelijk van het type gebitselement en het geslacht.[7] Door de ^{14}C -datering van het collageen in de tandwortel op te tellen bij de leeftijd waarop de tandwortel compleet is gevormd kan het geboortjaar worden geschat. De leeftijd waarop de tandwortel compleet is gevormd is bepaald met de London Atlas.[7] De mediane leeftijden waarop de tandwortel compleet is gevormd zijn voor 1^e molaar, 1^e premolaar, 2^e molaar en hoektand uit de bovenkaak, respectievelijk 8,5 jaar, 12,5 jaar, 14,5 jaar en 12,5 jaar.

In de gevallen waarbij zowel een gebitselement als een nagel zijn gedateerd kan, indien er sprake is van meerdere mogelijke overeenkomstige tijdspannen (tabel 4), een van de tijdspannen worden uitgesloten, omdat de nagel van een overleden volwassene niet uit een eerdere tijdspanne dan het in de kindertijd gevormde wortelmateriaal kan komen.

Tabel 8: Verkregen profiel van donoren

Casus	Geboortjaar	Sterfte jaar	Leeftijd	DNA	Geslacht	Regio van jeugd	Geneesmiddel-blootstelling
1	1946-1948	2019–2022	71-76	match ¹	vrouw ¹	Compatibel met Nederland	cafeïne, fentanyl, morfine, paracetamol, midazolam, oxazepam, metoclopramide, propofol, tramadol, zolpidem, piracetam, pregabalin
2	1608-1943	2015–2019	ouder dan 72	match ²	man ²	Compatibel met Nederland	cafeïne ³ , efedrine, MDMA ³
3	1958 -1959 of 1988 - 1990	2018–2022	59-64 28-34	match ²	man ²	Compatibel met Nederland	cafeïne, nicotine, lidocaïne, rocuronium, paracetamol, bisoprolol, hydrochloorthiazide
4	x	1954–1955 of 2020–2022	x	match ²	man ²	Compatibel met Nederland	cafeïne, paracetamol, rocuronium, pregabalin
5	1940-1943	2019–2022	76-82	match ²	man ²	Compatibel met Nederland	cafeïne, amlodipine, losartan
6	1941-1943	2020–2022	77-81	match ¹	vrouw ¹	Compatibel met Nederland	cafeïne, paracetamol
7	x	1954–1955 of 2020–2022	ouder dan 57	match ¹	man ¹	Compatibel met Nederland	cafeïne, metoclopramide, pentobarbital, temazepam, paracetamol, paroxetine, morfine, efedrine

¹ op basis van DNA-profiel van gebitslement en nagel; ² op basis van DNA-profiel van nagel ³ Indicatie voor aanwezigheid van stof

3.7. Vergelijking met medische informatie

Uit de beschikbare medische gegevens is tot zover mogelijk het geboortjaar, sterftejaar, leeftijd, geslacht, regio van overlijden en het geneesmiddel gebruik van de donor verzameld. De beschikbare medische informatie was beperkt, waardoor overzicht van toegediende en/of ingenomen geneesmiddelen vlak voor het overlijden en de geboorteplaats ontbrak.

De gegevens in het opgestelde profiel werd met de beschikbare informatie vergeleken. De mogelijke uitkomsten zijn: overeenkomst, geen overeenkomst of geen vergelijking mogelijk. De verzamelde informatie over de donor en de vergelijking met het opgestelde profiel staan in tabel 9.

Tabel 9: Informatie over donor en de overeenstemming met profiel

Casus	Geboorte jaar		Sterfte jaar		Leeftijd	Geslacht		Regio van overlijden	Geneesmiddelgebruik	
1	1944	x	2022	✓	77	vrouw	✓	noord Nederland	onbekend	~
2	1932	✓	2021	x	89	man	✓	onbekend	onbekend	~
3	1949	x	2021	✓	72	man	✓	oost Nederland	onbekend	~
4	1937	~	2022	✓	84	man	✓	noord Nederland	onbekend	~
5	1940	✓	2022	✓	82	man	✓	noord Nederland	geen	✓
6	1933	x	2021	✓	88	vrouw	✓	noord Nederland	morfine, paracetamol	x/v
7	1954	~	2021	✓	67	man	✓	noord Nederland	paroxetine	✓

✓ = komt overeen met profiel

x= komt niet overeen

~= geen vergelijking mogelijk

Op 18 van de 22 punten (82%) waarmee vergeleken kon worden past het profiel bij de informatie over de donor. In zes gevallen was een vergelijking niet mogelijk, omdat er informatie niet aanwezig was of omdat er geen geldig resultaat was verkregen. Het geslacht kwam in alle gevallen overeen en in het sterftejaar kwam in zes van de zeven gevallen overeen met de werkelijk sterftejaar. Het geschatte geboortejaar kwam in twee gevallen overeen met het werkelijke geboortejaar. Echter, de geschatte periode in casus 2 was erg breed. In drie gevallen was het geboortejaar recenter ingeschat dan het werkelijke geboortejaar. Hierdoor waren de geschatte leeftijden ook lager dan de werkelijke leeftijd van de donoren. Er is sprake van een eenzijdige onderschatting van het geboortejaar. Om dubbele tellingen te voorkomen is de leeftijd niet meegenomen met de vergelijking, omdat dit het verschil is van het geschatte sterfte en geboortejaar, die al vergeleken zijn. De resultaten van het isotopenonderzoek konden niet worden geverifieerd met de regio van herkomst, omdat het niet bekend was waar de donoren zijn opgegroeid. De resultaten van het toxicologisch onderzoek waren in drie gevallen, waarvan informatie beschikbaar was, niet tegenstrijdig met de verkregen informatie.

