



STUDIE

PRŮVODCE ANALÝZAMI ZUBNÍHO KAMENE V ARCHEOLOGII

Eva Chocholová – Dana Fialová – Kateřina Novotná – Eva Drozdová

Guide to Dental Calculus Analysis in Archaeology

Abstract: Dental calculus preserves information about past populations. This text aims to present the basic approaches to the rapidly developing research on this unique material and to provide recommendations for the analysis of dental calculus in archaeology, with a focus on obtaining the maximum amount of information. Optimal methodology involves a progression from non-destructive descriptive and some microscopic techniques to methods from molecular biology, biochemistry and organic chemistry that target biologically significant molecules such as ancient DNA and proteins. This can provide insights into, for example, diet, human microbiome, health, habits, contact or migration.

Keywords: biomolecular archaeology, microscopy, spectroscopy, metagenomics, aDNA, paleoproteomics, metabolomics

Contacts: Mgr. Eva Chocholová, Laboratoř biologické a molekulární antropologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika; e-mail: chocholova@sci.muni.cz
Mgr. Dana Fialová, Ph.D., Laboratoř biologické a molekulární antropologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika; e-mail: dfialova@sci.muni.cz
Mgr. Kateřina Novotná, Laboratoř biologické a molekulární antropologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika; e-mail: anthropo.kate@mail.muni.cz
doc. RNDr. Eva Drozdová, Ph.D., Laboratoř biologické a molekulární antropologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika; e-mail: drozdova@sci.muni.cz

Úvod a cíl

Zubní kámen vzniká mineralizací zubního plaku. Jeho hlavní složkou je anorganická část, tvořená převážně fosforečnanem vápenatým. Organická část se skládá především z proteinů, ale nacházíme zde i například lipidy nebo DNA (Jin – Yip 2002). Proces vzniku zubního kamene je ovlivněn mnoha faktory, z nichž velká část není dosud dostatečně prozkoumána. Významnou roli hraje strava (Lieverse 1999) a pH v ústní dutině (Dawes 1970). Faktory, které ovlivňují preferenční zachování specifických DNA a proteinů, jsou stále nejasné a konzervace konkrétní molekuly po stovky i tisíce let závisí na mnoha činitelích i náhodě.

Zubní kámen již dlouhou dobu slouží jako důležitý zdroj informací o historických populacích (příklad na Obr. 1). Od objevení „reaktivní DNA“ v historickém zubním kameni v roce 2011 (Preus et al. 2011) trvalo jen dva roky, než byl poprvé studován pomocí molekulárních metod (Adler et al. 2013). V roce 2014 již byla starobylá DNA (aDNA) ze zubního kamene analyzována metagenomickým přístupem

a studovány byly i proteiny imunitního systému (Warinner et al. 2014a) a proteiny pocházející ze stravy (Warinner et al. 2014b). Výzkum v oblasti biomolekulární archeologie se v poslední dekádě prudce rozvinul díky výborné zachovatelnosti DNA, proteinů a dalších biologicky významných molekul. Analýzy zubního kamene zatím ve středoevropském kontextu nebyly provedeny v rozsahu srovnatelném např. lokalitami v jižní či západní Evropě, a je zde mnoho prostoru pro jejich rozšíření.

Cizojazyčné souhrnné publikace zabývající se shodným nebo podobným tématem (např. Weyrich et al. 2015; Radini et al. 2017; Forshaw et al. 2022; Li et al. 2022; Putrino et al. 2024) si dávají za cíl poskytnout ucelené přehledy o využití zubního kamene. V tomto textu bychom však chtěli archeologům především objasnit a doporučit postup a metody použitelné při jeho analýze. Postup, který doporučujeme, je srovnán od nedestruktivních až po destruktivní metody, s ohledem na vlastnosti zubního kamene (Obr. 2). Tyto metody umožňují studovat stravu, orální mikrobiom, patogeny a nemoci, migrace nebo kulturní aspekty života zkoumaného jedince.



Obr. 1. Příklad zubního kamene na zubech horní čelisti. Náměstí Svobody ve Znojmě, 13.–16. století. Foto Eva Chocholová.

Studium historického zubního kamene tak otevírá nové možnosti a doplňuje stávající bioarcheologické přístupy.

Doporučený postup analýz

1) Popisné metody a dokumentace

Nejdříve je nutné přítomnost zubního kamene zmapovat. K tomu slouží schémata, jako jsou například ta na *Obr. 3* (Brothwell 1981; Knussmann 1988). Kromě fotografické dokumentace, která je již běžnou součástí, by měl být zaznamenán do zubního kříže i stupeň rozvoje zubního kamene dle těchto schémat. Rozsah zubního kamene může naznačit vlastnosti stravy, která mohla být bohatá na škroby a méně abrazivní, a také poskytnout informace o postižení onemocněním parodontu.

Charakter: nedestruktivní

Nevýhody: riziko ztráty, kontaminace nebo poškození nesprávnou manipulací

Využití: popisné informace o rozsahu ukládání zubního kamene

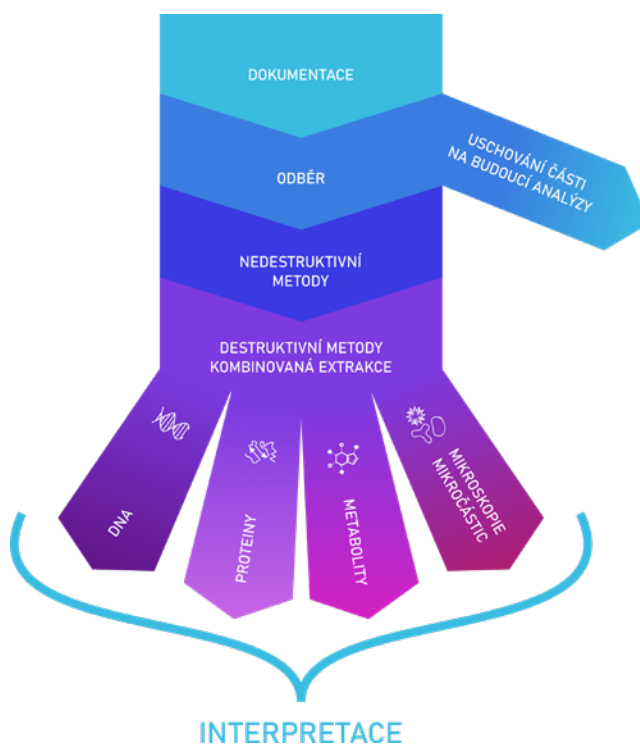
2) Odběr

Odběr materiálu je jedním z klíčových kroků k získání maximálního množství informací v následných analýzách. Pokud je to možné, doporučujeme provést již exkavaci celé čelisti v protikontaminačních podmínkách na pohřebišti a odběr samotného kamene směřovat do specializovaných laboratoří zabývajících se analýzou aDNA. Tyto laboratoře se již řídí doporučenými postupy pro odběr ve striktních protikontaminačních podmínkách (Sabin – Yates 2019). Nejdůležitější je v tomto kroku (ale i v následující manipulaci se vzorkem) minimalizovat riziko vzniku kontaminace cizorodými biomolekulami. Doporučujeme též uschovat část odebraného vzorku pro další analýzy. Způsob uchování závisí na plánované budoucí analýze, ale vzhledem k našemu doporučení je ideální odběr za dodržení protikontaminačních podmínek do DNA free zkumavek nebo sáčků. V případě zájmu o analýzu proteinů je vhodné vyhnout se produktům s obsahem latexu, především rukavicím. Skladování doporučujeme v chladu (lze v mrazáku či lednici), suchu a temnu, především však ve stabilních podmínkách.