4. Discussie

76 % van de uitgevoerde onderzoeken op het gebitselement gaf een geldig resultaat tegenover 100% in teennagel. Het lager aantal succesvolle onderzoeken in de gebitselementen kan verschillende oorzaken hebben: de hoeveelheid onderzoeksmateriaal, de aard van het onderzoeksmateriaal en de gevoeligheid van gebruikte methode. De groep donoren was een relatieve oude populatie en de onderzochte gebitselementen waren van slechte kwaliteit. De hoge leeftijd kan van invloed zijn op het onderzoek in het gebitselement. Het ouder worden heeft effect op de samenstelling van het gebitselement. De pulpa en wortelkanalen nemen af in grootte door depositie van secundaire dentine in het wortelkanaal.[18] De afname van het volume van de pulpa holte gedurende het leven kan invloed hebben op de hoeveelheid DNA in de pulpa en de depositie van secundaire dentine kan mogelijk interfereren met de ^{14}C datering. Verder worden gebitselement gedurende het leven blootgesteld aan stress, trauma en infecties die de tandwortel en enamel kunnen slijten en/of beschadigen. Dit beïnvloedt de beoordeling van de TCA-lijnen ten behoeve van de leeftijd schatting.

De bewaarcondities van het stoffelijk overschot en het postmortaal interval verschilden tussen donoren. De invloed van deze factoren op de resultaten van het onderzoek kon niet worden bepaald.

In dit geval is de diversiteit aan condities en het gebitselement een 'worst-case' scenario. De forensisch populatie is gemiddeld jonger en heeft gemiddeld een beter gebit, waardoor de onderzoeken kansrijker zullen zijn dan uit dit onderzoek is gekomen. Bij een personen met een geboortejaar na 1950 is de ^{14}C datering van de tandwortels naar verwachting nauwkeuriger, kunnen de TCA-lijnen beter bepaald worden en bevat de pulpa mogelijk meer DNA.

DNA-onderzoek

Segmentatie van de nagel bleek geen invloed te hebben op het verkrijgen van een valide DNA-profiel. In alle gevallen werd een volledig profiel verkregen. Het gebitselement daarentegen gaf in 43% een volledig of partieel profiel. De gemeten DNA-concentratie was laag en er was geen duidelijk verband waarneembaar met de hoeveelheid verzameld poeder of type gebitselement. De lage DNA-concentraties kunnen reeds voor de extractie van het gebitselement hebben bestaan, door bijvoorbeeld afname van de pulpa holte[18], maar kan ook het gevolg zijn dat de DNA postmortaal of na elementextractie gedeelte is gedegradеerd door bijvoorbeeld hitte vorming door het boren.

Afbraak van DNA tijdens opslag na extractie van het gebitselement tijdens opslag kan niet worden uitgesloten en kan theoretisch hebben bijgedragen aan een lagere DNA opbrengst. In de literatuur zijn minimale invasieve DNA-extractiewijzen vermeld.[19, 20] Hierbij wordt via de tandwortel toegang verschaft met een endodontische vijl naar de pulpa. Door deze wijze van toegang wordt de tandwortel van binnen beschadigd en kan dit invloed hebben op de overige onderzoeken op de tandwortel. Bovendien is deze methode tijdsintensief. Tilotta et al. segmenteerde de geheel tand in de lengte om de pulpa te bereiken. [21] In het geval dat er een tandwortel aanwezig is, wordt deze ook in de lengte gesegmenteerd, wat de vervolg onderzoeken kan beïnvloeden. Door pulpa uit te boren bij een laag toerental, zoals in dit onderzoek, blijft het tandglazuur en wortels nog intact voor alle onderzoek. Een mogelijke afwijking van de monstervoorbewerking is een afweging die per casus gemaakt moet worden naargelang de behoefte aan de verschillende onderzoeken. Normaliter wordt voor DNA-onderzoek een gehele tand cryogeen vermalen[22]. Dit levert een fijn poeder op in tegenstelling tot het poeder na het boren van de pulpa holte dat grovere deeltjes bevat. Dit kan invloed hebben op de DNA extractie uit het poeder. Om zoveel mogelijk DNA te kunnen verzamelen dient de pulpa zo ruim mogelijk te bemonsterd te worden. Het is aanbevelingswaardig om vervolgonderzoek uit te voeren naar de invloed van leeftijd op de DNA-concentraties in het gebitselement en naar de postmortale stabiliteit van DNA in het gebitselement. Hiermee kan per casus beter inzicht worden verkregen naar de kansrijkheid van het onderzoek.