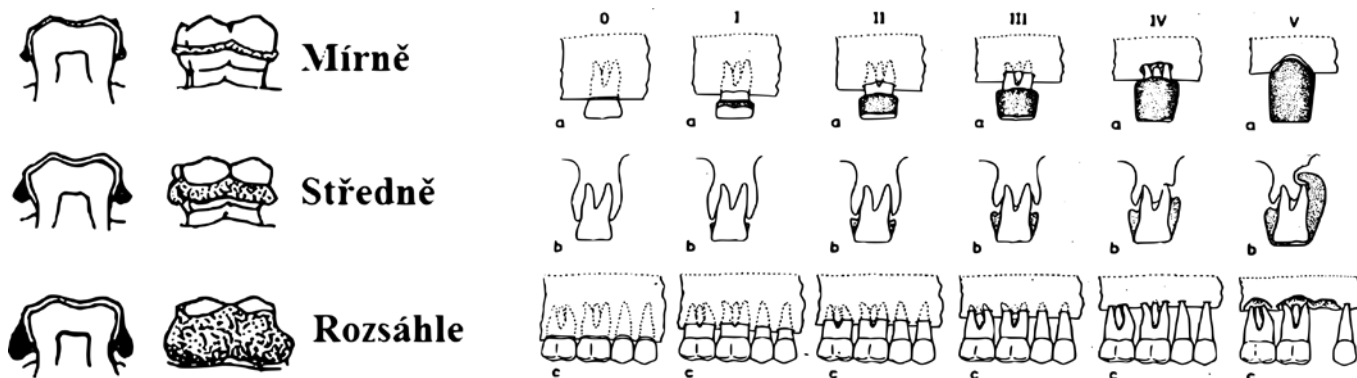
3) Mikroskopické a spektroskopické metody

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Jako další nedestruktivní, případně méně destruktivní metodu doporučujeme použít mikroskopii. Kámen lze studovat bez pokovení a jiných modifikací pomocí skenovací



Obr. 2. Doporučený postup analýz zubního kamene v archeologickém kontextu. Na dokumentaci rozsahu, umístění, zabarvení a dalších charakteristik navazuje ideálně sterilní odběr a uchování části odebraného materiálu pro budoucí analýzy. Následují analýzy nedestruktivními nebo minimálně destruktivními metodami, jako je například skenovací elektronová mikroskopie. Z hlediska destruktivních metod je vhodné využít kombinované extrakční protokoly, které umožňují širší prozkoumání vzorku, například analýzou aDNA, proteinů, metabolitů a mikročástic. Interpretace by měla být založena na všech využitých metodách aplikovaných na zubní kámen i na dalších výsledcích získaných z archeologické lokality.



Obr. 3. Stupnice pro hodnocení rozvoje zubního kamene. Vlevo třístupňové schéma dle Brothwella (1981, přeloženo), vpravo Schulzovo schéma s ústupem parodontu (Knussmann 1988).

elektronové mikroskopie (SEM; Fialová et al. 2017a). Tato analýza je tedy bez přípravy a jedná se pouze o odběr kamene a jeho umístění do mikroskopu. I když je vstupní investice do vybavení značná, samotná příprava vzorků je bez dalších investic. SEM umožňuje zkoumat morfologii vzorku na mikroskopické úrovni (Obr. 4), což zahrnuje pozorování bakterií různých tvarů, rostlinných a živočišných vláken, pylů a dalších objektů zakomponovaných během života (Charlier et al. 2010).

Největší výhodou této metody je možnost studovat morfologii zubního kamene i u fosilních vzorků, kde se předpokládají menší možnosti použití molekulárních analýz (HersHKovitz et al. 1997; Pap et al. 1995; Hardy et al. 2012). Tato metoda také umožňuje zjistit, zda je vzorek vhodný pro další destruktivní molekulární analýzy, protože odhalí případnou kontaminaci plísněmi nebo jinými mikroorganismy (Chocholová – Fialová et al. 2018). Přítomnost kontaminujících mikroorganismů může značně prodražit molekulární analýzy.

Charakter: nedestruktivní

Nevýhody: riziko kontaminace nebo poškození, dostupnost mikroskopu

Využití: odhalení kontaminace a morfologie vzorku na mikroskopické úrovni, možnost zkoumání fosilních vzorků

Skenovací elektronová mikroskopie s prvkovým detektorem – detektorem energiově disperzní rentgenové spektroskopie (SEM-EDX)

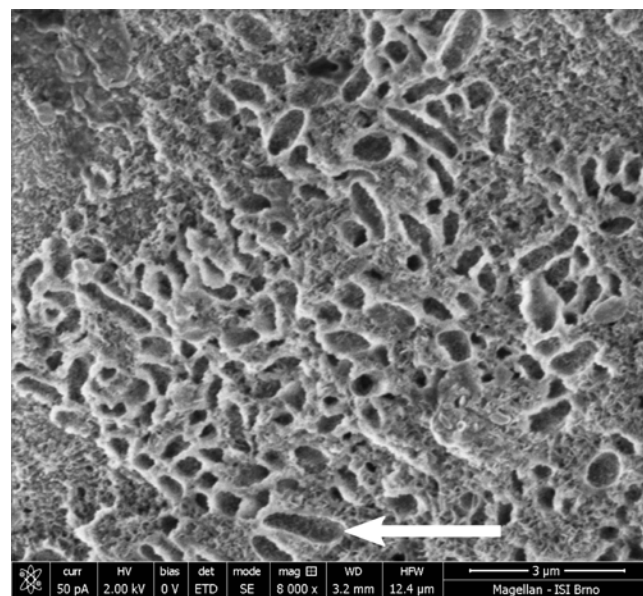
SEM lze použít i s přídatnými detektory. Energiově disperzní rentgenové spektroskopie (EDX, též EDS) umožňuje analyzovat prvkové složení pozorované oblasti. Tato analýza je také nedestruktivní a může odhalit ne/přítomnost výjimečných prvků. Toho lze využít pro odhalení zvyklostí lidí z období jejich života nebo pohřbu (Fialová et al. 2017b), a pomoci tak i k identifikaci neznámých ostatků. Například přítomnost olova v zubním kameni potvrdila, že zkoumané ostatky patřily vojákům (Fialová et al. 2017b; Vymazalová et al. 2021). Zaměřením této analýzy na zubní kámen umožňuje detekci prvků z období krátce před smrtí. Má proto oproti analýzám mapujícím dlouhodobé působení konkrétního prvku (například analýza stabilních izotopů z tvrdých tkání) své výhody i nevýhody (podává odlišnou informaci). Porovnávací studie tedy neexistují, protože pokud byl dotyčný člověk vystaven působení prvku jen krátkodobě před smrtí, neukáže se v tvrdých tkáních. Naopak, pokud byl vystaven dlouhodoběmu

působení, nemusel být těsně před smrtí. Tuto metodu lze též využít k identifikaci prvků přítomných v prostředí pohřbeného jedince (Fialová et al. 2017b). Což bylo využito i k identifikaci nepřítomnosti výjimečných prvků v případě mumie z Kuby, která vyloučila, že by mumie pocházela z dolu v Peru, a spolu s dalšími metodami pomohla k nalezení jejího původu na Kanárských ostrovech (Fialová et al. 2024). SEM-EDX byla použita i k identifikaci škrobových zrn přítomných v zubním kameni (Power et al. 2014). Rozdílné prvkové složení zubního kamene bylo pozorováno u různých populací nebo sociálních skupin v rámci historické populace (Charlier et al. 2010).

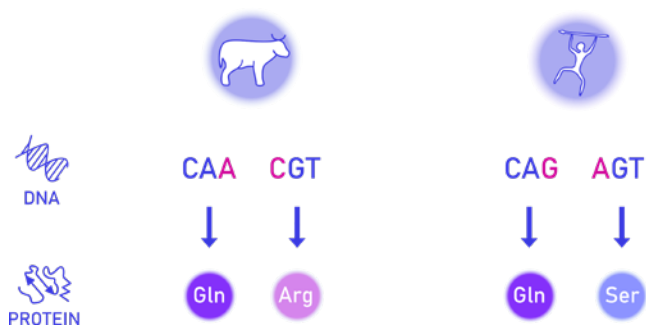
Charakter: nedestruktivní

Nevýhody: riziko ztráty, kontaminace nebo poškození, dostupnost mikroskopu s detektorem, méně citlivá oproti destruktivní izotopové analýze

Využití: detekce výjimečných prvků, které mohou pomoci k odhalení zvyklostí lidí za života nebo posmrtně, a tím pomoci k identifikaci neznámých ostatků. Může odlišit různé sociální skupiny nebo populace.