Leeftijdsschatting

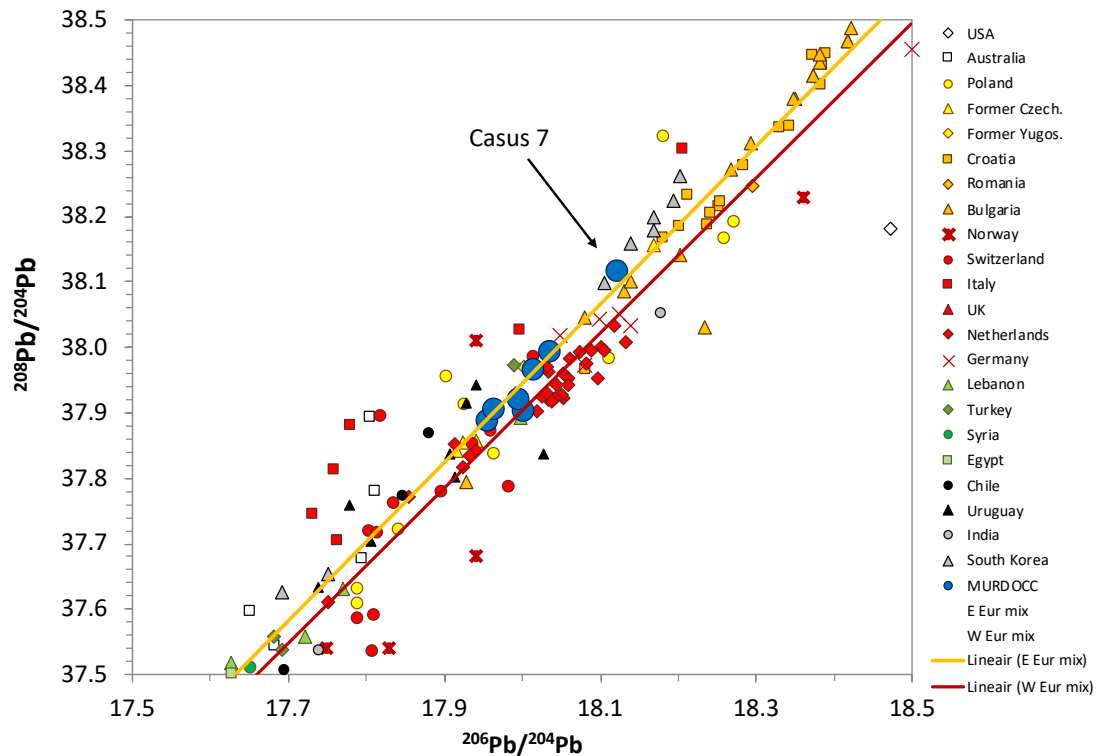
In vier van de zeven gevallen konden cementlijnen worden geteld (57%) en heeft er een schatting van de minimum leeftijd in jaren kunnen plaatsvinden. Leeftijdsschatting op basis van TCA-lijntellingen is vooral toepasbaar op personen die jonger zijn dan 50 jaar. De TCA-lijn die gevormd worden op leeftijden vanaf 50 jaar zijn niet goed zichtbaar, waardoor die tellingen verloren gaan. Het is opvallend dat in gevallen 3 en 4 niet geschikt waren vooral zowel leeftijdsschatting als de ^{14}C -datering. Dit kan mogelijk ook het gevolg zijn van de ouderdom van de gebitselementen, zoals slijtage en trauma.

In deze oude populatie is een leeftijdsschatting op basis van TCA-lijnen daarom beperkt bruikbaar. De leeftijdsschatting kan dan beter plaats vinden op basis van ^{14}C datering van het gebitselement en de nagel. In een populatie die jonger is heeft de leeftijdsschatting met de TCA-methode wel zijn waarde.

Isotopenonderzoek

Bij de gebitselementen bleek het minimaal bemonsteren van het glazuur (circa 30 mg) geen problemen op te leveren voor het Sr-Pb-O-C isotopenonderzoek. Alle verkregen data zijn goed van kwaliteit (100%). De $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ van alle gebitselementen zijn compatibel met de verwachte $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ van een Nederlands individu [15]. Datzelfde geldt voor de gebitselementen waarvan de O-C isotopensamenstelling bekend is; ook deze data zijn compatibel met het "Nederlandse" signaal (Ammer et al., in prep). Of de donoren ook daadwerkelijk (een deel van) de jeugd in Nederland hebben doorgebracht is echter niet bekend. De resultaten van het loodisotopenonderzoek zijn uitdagender om te interpreteren. De grootte van de moderne referentiedataset die voor forensisch onderzoek gebruikt wordt is beperkt. De Pb isotopendata van casussen 1 tot en met 6 zijn min of meer vergelijkbaar (zie afbeelding 1). In de data van casus 7 daarentegen zitten opvallende, afwijkende ratio's. Of dit te maken heeft met de locatie waar de man tussen het 4^e en 9^e levensjaar gewoond heeft, of dat deze data een indicatie zijn dat er in de Nederlandse populatie een aanzienlijke variatie in Pb isotopensamenstelling zit is (nog) niet bekend.