Obr. 4. Příklad snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu s otisky bakterií (šipka). Převzato z Chocholová a Fialová et al. (2018).



Obr. 5. Rozdíly mezi organismy na základě sekvence DNA a proteinů. Rozdíly mezi sekvencí DNA a sekvencí aminokyselin v proteinech jsou klíčové pro studium rozmanitosti a taxonomického zařazení organismů. Sekvence DNA je obecně méně konzervativní než sekvence aminokyselin v proteinech, což znamená, že mezi různými druhy může být více rozdílů v DNA (označeno růžovou barvou) než v proteinech. To umožňuje přesnější určení taxonu na základě DNA. Například i přes rozdíl v sekvenci první části DNA na schématu, v proteinu se změna neprojevuje a u obou druhů se vyskytuje aminokyselina glutamin. Tura domácího a člověka lze dle uvedeného příkladu odlišit na základě dvou míst v DNA, ale jen jednoho místa v proteinu. Uvedené sekvence jsou jen ilustrační.

Polarizační mikroskopie

Další mikroskopickou metodou je použití polarizačního mikroskopu. Toho se využívá k identifikaci škrobových zrn či fytolitů, což umožňuje určení rostlinné stravy jedince (např. *Fox et al. 1996; Hardy et al. 2009; Hardy et al. 2012; Henry – Piperno 2008*). Investice do vybavení je sice vyšší, ale samotné zpracování vzorků je cenově nenáročné. Nevýhodou této metody je kompletní destrukce vzorku s nižším výtěžkem informací, protože úspěšnost závisí na dochování škrobových zrn nebo fytolitů, což je často dílem náhody. Vzhledem k tomu, že se jedná o destruktivní metodu, doporučujeme její použití zvážit hlavně v případě malého počtu vzorků. Oproti tomu molekulární metody mohou poskytnout větší množství informací.

Charakter: destruktivní

Nevýhody: destrukce vzorku, omezené taxonomické rozlišení

Využití: určení rostlinné stravy pomocí identifikace škrobových zrn a fytolitů

Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie se v archeologii obecně využívá k určení mineralogického složení a nejčastěji k identifikaci pigmentů či barviv. Díky rozšiřování databází různých vzorků je tato nedestruktivní metoda perspektivní. Ve spojitosti s historickým zubním kamenem byla použita společně se skenovací mikroskopií a EDX detektorem (SEM-EDX) k identifikaci modrého pigmentu obsaženého ve vzorku zubního kamene, který byl odebrán řeholnicí z 11.–12. století v Německu. Identifikovaný pigment, lapis lazuli, byl používán k iluminaci textů, což prokázalo, že tuto činnost nevykonávali pouze muži (*Radini et al. 2019*).

Charakter: nedestruktivní

Nevýhody: riziko kontaminace nebo poškození, dostupnost přístroje

Využití: identifikace neznámých struktur, například pigmentů, barviv, mineralogické složení

4) Biomolekulární metody

Metody zaměřující se na biologické molekuly, jako jsou DNA, proteiny nebo lipidy, mohou poskytnout výrazně přesnější informace zejména v oblasti taxonomického zařazení obsahu zubního kamene. Jejich výhodou spočívá také v odlišném typu získaných dat oproti jiným přístupům, například možnost rozlišení konzumace mléka a masa, určení části rostliny užívané ve stravě či k léčbě nebo studium mikrobiomu.

Hlavní nevýhodou biomolekulárních metod je nutnost jejich realizace ve specializovaných laboratořích určených pouze pro analýzy starobylých vzorků. Ve srovnání s mikroskopickými nebo popisnými metodami jsou také většími nákladnější. Nicméně poskytují informace, které nelze získat jiným způsobem, což z nich činí unikátní zdroj pro studium minulých populací.

DNA, nebo proteiny?

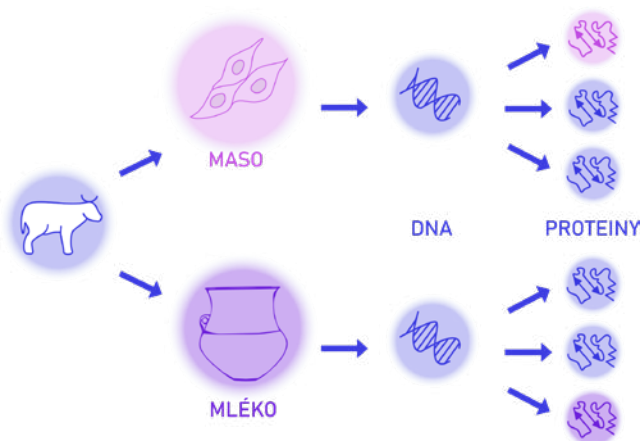
V zubním kameni nacházíme molekuly pocházející z různých zdrojů, přičemž nejčastěji studované jsou DNA a proteiny. Tyto molekuly mají řadu rozdílů a jejich získávání je destruktivní proces, proto volba přístupu závisí především na cíli studie. Pro získání co nejširšího spektra informací doporučujeme použití kombinovaných metod (kap. 5).

Proteiny jsou ve své sekvenci během evoluce stálejší oproti DNA, což činí DNA vhodnější k taxonomickému zařazení organismů (*Obr. 5*). Pro zjednodušení můžeme říci, že ve všech buňkách těla máme stejnou DNA, ale každá tkáň může produkovat jinou sadu proteinů (*Obr. 6*). Základní proteiny nutné pro fungování buněk budou většinou shodné, ale rozdílné proteiny nám mohou pomoci určit původ tkáně. Nejprozkoumanějším příkladem v rámci historického zubního kamene jsou mléčné bílkoviny. Zatímco podle DNA můžeme určit, že daný člověk byl v kontaktu s ovčími produkty, proteiny mohou prozradit, zda šlo o mléko, maso, nebo třeba keratiny z ovčí kůže. Pro studium stravy jsou proto nejčastěji využívány proteiny, zejména v souvislosti s konzumací mléka, která byla tímto poprvé prokázána v roce 2014 (*Warinner et al. 2014b*).

Naopak v případě mikrobiomu je třeba přesnější taxonomické určení, které umožňuje DNA. Nejvhodnější je metagenomický přístup, kterým studujeme genetickou informaci všech druhů obsažených ve vzorku. Mikrobiom je komunita mikroorganismů žijících v našem těle a je zásadní pro vývoj a zdraví člověka, například správný vývoj a fungování imunitního nebo endokrinního systému (*Noverr – Huffnagle 2004*). Ústní mikrobiom je jedním z nejrozmanitějších v našem těle a jeho narušení je spojeno s mnoha orálními onemocněními, jako je zubní kaz, paradentóza nebo rakovina ústní dutiny (*Al-Hebshi et al. 2019; Belstrøm 2020; Vasquez et al. 2018*), ale také s četnými patologickými stavy jiných částí těla, například diabetes (*Long et al. 2017; Matsha et al. 2020*) nebo systemická infekce (*Scannapieco 2005; Simpson – Thomas 2016; Vasquez et al. 2018*). Sekvence mikrobiomu tak potenciálně může pomoci studovat patologii s ním spojenou.

DNA: Shotgun metagenomické sekvenování

V případě, kdy chceme sekvenovat všechnu DNA přítomnou ve vzorku, používá se metoda nazývaná shotgun sekvenace. Její výhodou je, že v ideálním případě nedochází k výraznému zkreslení poměrů mezi přítomnými taxony.



Obr. 6. Rozdíly mezi tkáněmi stejného organismu. Zatímco všechna DNA a velká část proteinů budou shodné mezi různými tkáněmi stejného druhu (modrá barva), některé proteiny jsou pro tkáň specifické, jako zde v případě masa (růžová barva) a mléka (fialová barva). Proteiny tak na rozdíl od DNA mohou pomoci určit tkáňový původ.

Pro studium mikrobiomu je v současnosti shotgun sekvenace hlavní doporučenou metodou (Ziesemer et al. 2015). Pokud se však zaměřujeme pouze na stravu, může se stát, že množství DNA pocházející ze stravy bude velmi nízké (Warinner et al. 2014a). Přesto je i tato oblast zajímavým zdrojem poznatků (Warinner et al. 2014b; Weyrich et al. 2017). Lze se také zaměřit na lidskou aDNA, která je v kameni v nízkém procentu přítomná. Díky tomu můžeme získat genetickou informaci i bez destruktivního odběru z kosterních pozůstatků např. v případě legálních a etických omezení (Black et al. 2011; Ozga et al. 2016).

Kromě rozsáhlého množství informací poskytuje tento přístup také lepší možnosti autentizace starobylé DNA, například pomocí analýzy délky fragmentů nebo deaminace cytosinu na jejich koncích (Key et al. 2017).

Informativnost shotgun sekvenace závisí na hloubce sekvenace, což představuje množství DNA, které je ze vzorku sekvenováno. Hlubší sekvenace přináší více informací, ale také výrazně vyšší cenu. Právě z hlediska nákladů je shotgun jedním z nejnáročnějších uvedených přístupů. S technologickým rozvojem však lze očekávat i další snižování ceny za sekvenovanou bázi, což by tuto metodu zpřístupnilo širšímu využití.

Charakter: destruktivní

Nevýhody: destrukce vzorku, riziko kontaminace, vysoké náklady, nutnost práce ve specializovaných laboratořích, vysoká náročnost bioinformatických analýz

Využití: mikrobiom, patogeny, lidská DNA, méně i strava

DNA: Sekvenování amplikonů – metabarcoding

Pokud se zaměřujeme na konkrétní skupinu organismů, můžeme využít tzv. metabarcoding, což je metoda, při níž amplifikujeme a následně sekvenujeme variabilní region ohraničený konzervativními sekvencemi, na které jsou navrženy primery. V počátcích výzkumu aDNA v zubním kameni byl metabarcoding používán k analýze bakterií pomocí sekvenace variabilních oblastí genu pro 16S rRNA (Adler et al. 2013; Warinner et al. 2014a). Tuto metodu lze úspěšně

využít i pro detekci rostlinné DNA potenciálně pocházející ze stravy (D'Agostino et al. 2022; Sawafuji et al. 2020). Metabarcoding poskytuje informace pouze o vybrané skupině organismů, avšak poměry taxonů mohou být ovlivněny PCR biasem, který může vést k podhodnocení nebo nadhodnocení frekvence taxonů v důsledku variabilní délky cílové sekvence (Ziesemer et al. 2015). Tato metoda je však o řády levnější než shotgun sekvenování a její vyhodnocování je rychlejší a méně náročné. Využití nachází především při zaměření na stravu.

Charakter: destruktivní

Nevýhody: destrukce vzorku, riziko kontaminace, vyšší náklady oproti nemolekulárním přístupům, nutnost práce ve specializovaných laboratořích, bias v zachovalosti a frekvenci různých taxonů, omezené možnosti autentizace
Využití: především strava, méně i mikroorganismy

Proteiny: Tandemová hmotnostní spektrometrie

Proteiny jsou oproti DNA výrazně stabilnější a mohou se zachovávat i miliony let (Cappellini et al. 2019; Demarchi et al. 2016; Madupe et al. 2023; Welker et al. 2019). Proto mohou být studovány i v kontextech, kde už to u aDNA není možné. V případě zubního kamene byly starobylé proteiny zkoumány zejména v kontextu stravy (Warinner et al. 2014b) a imunitní reakce (Warinner et al. 2014a). Největší část proteomického výzkumu zubního kamene se zaměřuje na konzumaci mléčných produktů (např. Hendy et al. 2018; Jeong et al. 2018; Jersie-Christensen et al. 2018; Charlton et al. 2019; Geber et al. 2019; Stojanovski et al. 2020; Wilkin et al. 2020; Bleasdale et al. 2021; Scott et al. 2021; Tang et al. 2023). Proteomika také umožňuje detailní studium patofyziologie a imunitních reakcí, což umožňuje získávat informace o probíhajících procesech (Warinner et al. 2014a; Uchida-Fukuhara et al. 2024). Ačkoli může být proteomika využita k identifikaci bakteriálních patogenů, je vhodnější k tomuto účelu využít DNA analýzy nebo kombinovat oba přístupy, jak bylo provedeno v multidisciplinární studii původce lepry (*Mycobacterium leprae*; Fotakis et al. 2020).

Charakter: destruktivní

Nevýhody: destrukce vzorku, riziko kontaminace, vyšší náklady oproti nemolekulárním přístupům, nutnost práce ve specializovaných laboratořích, nižší taxonomické rozlišení oproti analýzám DNA, náročnost zpracování dat, omezené množství organismů v databázích

Využití: především strava, méně průběh onemocnění, mikroorganismy

5) Kombinované metody

Každá metoda poskytuje jedinečný náhled na daný vzorek, a proto je ideální jejich kombinace. Nejčastěji jsou zvlášť analyzovány různé části kamene ze stejné osoby. S ohledem na omezené množství tohoto vzácného materiálu jsou vyvíjeny kombinované protokoly, které integrují více analytických metod bez nutnosti navýšení vstupního materiálu a jsou aplikované na jediný vzorek. Patří mezi ně například souběžná extrakce DNA a proteinů (Fagernäs et al. 2020; Chocholova et al. 2023), po níž lze mikroskopicky pozorovat mikročástice jako pyl, fytolity nebo škrobová zrna. Mikroskopii bylo navázáno i na samotnou extrakci DNA

(Modi et al. 2020) nebo proteinů (Scott et al. 2021). To umožňuje ideální postup, kdy z jediného kusu zubního kamene lze získat biomolekuly a následně ho podrobit tradiční mikroskopické analýze. Pokud je kámen nejdříve destruuován pro polarizační mikroskopii, molekulárně-biologické analýzy na něj již nemusí být možné aplikovat.

Nevýhodou kombinovaných protokolů je však nižší výtěžek extrakcí ve srovnání s použitím pouze jedné metody, jak bylo prokázáno například ve snížení výtěžku aDNA (Fagnäs et al. 2020; Chocholova et al. 2023). Nicméně tyto protokoly umožňují využití minimálního množství materiálu.

Studium mikrobiomu se obvykle provádí z DNA, ale budoucnost přináší rozvoj interdisciplinárních přístupů spojujících vývoj mikrobiomu se stravou a patologiemi pomocí paleoproteomických a metabolomických metod (Warinner et al. 2014a; Velsko et al. 2019; Fiorin et al. 2024).

6) Další metody

Metabolomika – studium metabolitů

Metabolomika se zaměřuje na malé molekuly, které jsou součástí metabolismu organismů. Metabolity zachycené v zubním kameni mají význam především ve studiu stravy a léčebných postupů a využívá se k němu biochemická metoda plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS; Hardy et al. 2012; Velsko et al. 2019; D'Agostino et al. 2020; Gismondi et al. 2020; Riboni et al. 2023). Příkladem mohou být rostlinné alkaloidy nebo terpenoidy. Metabolomika tak sloužila například ve studiu možné léčby u neandrtálců (Hardy et al. 2012) nebo rostlinných zdrojů potravy v neolitické Itálii (D'Agostino et al. 2022). Lipidy jsou stabilnější než DNA a proteiny a také jsou využívány ve studiu zubního kamene (Velsko et al. 2017; D'Agostino et al. 2020; Rogóž et al. 2021). Kupříkladu Rogóž et al. (2021) využili kvantitativní lipidomickou analýzu řetězců mastných kyselin ke studiu stravy u historické populace. Pomocí GC-MS/MS tak byli schopni určit vyšší podíl masa a mléčných výrobků u studovaných jedinců.