Zodra de Sr-Pb isotopendata van de teennagels aanwezig zijn, zal ook gekeken worden naar het eventuele (nadelige) effect van medicatie op de Sr-Pb isotopensamenstelling van de nagels. Indien een nagel door zeer afwijkende ratio's gekenmerkt wordt, zonder dat de donor de laatste maanden van het leven in het buitenland heeft doorgebracht, zal dat mogelijk veroorzaakt kunnen worden door medicatie. Uit eerder experimenteel onderzoek blijkt dat er mogelijk een causaal verband tussen medicatie en zeer afwijkende Sr-Pb signatures kan bestaan (ongepubliceerde data, Kootker). De afwezigheid van de nagel Sr-Pb data heeft deels te maken met de kleine monstergroottes. Achteraf blijkt voor de ^{14}C datering aanzienlijk minder materiaal nodig is, waardoor het monster voor het isotopenonderzoek groter had kunnen zijn.



Afbeelding 1. $^{206}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$ vs $^{208}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$ data van moderne mensen uit verschillende delen van de wereld (data: Vrije Universiteit Amsterdam). De ratio's van casus 7 wijken af van de overige Nederlandse datapunten.

^{14}C datering

Bij het ^{14}C -dateringsonderzoek gaven de nagels in alle gevallen een resultaat. Er was meer dan voldoende materiaal van goede kwaliteit beschikbaar. Er kan voor het onderzoek ook minder materiaal worden ingestuurd dan nu was gedaan. 15 mg materiaal, mits vrij van nagellak, is voldoende. In het geval er geen nagelmateriaal beschikbaar is voor het bepalen van de tijdsperiode van overlijden en er wel botmateriaal beschikbaar is, dan kan dit botmateriaal als alternatief worden gedateerd voor het schatten van de tijdsperiode van overlijden.

Bij het onderzoek van het collageen uit de tandwortels werd in vijf van de zes gevallen (83%) een meetresultaat verkregen. Hierbij was in een geval de hoeveelheid collageen en dus ook de hoeveelheid te meten koolstof, dusdanig klein dat dit een grotere meetonzekerheid in het eindresultaat gaf. Doorgaans wordt, door het betreffende ^{14}C lab uit het onderzoek, voor bot en dentinemateriaal aangegeven dat er minimaal 160 mg materiaal beschikbaar moet zijn, om genoeg collageen materiaal te verkrijgen voor minimaal 1 analyse van 5,5 mg collageen. In dit onderzoek viel er één wortelmonster al af voor ^{14}C datering, omdat er niet voldoende materiaal voor alle onderzoeken beschikbaar was. Daarnaast waren van de zes ingestuurde monsters, er vier kleiner dan 160 mg. En al deze vier monsters gaven uiteindelijk zowel absoluut als ook relatief een lage

collageen opbrengst. Dat hoeft niet direct gerelateerd te zijn aan de kwaliteit van het dentinemateriaal zelf, maar heeft ook te maken met absolute massaverliezen bij het voorbehandelen van zeer kleine monsterhoeveelheden. Naar aanleiding van dit onderzoek zal in het betreffende ^{14}C lab ingezet worden op aanpassingen in de chemische preparatiemethode om verliezen aan collageen verder te minimaliseren en voor forensisch onderzoek met zeer kleine dentinemonsters een zo groot mogelijke absolute collageenopbrengst te krijgen.

De hoeveelheid beschikbaar tandwortel blijkt dus cruciaal voor het ^{14}C onderzoek. Voor het onderzoeken van het geboortjaar van een individu, zou echter eventueel ook het kroonmateriaal van een gebitselement (de enamel) kunnen worden gemeten op ^{14}C [5]. Het dateren van het collageen uit de wortel heeft de voorkeur, omdat de hoeveelheid koolstof daarin relatief groter is (nauwkeuriger meting mogelijk), de herkomst eenduidiger (koolstof vastgelegd in de wortel tijdens vorming) en de tijdsperiode van de vorming van de wortel redelijk ingeschat kan worden. Dit is voor de enamel minder het geval.

Wat uit dit onderzoek verder naar voren is gekomen, is dat materialen uit de tijdsperiode tussen 1950 en nu (2022) niet altijd eenduidig zijn te dateren, omdat de gemeten ^{14}C hoeveelheid in het monster overeenkomt met een tijdsperiode voor 1963 en een tijdsperiode na 1963 (de piek van ^{14}C in de atmosfeer in de afgelopen eeuw). Voor die materialen heb je dan meer bevindingen nodig om te achterhalen welke tijdsperiode het meest waarschijnlijke is voor het betreffende individu voor wat betreft geboortjaar en sterfjaar. Het helpt wanneer er meerdere metingen gedaan kunnen worden op bijvoorbeeld dentine en nagels (en/of bot). In dat geval is bekend dat de nagels informatie geven over de tijdsperiode van overlijden en de dentine iets prijsgeeft over de tijdsperiode waarin iemand jong was en dat de tijdsperiode van de nagels van een volwassen persoon nooit van een eerdere tijdsperiode kunnen zijn dan die van de wortels.

Daar waar een keuze tussen twee geschatte tijdperioden niet mogelijk is, zullen andere bevindingen in het politieonderzoek of ander analytisch forensisch onderzoek informatie moeten geven over welke tijdsperiode het meest waarschijnlijk is.

In dit onderzoek is bij het bepalen van de tijdsperiode van geboorte en sterven op basis van de ^{14}C dateringsresultaten, niet direct rekening gehouden met verschillen tussen het jaar van opname van ^{14}C door de betreffende mens via voedsel en de leeftijd van dit voedsel (d.w.z. het oorspronkelijke jaar van fotosynthese van $^{14}\text{CO}_2$ uit de atmosfeer in planten en daarna in dierlijk voedsel). Ook is er (nog) geen rekening gehouden met de tijdsperiode van koolstofopname in de tandwortel (die enkele jaren groeit) of in de nagel, die, afhankelijk van de locatie van nagelbemonstering en de grootte van de nagel, tot een jaar oud zou kunnen zijn. We hebben voor nagelmateriaal ingeschat dat de effecten van voedsel en de groei-‘leeftijd’ op de ^{14}C hoeveelheid, doorgaans binnen de meetspreiding die we hanteren, zullen vallen. Voor wortelmateriaal hebben we dit nog niet nader uitgezocht. Mogelijk dat sommige afwijkingen in dit onderzoek van de op ^{14}C gebaseerde resultaten met de daadwerkelijke geboortejaren van de onderzochte individuen, ook te maken kunnen hebben met dit soort effecten. Dat zal nog nader onderzocht en geoptimaliseerd kunnen worden.

Toxicologisch onderzoek

Uit de teennagels en gebitselementen kon een profiel worden verkregen over mogelijke blootstellingen aan geneesmiddelen en/of drugs van de donor. De aanwezigheid van stoffen geeft informatie over een mogelijke medicamenteuze behandeling en daarmee ook informatie over mogelijke medische aandoeningen. Zo geeft de aanwezigheid van cafeïne en omzettingsproduct cotinine informatie over een blootstelling en mogelijke inname van cafeïne houdende dranken, zoals koffie en cola, en het roken.

De resultaten tussen de teennagel en gebitselementen verschillen, voornamelijk in het aantal verschillende gedetecteerde stoffen. Een gebitselement geeft informatie over blootstelling vlak voor

het overlijden, de tijdsperiode waarin een stof kan worden gedetecteerd ligt in een de tandwortel tussen de duur van aantoonbaarheid in haar en bloed in [9], dat wil zeggen tot dagen/weken voor het overlijden. De aanwezigheid van stoffen in de nagel geeft informatie, afhankelijk van nagelgroeisnelheid en de lengte van de nagel, over de periode tot maanden voor het overlijden.[23] Stoffen die in de nagel zijn aangetoond, maar niet in het gebitselement, kunnen mogelijk door dit verschil in detectietijd worden verklaard. Verder, kan door een vergelijking van de resultaten in de teennagel met de resultaten in het gebitselement een indruk worden verkregen van mogelijke periode waarin de donor is blootgesteld aan een stof. De donor kan weken/maanden voor het overlijden zijn blootgesteld aan een stof en dat deze niet meer in het gebitselement aantoonbaar is. Door de nagel overdwars te segmenteren, kan een betere indruk gekregen worden over de periode waarin er blootstelling is geweest aan een geneesmiddel of drug en dus beter onderscheid worden gemaakt tussen een blootstelling lange tijd voor het overlijden en de weken voor het overlijden.[24] Een andere verklaring voor een deel van verschillen in resultaat tussen het gebitselement en de nagel, is een aanwezigheid van lagere concentratie van stoffen in de tandwortel ten opzichte van de teennagel.

In casus 1 zijn in de teennagel verschillende (sterke) pijnstillers, zoals fentanyl, morfine, tramadol en een zijn omzettingsproduct O-desmethyltramadol en paracetamol teruggevonden. Verder zijn de benzodiazepine (achtigen) midazolam, oxazepam en zolpidem, een antibraakmiddel metoclopramide, een metaboliet van de anestheticum propofol (identiteit niet bevestigd) en tenslotte cafeïne en omzettingsproduct theofylline aangetoond. In de tandwortel is cafeïne, morfine en midazolam aangetoond en zijn aanwijzingen verkregen voor de aanwezigheid van fentanyl, paracetamol, piracetam (antiverigo-middel) en pregabaline (antiepilepticum/pijnstiller). Uit deze bevindingen kan worden afgeleid dat de donor vermoedelijk leed aan chronische pijn, omdat er pijnstillers zowel in de tand als in de nagel aanwezig zijn. De aanwezigheid van propofol- β -glucuronide duidt op een opname in het ziekenhuis waarbij anesthesie toegepast is. De combinatie van midazolam en opioïden wordt in Nederland gebruikt als palliatieve sedatie om comfort te geven. De combinatie van de aangetoonde geneesmiddelen kunnen dan ook passen bij een terminale ziekte.

In de tandwortel van casus 2 zijn geen geneesmiddelen aangetoond. In de nagel is daarentegen een aanwijzing verkregen voor MDMA (XTC), cafeïne en het omzettingsproduct theobromine en is een MDMA-metaboliet MDA en efedrine aangetoond. Efedrine is een stimulerende stof dat in ziekenhuizen, maar ook als drug wordt gebruikt. Omdat deze stoffen alleen in de teennagel zijn aangetroffen, is het suggestief voor blootstelling van deze stoffen in dagen tot maanden voor het overlijden. De mogelijke aanwezigheid van MDMA, wat niet is bevestigd met een andere methode, is opvallend. Het gebruik van MDMA op deze leeftijd is uitzonderlijk, een vals positief resultaat is ook niet uitgesloten.