Charakter: destruktivní

Nevýhody: destrukce vzorku, vyšší náklady, dostupnost přístrojů, velká část molekul není identifikovaná

Informace: především strava a léčba

Izotopy

Uvažuje se o využití zubního kamene pro studie izotopů. Dosseto et al. (2024) zkoumali využití stroncia pro mapování migrací populací s cílem nahradit invazivní analýzy kostí a zubní skloviny. Další vědecké týmy se zaměřovaly na využití izotopů uhlíku či dusíku zubního kamene pro studium stravy (Price et al. 2018; Chidimuro et al. 2022). Nicméně, výzkumy naznačují, že hladiny izotopů v zubním kameni jsou významně ovlivněny diagenézí a zatím nemáme dostatečné množství dat, abychom mohli výsledky správně interpretovat. Z tohoto důvodu se doporučuje pro studium stravy používat spíše ověřené metody, které umožňují přesnější a konzistentnější analýzy.

Charakter: destruktivní

Nevýhody: destrukce vzorku, doporučeno zaměřit se spíše na jiné materiály pro analýzu izotopů

Informace: zatím v počátcích výzkumu

Závěr

Zubní kámen je velmi komplexní materiál, který přináší k archeologickým poznatkům unikátní informace. Zubní kámen zahrnuje spíše kratší úsek života jedince, a jeho analýza by tak měla být integrována s širšími archeologickými přístupy, jako jsou analýza izotopů z kostí a zubů, paleobotanika nebo zooarcheologie. Vzhledem ke křehkosti a snadné ztrátě kamene při exkavaci a následném zpracování koster-ního materiálu je třeba větší obezřetnosti a upozornění i pro další výzkumníky, kteří s materiálem pracují. Pro omezení kontaminace je ideální provádět odběr čelisti již při exkavaci a následně po dokumentaci ve vhodných podmínkách odebrat samotný kámen.

Ačkoli je jeho obsah nepředvídatelný a převažují v něm zejména mikroorganismy, má smysl se jeho studiu věnovat i v oblasti stravy, kde přináší přímý důkaz o konzumaci konkrétních skupin potravin. S ohledem na omezené množství dostupného zubního kamene je výhodné v návrhu studií zahrnout více analytických metod. Celkově je tedy klíčové přistupovat k analýze zubního kamene interdisciplinárně a využívat multiproxy přístup pro co nejkompexnější pochopení historických kontextů.

Literatura

- Adler, C. J. – Dobney, K. – Weyrich, L. S. – Kaidonis, J. – Walker, A. W. – Haak, W. – Bradshaw, C. J. A. – Townsend, G. – Soltysiak, A. – Alt, K. W. – Parkhill, J. – Cooper, A. 2013: Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics* 45, 450–455. <https://doi.org/10.1038/ng.2536>
- Al-Hebshi, N. N. – Baraniya, D. – Chen, T. – Hill, J. – Puri, S. – Tellez, M. – Hasan, N. A. – Colwell, R. R. – Ismail, A. 2019: Metagenome sequencing-based strain-level and functional characterization of supragingival microbiome associated with dental caries in children. *Journal of Oral Microbiology* 11(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1557986>
- Belström, D. 2020: The salivary microbiota in health and disease. *Journal of Oral Microbiology* 12(1), 1723975. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1723975>
- Black, J. – Kerr, S. – Henebry-Delenon, L. – Lorenz, J. G. 2011: Dental calculus as an alternative source of mitochondrial DNA for analysis of skeletal remains. *Proceedings of the Society for California Archaeology* 25, 1–7.
- Bleasdale, M. – Richter, K. K. – Janzen, A. – Brown, S. – Scott, A. – Zech, J. – Wilkin, S. – Wang, K. – Schiffels, S. – Desideri, J. – Besse, M. – Reinold, J. – Saad, M. – Babiker, H. – Power, R. C. – Ndiema, E. – Ogola, C. – Manthi, F. K. – Zahir, M. – Petraglia, M. – Trachsel, C. – Nanni, P. – Grossmann, J. – Henty, J. – Crowther, A. – Roberts, P. – Goldstein, S. T. – Boivin, N. 2021: Ancient proteins provide evidence of dairy consumption in eastern Africa. *Nature Communications* 12(1), 632. <http://doi.org/10.1038/s41467-020-20682-3>
- Brothwell, D. R. 1981: *Digging Up Bones: The Excavation, Treatment and Study of Human Skeletal Remains*. British Museum (Natural History). Ithaca, New York: Cornell University Press.

- Cappellini, E. – Welker, F. – Pandolfi, L. – Ramos-Madrugal, J. – Samodova, D. – Rütther, P. L. – Fotakis, A. K. – Lyon, D. – Moreno-Mayar, J. V. – Bukhsianidze, M. – Jersie-Christensen, R. R. – Mackie, M. – Ginolhac, A. – Ferring, R. – Tappen, M. – Palkopoulou, E. – Dickinson, M. R. – Stafford, T. W. – Chan, Y. L. – Götherström, A. – Nathan, S. K. S. – Heintzman, P. D. – Kapp, J. D. – Kirillova, I. – Moodley, Y. – Agusti, J. – Kahlke, R. D. – Kiladze, G. – Martínez-Navarro, B. – Liu, S. – Sandoval Velasco, M. – Sinding, M. H. S. – Kelstrup, C. D. – Allentoft, M. E. – Orlando, L. – Penkman, K. – Shapiro, B. – Rook, L. – Dalén, L. – Gilbert, M. T. P. – Olsen, J. V. – Lordkipanidze, D. – Willerslev, E. 2019: Early Pleistocene enamel proteome from Dmanisi resolves Stephanorhinus phylogeny. *Nature* 574(7776), 103–107. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1555-y>
- Charlier, P. – Huynh-Charlier, I. – Munoz, O. – Billard, M. – Brun, L. – Lorin de la Grandmaison, G. 2010: The microscopic (optical and SEM) examination of dental calculus deposits (DCD). Potential interest in forensic anthropology of a bio-archaeological method. *Legal Medicine* 12, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2010.03.003>
- Charlton, S. – Ramsøe, A. – Collins, M. – Craig, O. E. – Fischer, R. – Alexander, M. – Speller, C. F. 2019: New insights into Neolithic milk consumption through proteomic analysis of dental calculus. *Archaeological and Anthropological Sciences* 11(11), 6183–6196. <http://doi.org/10.1007/s12520-019-00911-7>
- Chidimuro, B. – Mundorff, A. – Speller, C. – Radini, A. – Boudreau, N. – Lucas, M. – Holst, M. – Lamb, A. – Collins, M. – Alexander, M. 2022: Isotope analysis of human dental calculus $\delta^{13}\text{C}_{\text{O}_2}$: Investigating a potential new proxy for sugar consumption. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 36(11), s. e9286. <https://doi.org/10.1002/rcm.9286>
- D'Agostino, A. – Canini, A. – Di Marco, G. – Nigro, L. – Spagnoli, F. – Gismondi, A. 2020: Investigating Plant Micro-Remains Embedded in Dental Calculus of the Phoenician Inhabitants of Motya (Sicily, Italy). *Plants (Basel, Switzerland)* 9(10), 1395. <https://doi.org/10.3390/plants9101395>
- D'Agostino, A. – Di Marco, G. – Marvelli, S. – Marchesini, M. – Rizzoli, E. – Rolfo, M. F. – Canini, A. – Gismondi, A. 2022: Neolithic dental calculi provide evidence for environmental proxies and consumption of wild edible fruits and herbs in central Apennines. *Communications Biology* 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04354-0>
- Dawes, C. 1970: Effects of diet on salivary secretion and composition. *Journal of Dental Research* 49(6), 1263–1273. <https://doi.org/10.1177/00220345700490061501>
- De la Fuente, C. – Flores, S. – Moraga, M. 2013: DNA from Human Ancient Bacteria: A Novel Source of Genetic Evidence from Archaeological Dental Calculus. *Archaeometry* 55(4), 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2012.00707.x>
- Demarchi, B. – Hall, S. – Roncal-Herrero, T. – Freeman, C. L. – Woolley, J. – Crisp, M. K. – Wilson, J. – Fotakis, A. – Fischer, R. – Kessler, B. M. – Jersie-Christensen, R. R. – Olsen, J. V. – Haile, J. – Thomas, J. – Marean, C. W. – Parkington, J. – Presslee, S. – Lee-Thorp, J. – Ditchfield, P. – Hamilton, J. F. – Ward, M. W. – Wang, C. M. – Shaw, M. D. – Harrison, T. – Domínguez-Rodrigo, M. – De Macphee, R. – Kwekason, A. – Ecker, M. – Horwitz, L. K. – Chazan, M. – Kröger, R. – Thomas-Oates, J. – Harding, J. H. – Cappellini, E. – Penkman, K. – Collins, M. J. 2016: Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. *eLife* 5, e17092. <http://doi.org/10.7554/eLife.17092>
- Dosseto, A. – Dux, F. – Eisenhofer, R. – Weyrich, L. 2024: Assessing the Utility of Strontium Isotopes in Fossil Dental Calculus. *Journal of Archaeological Method and Theory* 31, 1570–1584. <http://doi.org/10.1007/s10816-024-09651-y>
- Fagernäs, Z. – García-Collado, M. I. – Hendy, J. – Hofman, C. A. – Speller, C. – Velsko, I. – Warinner, C. 2020: A unified protocol for simultaneous extraction of DNA and proteins from archaeological dental calculus. *Journal of Archaeological Science* 118, 105135. <http://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105135>
- Fiorin, E. – Roberts, C. A. – Baldoni, M. – Connelly, E. – Lee, C. – Ottoni, C. – Cristiani, E. 2024: First archaeological evidence for ginger consumption as a potential medicinal ingredient in a late medieval leprosarium at St Leonard, Peterborough, England. *Scientific Reports* 14(1), 2452. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52422-8>
- Fialová, D. – Drozdová, E. – Skoupý, R. – Mikulík, P. – Klíma, B. 2017a: Scanning Electron Microscopy of Dental Calculus from the Great Moravian Necropolis Znojmo-Hradiště. *Anthropologie: International Journal of the Science of Man* 55(3), 343–351.
- Fialová, D. – Skoupý, R. – Drozdová, E. – Paták, A. – Piňos, J. – Šín, L. – Beňuš, R. – Klíma, B. 2017b: The Application of Scanning Electron Microscopy with Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDX) in Ancient Dental Calculus for the Reconstruction of Human Habits. *Microscopy And Microanalysis: The Official Journal Of Microscopy Society Of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society Of Canada* 23(6), 1207–1213. <https://doi.org/10.1017/S1431927617012661>
- Fialová, D. – Brzobohatá, K. – Drozdová, E. – Skoupý, R. – Chocholová, E. – Krzyžánek, V. – Světlík, I. – Miranda, D. D. – Fernández, M. G. – Rivero, A. R. – Begeerock, A.-M. 2024: New insights to reveal the possible Guanche origin of the Cuban mummy of the „Peruvian Miner“. *Anthropologie* 62(2), 97–110. <https://doi.org/10.26720/anthro.24.03.27.1>
- Forshaw, R. 2022: Dental calculus – oral health, forensic studies and archaeology: a review. *British Dental Journal* 233, 961–967. <http://doi.org/10.1038/s41415-022-5266-7>
- Fotakis, A. K. – Denham, S. D. – Mackie, M. – Orbegezo, M. I. – Mylopotamitaki, D. – Gopalakrishnan, S. – Sicheritz-Pontén, T. – Olsen, J. V. – Cappellini, E. – Zhang, G. – Christophersen, A. – Gilbert, M. T. P. – Vågene, Å. J. 2020: Multi-omic detection of *Mycobacterium leprae* in archaeological human dental calculus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375(1812), 20190584. <http://doi.org/10.1098/rstb.2019.0584>
- Lalueza Fox, C. – Juan, J. – Albert, R. M. 1996: Phytolith analysis on dental calculus, enamel surface, and