In casus 3 is cafeïne aangetoond en zijn aanwijzingen verkregen voor de aanwezigheid van theobromine en cotinine, een metaboliet van nicotine. Dit wijst op (mee)roken en inname van cafeïne houdende middelen. In de nagel zijn, de β -blokker bisoprolol en het diureticum hydrochloorthiazide aangetoond, deze zijn niet in de tandwortel aangetroffen. Dit zijn middelen die worden voorgeschreven bij hart- en vaatziekten. Verder zijn in het gebitselement en de nagel de spierverslapper rocuronium, de lokaal verdovende stof lidocaïne en zijn metaboliet teruggevonden. Rocuronium is een geneesmiddel dat gebruikt wordt als spierverslapper bij operaties, op intensieve zorg afdelingen en bij euthanasie. De aanwezigheid van rocuronium en lidocaïne duidt op een ziekenhuisopname recent voor het overlijden. Wellicht is de behandeling met hydrochloorthiazide en bisoprolol tijdens ziekenhuisopname gestaakt of deze middelen bereiken de tandwortel bij leven minder goed, waardoor het niet meer in het gebitselement aantoonbaar was.

In de nagel van casus 4 zijn cafeïne, paracetamol en het anti-epilepticum pregabaline en rocuronium aangetoond. In het gebitselement is alleen rocuronium aangetoond en mogelijk paracetamol. Ook hier kan de aanwezigheid van rocuronium duiden op een ziekenhuisopname of euthanasie.

In casus 5 zijn alleen in de nagel de calcium antagonist amlodipine en de angiotensine II blokker losartan aangetoond; deze stoffen worden gebruikt bij de behandeling van een te hoge bloeddruk. Uit verkregen informatie is vermeld dat deze persoon geen geneesmiddelen gebruikte voor het overlijden, de bevindingen van het gebitselement passen hier goed bij. Het gebruik of een blootstelling van amlodipine en losartan in het verleden is niet vermeld in de verkregen informatie.

In casus 6 is alleen paracetamol of cafeïne terug gevonden. Deze donor zou morfine subcutaan toegediend hebben gekregen dit is niet teruggevonden in het gebitselement of de teennagel, dat kan mogelijk verklaard worden doordat de morfine dosering te laag was of incorporatie in het gebitselement en de teennagel niet goed was om het middel te detecteren. Paracetamol zou wel gebruikt zijn.

Bij casus 7 zijn verschillende geneesmiddelen zowel in de nagel als het gebitselement aangetoond, het antidepressivum paroxetine, de pijnstiller paracetamol, het antibraakmiddel metoclopramide, de benzodiazepine temazepam en het sedativum pentobarbital. Cafeïne is alleen in de nagel aangetoond. De aanwezigheid van metoclopramide duidt op maagklachten of is gebruikt als antibraakmiddel of prokineticum. Pentobarbital heeft verschillende indicaties maar wordt ook gebruikt bij euthanasie. Mogelijk is hier in dit geval sprake van geweest. Uit de verkregen informatie blijkt dat deze donor langdurig paroxetine gebruikt en de resultaten passen hier goed bij.

Het donor-profiel

Met de resultaten van de onderzoeken in de nagel en het gebitselement werd een profiel van de donor opgesteld, met daarin cruciale informatie dat gebruikt kan worden in het politie onderzoek, zoals een mogelijk geboortjaar, sterftejaar, leeftijd, geslacht, regio van jeugd en het geneesmiddelen en drugs gebruik. De resultaten over compatibiliteit met regio van overlijden zijn, zoals eerder benoemd, nog niet bekend.

De beschikbare medische informatie over de donoren was beperkt, waardoor gegevens over het middelengebruik en geboorteplaats niet volledig waren. Naast de medicatie historie is het gebruik van acute een eenmalig toegediende medicatie niet vermeld.

De schatting van het geboortjaar op basis van de ¹⁴C-datering is in vier van de vijf gevallen recenter dan het werkelijke geboortjaar. Deze eenzijdige onderschatting is opvallend en kan mogelijk verklaard worden door de hoge leeftijd van deze onderzoekspopulatie. Gebitselementen zijn aan veranderingen onderhevig gedurende het leven en zoals eerder genoemd zou een afzetting van secundair dentine van invloed kunnen zijn op de datering. Het minimale aantal getelde jaren klopt met de werkelijke leeftijden, echter kan de leeftijd niet precies worden vast gesteld door de ouderdom van de gebitselementen. Het is daarom ook aan te bevelen om onderzoek uit te voeren in gebitselementen van een jongere populatie en/of op een forensische populatie. Dan kan onderzocht wat de invloed is van leeftijd op de schattingen van het geboortjaar, leeftijdsschatting en de DNA-opbrengt.

5. Beperkingen

Dit onderzoek kent zijn beperkingen. De onderzochte populatie was een oude en zieke populatie met een slechte gebitsstatus. Dit heeft invloed gehad op de resultaten die zijn verkregen met gebitselementen. De forensische populatie van overleden personen is gemiddeld jonger en heeft een betere gebitsstatus. Binnen de onderzoekspopulatie was er ook variatie in het onderzoeksmateriaal en omstandigheden en sprake van een relatief kort postmortaal tijdsinterval. In de praktijk zal het postmortale tijdsinterval langer zijn. Deze factoren kunnen het aantal behaalde geldige resultaten hebben beïnvloed.