- burial soil: Information about diet and paleoenvironment. *American Journal of Physical Anthropology* 101(1), 101–113. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199609\)101:1<101::AID-AJPA7>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199609)101:1<101::AID-AJPA7>3.0.CO;2-Y)
- Geber, J. – Tromp, M. – Scott, A. – Bouwman, A. – Nanni, P. – Grossmann, J. – Hendy, J. – Warinner, C. 2019: Relief food subsistence revealed by microparticle and proteomic analyses of dental calculus from victims of the Great Irish Famine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(39), 19380–19385. <http://doi.org/10.1073/pnas.1908839116>
- Gismondi, A. – Baldoni, M. – Gnes, M. – Scorrano, G. – D'Agostino, A. – Di Marco, G. – Calabria, G. – Petrucci, M. – Müldner, G. – Von Tersch, M. – Nardi, A. – Enei, F. – Canini, A. – Rickards, O. – Alexander, M. – Martínez-Labarga, C. 2020: A multidisciplinary approach for investigating dietary and medicinal habits of the Medieval population of Santa Severa (7th–15th centuries, Rome, Italy). *PLOS ONE* 15(1), e0227433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227433>
- Hardy, K. – Blakeney, T. – Copeland, L. – Kirkham, J. – Wrangham, R. – Collins, M. 2009: Starch granules, dental calculus and new perspectives on ancient diet. *Journal of Archaeological Science* 36(2), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.09.015>
- Hardy, K. – Buckley, S. – Collins, M. J. – Brothwell, D. – Copeland, L. – García-Tabernero, A. – García-Vargas, S. – de la Rastilla, M. – Lalueza-Fox, C. – Huguet, R. – Bastir, M. – Santamaría, D. – Madella, M. – Wilson, J. – Fernández Cortés, Á. – Rosas, A. 2012: Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* 99(8), 617–626. <https://doi.org/10.1007/s00114-012-0942-0>
- Hendy, J. – Warinner, C. – Bouwman, A. – Collins, M. J. – Fiddyment, S. – Fischer, R. – Hagan, R. – Hofman, C. A. – Holst, M. – Chaves, E. – Klaus, L. – Larson, G. – Mackie, M. – McGrath, K. – Mundorff, A. Z. – Radini, A. – Rao, H. – Trachsel, C. – Velsko, I. M. – Speller, C. F. 2018: Proteomic evidence of dietary sources in ancient dental calculus. *Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences* 285(1883), 20180977. <http://doi.org/10.1098/rspb.2018.0977>
- Henry, A. G. – Piperno, D. R. 2008: Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqā'i, Syria. *Journal of Archaeological Science* 35(7), 1943–1950. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2007.12.005>
- Hershkovitz, I. – Kelly, J. – Latimer, B. M. – Rothschild, B. M. – Simpson, S. W. – Polak, J. – Rosenberg, M. 1997: Oral bacteria in Miocene Sivapithecus. *Journal of Human Evolution* 33(4), 507–512.
- Chocholová, E. – Fialová, D. – Skoupý, R. – Drozdová, E. – Šín, L. 2018: Detekce povrchové kontaminace historického zubního kamene skenovací elektronovou mikroskopií. *Česká antropologie. Česká společnost antropologická* 68 (1–2), 12–17.
- Chocholová, E. – Roudnický, P. – Potesil, D. – Fialová, D. – Krystofova, K. – Drozdova, E. – Zdrahal, Z. 2023: Extraction Protocol for Parallel Analysis of Proteins and DNA from Ancient Teeth and Dental Calculus. *Journal of Proteome Research* 22(10), 3311–3319. <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00370>
- Jeong, C. – Wilkin, S. – Amgalantugs, T. – Bouwman, A. S. – Taylor, W. T. T. – Hagan, R. W. – Bromage, S. – Tsolmon, S. – Trachsel, C. – Grossmann, J. – Littleton, J. – Makarewicz, C. A. – Krigbaum, J. – Burri, M. – Scott, A. – Davaasambu, G. – Wright, J. – Irmer, F. – Myagmar, E. – Boivin, N. – Robbeets, M. – Rühli, F. J. – Krause, J. – Frohlich, B. – Hendy, J. – Warinner, C. 2018: Bronze Age population dynamics and the rise of dairy pastoralism on the eastern Eurasian steppe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(48), E11248–E11255. <http://doi.org/10.1073/pnas.1813608115>
- Jersie-Christensen, R. R. – Lanigan, L. T. – Lyon, D. – Mackie, M. – Belstrøm, D. – Kelstrup, C. D. – Fotakis, A. K. – Willerslev, E. – Lynnerup, N. – Jensen, L. J. – Cappellini, E. – Olsen, J. V. 2018: Quantitative metaproteomics of medieval dental calculus reveals individual oral health status. *Nature Communications* 9(1), 4744. <http://doi.org/10.1038/s41467-018-07148-3>
- Jin, Y. – Yip, H. K. 2002: Supragingival calculus: formation and control. *Critical Reviews In Oral Biology And Medicine* 13(5), 426–441.
- Key, F. M. – Posth, C. – Krause, J. – Herbig, A. – Bos, K. I. 2017: Mining Metagenomic Data Sets for Ancient DNA: Recommended Protocols for Authentication. *Trends in Genetics* 33, 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.05.005>
- Knussmann, R. – Martin, R. 1988: *Anthropologie: Handbuch der vergleichenden Biologie des Menschen*. 4. Aufl. Stuttgart: Fischer. ISBN 978-3-437-30505-4.
- Li, Q. – Luo, K. – Su, Z. – Huang, F. – Wu, Y. – Zhou, F. – Li, Y. – Peng, X. – Li, J. – Ren, B. 2022: Dental calculus: A repository of bioinformation indicating diseases and human evolution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12, 1035324. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1035324>
- Lieverse, A. R. 1999: Diet and the aetiology of dental calculus. *International Journal of Osteoarchaeology* 9(4), 219–232. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1212\(199907/08\)9:4<219::AID-OA475>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1212(199907/08)9:4<219::AID-OA475>3.0.CO;2-V)
- Long, J. – Cai, Q. – Steinwandel, M. – Hargreaves, M. K. – Bordenstein, S. R. – Blot, W. J. – Zheng, W. – Shu, X. O. 2017: Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk. *Journal of Periodontal Research* 52(3), 636–643. <https://doi.org/10.1111/jre.12432>
- Madupe, P. P. – Koenig, C. – Patramanis, I. – Rütther, P. L. – Hlazo, N. – Mackie, M. – Tawane, M. – Krueger, J. – Taurozzi, A. J. – Troché, G. – Kibii, J. – Pickering, R. – Dickinson, M. – Sahle, Y. – Kgotleng, D. – Musiba, C. – Manthi, F. – Bell, L. – Duplessis, M. – Gilbert, C. – Zipfel, B. – Kuderna, L. F. K. – Lizano, E. – Welker, F. – Kyriakidou, P. – Cox, J. – Mollereau, C. – Tokarski, C. – Blackburn, J. – Ramos-Madrugal, J. – Marques-Bonet, T. – Penkman, K. – Zanolli, C. – Schroeder, L. – Racimo, F. – Olsen, J. V. – Ackermann, R. R. – Cappellini, E. 2023: Enamel proteins reveal biological sex and genetic variability within southern African Paranthropus [online]. *bioRxiv*. <http://doi.org/10.1101/2023.07.03.547326>
- Matsha, T. E. – Prince, Y. – Davids, S. – Chikte, U. M. E. – Erasmus, R. T. – Kengne, A. P. – Davison, G. M. 2020:

- Oral Microbiome Signatures in Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *Journal of Dental Research* 99(6), 658–665. <https://doi.org/10.1177/0022034520913818>
- Modi, A. – Pisaneschi, L. – Zaro, V. – Vai, S. – Vergata, C. – Casalone, E. – Caramelli, D. – Moggi-Cecchi, J. – Mariotti Lippi, M. – Lari, M. 2020: Combined methodologies for gaining much information from ancient dental calculus: testing experimental strategies for simultaneously analysing DNA and food residues. *Archaeological and Anthropological Sciences* 12(1), 10. <http://doi.org/10.1007/s12520-019-00983-5>
- Ozga, A. T. – Nieves-Colón, M. A. – Honap, T. P. – Sankaranarayanan, K. – Hofman, C. A. – Milner, G. R. – Lewis, C. M. – Stone, A. C. – Warinner, C. 2016: Successful enrichment and recovery of whole mitochondrial genomes from ancient human dental calculus. *American Journal of Physical Anthropology* 160(2), 220–228. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22960>
- Pap, I. – Tillier, A.-M. – Arensburg, B. – Weiner, S. – Chech, M. 1995: First Scanning electron microscope analysis of dental calculus from European Neanderthals: Subalyuk, (Middle Paleolithic, Hungary). Preliminary report. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* 7(1), 69–72. <https://doi.org/10.3406/bmsap.1995.2409>
- Power, R. C. – Salazar-García, D. C. – Wittig, R. M. – Henry, A. G. 2014: Assessing use and suitability of scanning electron microscopy in the analysis of micro remains in dental calculus. *Journal of Archaeological Science* 49, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.04.016>
- Preus, H. R. – Marvik, O. J. – Selvig, K. A. – Bennike, P. 2011: Ancient bacterial DNA (aDNA) in dental calculus from archaeological human remains. *Journal of Archaeological Science* 38, 1827–1831. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.03.020>
- Price, S. D. R. – Keenleyside, A. – Schwarcz, H. P. 2018: Testing the validity of stable isotope analyses of dental calculus as a proxy in paleodietary studies. *Journal of Archaeological Science* 91, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2018.01.008>
- Putrino, A. – Marinelli, E. – Galeotti, A. – Ferrazzano, G. F. – Ciribè, M. – Zaami, S. 2024: A Journey into the Evolution of Human Host-Oral Microbiome Relationship through Ancient Dental Calculus: A Scoping Review. *Microorganisms* 12(5), 902. <http://doi.org/10.3390/microorganisms12050902>
- Radini, A. – Nikita, E. – Buckley, S. – Copeland, L. – Hardy, K. 2017: Beyond food: The multiple pathways for inclusion of materials into ancient dental calculus. *American Journal of Biological Anthropology* 162(S63), 71–83. <http://doi.org/10.1002/ajpa.23147>
- Radini, A. – Tromp, M. – Beach, A. – Tong, E. – Speller, C. – McCormick, M. – Dudgeon, J. V. – Collins, M. J. – Rühli, F. – Kröger, R. – Warinner, C. 2019: Medieval women's early involvement in manuscript production suggested by lapis lazuli identification in dental calculus. *Science Advances* 5(1), eaau7126. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7126>
- Riboni, N. – Bianchi, F. – Mattarozzi, M. – Peracchia, M. – Meleti, M. – Careri, M. 2023: Ultra-high performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry for metabolomic analysis of dental calculus from Duke Alessandro Farnese and Maria D'Aviz. *Scientific Reports* 13(1), 8967. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36177-2>
- Rogóż, J. – Podbielska, M. – Szpyrka, E. – Wnuk, M. 2021: Characteristics of Dietary Fatty Acids Isolated from Historic Dental Calculus of the 17th- and 18th-Century Inhabitants of the Subcarpathian Region (Poland). *Molecules* 26(10), 2951. <https://doi.org/10.3390/molecules26102951>
- Sabin, S. – Fellows Yates, J. A. 2019: Dental Calculus Field-Sampling Protocol (Sabin version). <https://www.protocols.io/view/dental-calculus-field-sampling-protocol-sabin-vers-7vrhn56>
- Sawafuji, R. – Saso, A. – Suda, W. – Hattori, M. – Ueda, S. 2020: Ancient DNA analysis of food remains in human dental calculus from the Edo period, Japan. *PLOS ONE* 15(3), e0226654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226654>
- Scannapieco, F. A. 2005: Systemic Effects of Periodontal Diseases. *Dental Clinics* 49(3), 533–550. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.03.002>
- Scott, A. – Power, R. C. – Altmann-Wendling, V. – Artzy, M. – Martin, M. A. S. – Eisenmann, S. – Hagan, R. – Salazar-García, D. C. – Salmon, Y. – Yegorov, D. – Milevski, I. – Finkelstein, I. – Stockhammer, P. W. – Warinner, C. 2021: Exotic foods reveal contact between South Asia and the Near East during the second millennium BCE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(2). <http://doi.org/10.1073/pnas.2014956117>
- Simpson, K. T. – Thomas, J. G. 2016: Oral Microbiome: Contributions to Local and Systemic Infections. *Current Oral Health Reports* 3(1), 45–55. <https://doi.org/10.1007/s40496-016-0079-x>
- Sissons, C. H. – Wong, L. – Hancock, E. M. – Cutress, T. W. 1994: The pH response to urea and the effect of liquid flow in “artificial mouth” microcosm plaques. *Archives of Oral Biology* 39(6), 497–505. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(94\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0003-9969(94)90146-5)
- Stojanovski, D. – Živaljević, I. – Dimitrijević, V. – Dunne, J. – Evershed, R. P. – Balasse, M. – Dowle, A. – Hendy, J. – McGrath, K. – Fischer, R. – Speller, C. – Jovanović, J. – Casanova, E. – Knowles, T. – Balj, L. – Naumov, G. – Putica, A. – Starović, A. – Stefanović, S. 2020: Living off the land: Terrestrial-based diet and dairying in the farming communities of the Neolithic Balkans. *PLOS ONE* 15(8), e0237608. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0237608>
- Tang, L. – Wilkin, S. – Richter, K. K. – Bleasdale, M. – Fernandes, R. – He, Y. – Li, S. – Petraglia, M. – Scott, A. – Teoh, F. K. Y. – Tong, Y. – Tsering, T. – Tsho, Y. – Xi, L. – Yang, F. – Yuan, H. – Chen, Z. – Roberts, P. – He, W. – Spengler, R. – Lu, H. – Wangdue, S. – Boivin, N. 2023: Paleoproteomic evidence reveals dairying supported prehistoric occupation of the highland Tibetan Plateau. *Science Advances* 9(15), eadf0345. <http://doi.org/10.1126/sciadv.adf0345>
- Uchida-Fukuhara, Y. – Shimamura, S. – Sawafuji, R. – Nishiuchi, T. – Yoneda, M. – Ishida, H. – Matsumura, H. – Tsutaya, T. 2024: Palaeoproteomic investigation of