6. Aanbevelingen

Dit onderzoek toont aan dat de voorberekingsprocedure en verrichte analytische forensische onderzoeken toepasbaar zijn in de praktijk. De voorbereking en de onderzoeken kunnen op basis van opgedane ervaring per geval verder worden geoptimaliseerd door het maken van de optimale verdeling. De verdeling van hoeveelheid teennagel voor het isotopenonderzoek en ^{14}C datering kan geoptimaliseerd worden. Het is ook de moeite waard om te onderzoeken of de schatting van het geboortjaar ook op basis van de kroon (enamel) van een gebitselement kan worden gedateerd, in geval er onvoldoende geschikte dentinemateriaal beschikbaar is. De DNA-extractie methode kan eventueel aangepast worden om een hogere DNA opbrengst te bewerkstelligen. Het nageldeel kan overdwars gesegmenteerd worden om een beter inzicht te krijgen over het tijdsverloop van middelengebruik en de sterftejaar. Tenslotte is het aan te bevelen om onderzoek te verrichten naar de invloed van leeftijd en het postmortale tijdsinterval op de resultaten van de verrichte onderzoeken in gebitselementen en nagel.

7. Conclusie

Dit onderzoek toont aan dat het opwerkingsprotocol toepasbaar is om vijf verschillende typen onderzoek te verrichten op één enkel gebitselement en teennagel. De onderzoeken in de teennagel gaf in alle gevallen valide resultaten in tegenstelling tot het onderzoek in het gebitselement. Echter, het onderzoek in gebitselementen levert in 76% gevallen wel een valide resultaat op. In vijf gevallen kon een volledig profiel en twee gevallen een partieel profiel worden opgesteld. Tot zover een vergelijking mogelijk was kwamen 82% van de onderdelen van het profiel overeen met de beschikbare informatie. Daarmee levert dit multidisciplinair onderzoek waardevolle en bruikbare informatie over de donor voor het politie onderzoek. Wij concluderen dat het opwerkingsprotocol en het multidisciplinair onderzoek van waarde kan zijn voor de forensische praktijk en ingezet kan worden bij het forensisch politieonderzoek. Daarmee is het doel van het project bereikt om met minder onderzoeksmateriaal meer informatie te geven. De resultaten van het onderzoek aan een gebitselement en teennagel kunnen bovendien in de rechtbank als strafrechtelijk bewijs worden gebruikt.

8. Informatieve film

Tijdens het uitvoeren van het onderzoek is een informatiefilm opgenomen, waarin de betrokken wetenschappers het onderzoek uitleggen en tonen. Deze film is bedoeld om inzicht te geven in de mogelijkheden van het onderzoek en om met geïnteresseerden de kennis te delen. De film kan worden ingezet bij de opleiding van forensisch rechercheurs, lezingen en als online toelichting van het onderzoek.

Er is een uitgebreide film van ongeveer 20 minuten gemaakt. Het ruwe en originele beeldmateriaal is in het beheer bij afdeling Communicatie van het NFI. De partners van dit project kunnen vrij het beeldmateriaal tonen op lezingen en symposia. Voor het delen en plaatsen van de film is toestemming van het consortium nodig en zijn afspraken omtrent het tonen en beheer van de film gemaakt.

9. Implementatie in praktijk

Dit onderzoek heeft naast de analytische uitkomsten ook geresulteerd in een nauw en gezond netwerk van professionals, die gezamenlijk en tegelijkertijd dit multidisciplinair onderzoek kunnen verrichten. De onderzoekers hebben relevante ervaring opgedaan en gedeeld met het werken met dit type onderzoeksmateriaal en kunnen dit toepassen in de dagelijkse praktijk. De beschreven voorbereiding en het multidisciplinair onderzoek in gebitselementen en nagels zal geïmplementeerd en aangeboden worden om in de forensische praktijk toe te passen. De waarde van het onderzoek is door het uitvoeren van dit project bekend: in 71 % gevallen kon een volledig profiel en in 28% een partieel profiel van de persoon worden verkregen. Deze informatie is waardevol in gevallen waarbij er sprake van vergevorderde ontbinding, skelettering of incomplete lichamen. Dit komt voor bij forensische zaken waarbij het lichaam laat wordt gevonden of wordt onderzocht, zoals bij vermissingen, onbekende doden en cold cases. In dergelijke gevallen kan het onderzoek nu op incidentele basis worden aangevraagd en uitgevoerd. Het doel is om het multidisciplinair onderzoek aan gebitselementen en nagels structureel in 2024 aan te bieden aan de politie en Openbaar ministerie. Om dit te bewerkstelligen wordt het aankomende jaar bedrijfsmatige, kwaliteit technische en logistieke processen ingericht om dit onderzoek via het NFI aan te vragen. Hoe en wanneer dit mogelijk is zal via bestaande lijnen worden gecommuniceerd. Het nieuwe product vervangt overigens niet reeds bestaande onderzoeksmogelijkheden, deze kunnen altijd op verzoek separaat worden uitgevoerd.

10. Disseminatie

Op verschillende wijze zal er bekendheid worden gegeven aan de onderzoeksmogelijkheden en waarde van het onderzoek. Naast het verspreiden van de informatiefilm zal door het geven van lezingen binnen de kwaliteitsnetwerken van de Politie Opsporen, Bergen en Identificeren en het netwerk Forensisch Medische Zaken de resultaten van het onderzoek worden gedeeld. Tenslotte zal het onderzoek door de onderzoekers in een wetenschappelijk peer-review tijdschrift gepubliceerd worden en tijdens congressen worden gedeeld met vakgenoten.

11. Literatuurbronnen

1. Cafiero, C., et al., *Optimization of DNA extraction from dental remains*. Electrophoresis, 2019. **40**(14): p. 1820-1823.
2. Schlenker, A., et al., *Toenails as an alternative source material for the extraction of DNA from decomposed human remains*. Forensic Sci Int, 2016. **258**: p. 1-10.
3. Bartelink, E.J., et al., *Stable Isotope Forensics as an Investigative Tool in Missing Persons Investigations*, in *Handbook of Missing Persons*, S.J. Morewitz and C. Sturdy Colls, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 443-462.
4. Meier-Augenstein, W. and I. Fraser, *Forensic isotope analysis leads to identification of a mutilated murder victim*. Sci Justice, 2008. **48**(3): p. 153-9.
5. Brock, F. and G.T. Cook, *Forensic Radiocarbon Dating of Human Remains: The Past, the Present, and the Future*. Forensic Archaeology, Anthropology and Ecology, 2017. **1**(1): p. 3-16.
6. Couoh, L.R., *Differences between biological and chronological age-at-death in human skeletal remains: A change of perspective*. Am J Phys Anthropol, 2017. **163**(4): p. 671-695.
7. AlQahtani, S.J., M.P. Hector, and H.M. Liversidge, *Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption*. Am J Phys Anthropol, 2010. **142**(3): p. 481-90.
8. Cattaneo, C., et al., *The detection of morphine and codeine in human teeth: an aid in the identification and study of human skeletal remains*. J Forensic Odontostomatol, 2003. **21**(1): p. 1-5.
9. Klima, M., et al., *Determination of medicinal and illicit drugs in post mortem dental hard tissues and comparison with analytical results for body fluids and hair samples*. Forensic Sci Int, 2016. **265**: p. 166-71.
10. Ottaviani, G., et al., *Determination of Drugs of Abuse in a Single Sample of Human Teeth by a Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method*. J Anal Toxicol, 2017. **41**(1): p. 32-36.
11. Pellegrini, M., et al., *Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for opiates and cocaine in human teeth*. J Pharm Biomed Anal, 2006. **40**(3): p. 662-8.
12. Solimini, R., et al., *Nails in Forensic Toxicology: An Update*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(36): p. 5468-5479.
13. Boer, L.L., et al., *Detection of G1138A Mutation of the FGFR3 Gene in Tooth Material from a 180-Year-Old Museological Achondroplastic Skeleton*. Genes (Basel), 2017. **8**(9).
14. Kootker, L.M., et al., *Dynamics of Indian Ocean Slavery Revealed through Isotopic Data from the Colonial Era Cobern Street Burial Site, Cape Town, South Africa (1750-1827)*. PLOS ONE, 2016. **11**(6): p. e0157750.
15. Kootker, L.M., et al., *The effects of decomposition and environment on antemortem H-Pb-Sr isotope compositions and degradation of human scalp hair: Actualistic taphonomic observations*. Forensic Science International, 2020. **312**: p. 110336.
16. Reimer, P.J., et al., *The IntCal20 Northern Hemisphere Radiocarbon Age Calibration Curve (0–55 cal kBP)*. Radiocarbon, 2020. **62**(4): p. 725-757.
17. Hua, Q., et al., *ATMOSPHERIC RADIOCARBON FOR THE PERIOD 1950–2019*. Radiocarbon, 2022. **64**(4): p. 723-745.
18. Lamster, I.B., et al., *The aging mouth: differentiating normal aging from disease*. Periodontol 2000, 2016. **72**(1): p. 96-107.
19. Gawali, R., et al., *Comparative evaluation of different human dental tissues and alveolar bone for DNA quantity and quality for forensic investigation*. Forensic Sci Int, 2021. **325**: p. 110877.

20. Hughes-Stamm, S., F. Warnke, and A. van Daal, *An alternate method for extracting DNA from environmentally challenged teeth for improved DNA analysis*. Leg Med (Tokyo), 2016. **18**: p. 31-6.
21. Tilotta, F., et al., *A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting*. Forensic Sci Int, 2010. **202**(1-3): p. e39-43.
22. Duijs, F.E. and T. Sijen, *A rapid and efficient method for DNA extraction from bone powder*. Forensic Science International: Reports, 2020. **2**: p. 100099.
23. Yaemsiri, S., et al., *Growth rate of human fingernails and toenails in healthy American young adults*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2010. **24**(4): p. 420-3.
24. Krumbiegel, F., et al., *The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples*. Forensic Sci Med Pathol, 2016. **12**(4): p. 416-434.