- an ancient human skeleton with abnormal deposition of dental calculus. *Scientific Reports* 14(1), 5938. <http://doi.org/10.1038/s41598-024-55779-y>
- Vasquez, A. A. – Ram, J. L. – Qazazi, M. S. – Sun, J. – Kato, I. 2018: Oral Microbiome: Potential Link to Systemic Diseases and Oral Cancer. In: Sun, J. – Dudeja, P. K., eds. *Mechanisms Underlying Host-Microbiome Interactions in Pathophysiology of Human Diseases. Physiology in Health and Disease*. Boston, MA: Springer US, 195–246. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7534-1_9
- Velsko, I. M. – Overmyer, K. A. – Speller, C. – Klaus, L. – Collins, M. J. – Loe, L. – Frantz, L. A. F. – Sankaranarayanan, K. – Lewis, C. M. Jr. – Martinez, J. B. R. – Chaves, E. – Coon, J. J. – Larson, G. – Warinner, C. 2017: The dental calculus metabolome in modern and historic samples. *Metabolomics* 13(134). <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1270-3>
- Velsko, I. M. – Fellows Yates, J. A. – Aron, F. – Hagan, R. W. – Frantz, L. A. F. – Loe, L. – Martinez, J. B. R. – Chaves, E. – Gosden, C. – Larson, G. – Warinner, C. 2019: Microbial differences between dental plaque and historic dental calculus are related to oral biofilm maturation stage. *Microbiome* 7(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0717-3>
- Výmazalová, K. – Vargová, L. – Horáčková, L. – Kala, J. – Přichystal, M. – Brzobohatá, K. – Fialová, D. – Skoupý, R. – Drozdová, E. – Vaničková, E. 2021: Soldiers fallen in the Battle of Austerlitz. *Archaeological and Anthropological Sciences* 13(11), 204. <https://doi.org/10.1007/s12520-021-01445-7>
- Warinner, C. – Hendy, J. – Speller, C. – Cappellini, E. – Fischer, R. – Trachsel, C. – Arneborg, J. – Lynnerup, N. – Craig, O. E. – Swallow, D. M. – Fotakis, A. – Christensen, R. J. – Olsen, J. V. – Liebert, A. – Montalva, N. – Fiddyment, S. – Mackie, M. – Canci, A. – Bouwman, A. S. – Rühli, F. – Gilbert, M. T. P. – Collins, M. J. 2014b: Direct evidence of milk consumption from ancient human dental calculus. *Scientific Reports* 4, 7104. <https://doi.org/10.1038/srep07104>
- Warinner, C. – Rodrigues, J. F. M. – Vyas, R. – Trachsel, C. – Shved, N. – Grossmann, J. – Radini, A. – Hancock, Y. – Tito, R. Y. – Fiddyment, S. – Speller, C. – Charlton, S. – Luder, H. U. – Salazar-García, D. C. – Eppler, E. – Seiler, R. – Hansen, L. H. – Castruita, J. A. S. – Barkow-Oesterreicher, S. 2014a: Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature Genetics* 46(4), 336–344. <https://doi.org/10.1038/ng.2906>
- Welker, F. – Ramos-Madrugal, J. – Kuhlwilm, M. – Liao, W. – Gutenbrunner, P. – De Manuel, M. – Samodova, D. – Mackie, M. – Allentoft, M. E. – Bacon, A.-M. – Collins, M. J. – Cox, J. – Lalueza-Fox, C. – Olsen, J. V. – Demeter, F. – Wang, W. – Marques-Bonet, T. – Cappellini, E. 2019: Enamel proteome shows that Gigantopithecus was an early diverging pongine. *Nature* 576(7786), 262–265. <http://doi.org/10.1038/s41586-019-1728-8>
- Weyrich, L. S. – Dobney, K. – Cooper, A. 2015: Ancient DNA analysis of dental calculus. *Journal of Human Evolution* 79, 119–124. <http://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.06.018>
- Weyrich, L. S. – Duchene, S. – Soubrier, J. – Arriola, L. – Llamas, B. – Breen, J. – Morris, A. G. – Alt, K. W. – Caramelli, D. – Dresely, V. – Farrell, M. – Farrer, A. G. – Francken, M. – Gully, N. – Haak, W. – Hardy, K. – Harvati, K. – Held, P. – Holmes, E. C. – Kaidonis, J. – Lalueza-Fox, C. – de la Rasilla, M. – Rosas, A. – Semal, P. – Soltysiak, A. – Townsend, G. – Usai, D. – Wahl, J. – Huson, D. H. – Dobney, K. – Cooper, A. 2017: Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature* 544, 357–361. <https://doi.org/10.1038/nature21674>
- Wilkin, S. – Ventresca Miller, A. – Taylor, W. T. T. – Miller, B. K. – Hagan, R. W. – Bleasdale, M. – Scott, A. – Gankhuyg, S. – Ramsøe, A. – Ulziibayar, S. – Trachsel, C. – Nanni, P. – Grossmann, J. – Orlando, L. – Horton, M. – Stockhammer, P. W. – Myagmar, E. – Boivin, N. – Warinner, C. – Hendy, J. 2020: Dairy pastoralism sustained eastern Eurasian steppe populations for 5,000 years. *Nature Ecology & Evolution* 4(3), 346–355. <http://doi.org/10.1038/s41559-020-1120-y>
- Ziesemer, K. A. – Mann, A. E. – Sankaranarayanan, K. – Schroeder, H. – Ozga, A. T. – Brandt, B. W. – Zaura, E. – Waters-Rist, A. – Hoogland, M. – Salazar-García, D. C. – Aldenderfer, M. – Speller, C. – Hendy, J. – Weston, D. A. – MacDonald, S. J. – Thomas, G. H. – Collins, M. J. – Lewis, C. M. – Hofman, C. – Warinner, C. 2015: Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification. *Scientific Reports* 5, 16498. <http://doi.org/10.1038/srep16498>