

Procjena dentalne dobi primjenom Ramanove spektroskopije

Osmani, Aziz

Doctoral thesis / Doktorski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:401380>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Aziz Osmani

**PROCJENA DENTALNE DOBI
PRIMJENOM RAMANOVE
SPEKTROSKOPIJE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Aziz Osmani

**PROCJENA DENTALNE DOBI
PRIMJENOM RAMANOVE
SPEKTROSKOPIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Marin Vodanović

izv. prof. dr. sc. Ozren Gamulin

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

School of dental medicine

Aziz Osmani

AGE ESTIMATION OF TEETH USING RAMAN SPECTROSCOPY

DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

izv. prof. dr. sc. Marin Vodanović

izv. prof. dr. sc. Ozren Gamulin

Zagreb, 2020.

Rad je ostvaren u Zavodu za dentalnu antropologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za fiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Marin Vodanović, Zavod za dentalnu antropologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Suvoditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ozren Gamulin, Zavod za fiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskoj jezika: Helena Buljan, mag. educ. philol. croat.

Lektor engleskog jezika: Petra Pintarić, prof. eng. jezika

Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:

(za svakog člana Povjerenstva naknadno se rukom na za to predviđeno mjesto upisuju ime i prezime, akademsko zvanje i ustanova)

1. Prof. dr. sc. Hrvoje Brkić, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Ivana Savić Pavičin, član
3. Izv. prof. dr. sc. Jelena Dumančić, član
4. Dr. sc. Mario Novak, član
5. Prof. dr. sc. Sanja Dolanski-Babić, član
6. Izv. prof. dr. sc. Katica Prskalo, zamjena

Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

(za svakog člana Povjerenstva naknadno se rukom na za to predviđeno mjesto upisuju ime i prezime, akademsko zvanje i ustanova)

1. Prof. dr. sc. Hrvoje Brkić, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Ivana Savić Pavičin, član
3. Izv. prof. dr. sc. Jelena Dumančić, član
4. Prof. dr. sc. Mario Šlaus, član
5. Prof. dr. sc. Sanja Dolanski-Babić, član
6. Doc. dr. sc. Danijela Marović, zamjena

Datum obrane rada: 16.02.2021. g. (upisuje se naknadno rukom)

Rad sadrži: 119 stranica
5 tablica
42 slike
1 CD

Rad je vlastito autorsko djelo koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

Zahvala

Zahvaljujem mentorima, izvanrednom profesoru, dr. Marinu Vodanoviću te izvanrednom profesoru dr. Ozrenu Gamulinu, uz osoblje Katedre za fiziku i biofiziku koji su omogućili korištenje spektrometra uz uvijek spremne riječi ohrabrenja te stalnu spremnost za pomoć.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji koji su mi bili konstantna podrška, puni razumijevanja i ljubavi. Bez njih ovaj rad ne bi bio moguć.

Sažetak

PROCJENA DENTALNE DOBI PRIMJENOM RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE

U ovom radu istražena je mogućnost primjene Ramanove spektroskopije za forenzičko određivanje dobi. Ispitani uzorak sačinjen je od 71 zuba od donora starosne dobi između 11 i 76 godina. Pri izboru zubi za ispitivanje nisu primjenjivani specifični kriteriji; zubi zahvaćeni različitim patološkim promjenama namjerno su uključeni kako bi se simulirao realističan forenzički scenarij. Ramanovi spektri snimljeni su s površine zubi bez prethodne obrade, u skladu s nedestruktivnom pripremom uzoraka koja se općenito preferira u forenzičkim znanostima. Kako bi se ispitala iskoristivost različitih zubnih tkiva za određivanje dobi, Ramanovi spektri snimljeni su s tri različite pozicije na vanjskoj površini zuba: kruni, vratu i apeksu. Pomoću prikupljenih spektara tvrdih zubnih tkiva pripremljen je model određivanja starosne dobi metodom regresije glavnih komponentata. Cijeli spektri u rasponu od 3500–200 cm^{-1} upotrijebljeni su za analizu glavnih komponentata i pripremu modela za određivanje dobi pomoću regresije glavnih komponentata. Dobiveni rezultati modela za određivanje dobi potvrđeni su unakrsnom validacijom i usporedbom s rezultatima modela dobivenog parcijalnom regresijom najmanjih kvadrata. Prediktivne vrijednosti modela za određivanje dobi razlikovale su se ovisno o poziciji snimanja spektara. Najviši koeficijenti korelacije i najniže vrijednosti parametara pogreške su ostvareni u modelima temeljenim na spektrima s apeksa korijena zuba (R^2 vrijednosti od 0,84 za muške i 0,71 za ženske donore). Modeli temeljeni na ostalim kombinacijama spola donora i pozicije snimanja pokazali su niže vrijednosti R^2 , u rasponu od 0,17-0,59. Niske vrijednosti R^2 (0,18-0,24) zapažene su i kod zajedničkih modela koji su uključivali spektre oba spola. Optimalno određivanje dobi ostvareno je primjenom Ramanovih spektara snimljenih s cementa na apeksu. Kako bi se omogućilo optimalno predviđanje dobi pomoću ispitivanih modela, bilo je potrebno odvojeno analizirati muške od ženskih donora, s obzirom da je spajanje oba spola u jedinstveni model značajno smanjilo njegovu prediktivnu vrijednost ($R^2 = 0,29$). Zaključno, ovaj rad pokazao je mogućnost predviđanja dobi primjenom modela regresije glavnih komponentata uz korištenje Ramanovih spektara prikupljenih s vanjskih površina zubi zahvaćenih različitim patološkim procesima.

Ključne riječi: Ramanova spektroskopija, analiza glavnih komponentata, regresija glavnih komponentata, određivanje dobi, forenzička dentalna medicina

Summary

AGE ESTIMATION OF TEETH USING RAMAN SPECTROSCOPY

Aim: Age determination is one of the most common forensic procedures which has a wide range of applications, including identifications of accident victims, crime investigations, and social benefit regulations. To date, only a few studies have employed Raman spectrometry to relate the aging-dependent compositional changes in tooth tissues with the donor's age for forensic purposes. The available studies are limited to investigations of intact teeth, representing an ideal-case scenario which is quite different from forensic reality. Therefore, the aim of this study was to simulate a more realistic forensic scenario and evaluate the feasibility of Raman spectrometric age determination by using teeth affected by various pathologies. Also, tooth specimens were used for the collection of Raman spectra without any previous preparation, as non-destructive specimen handling is generally preferred in forensic investigations.

Materials and methods: The sample of 71 teeth used for this study was obtained by a random draw from the archive of the Department of Dental Anthropology of the School of Dental Medicine, University of Zagreb, Croatia. The age of tooth donors ranged between 11 and 76 years. The teeth had been extracted due to various indications, most common being periodontitis (51 %) and failed endodontic treatment (39 %). To simulate a forensic analysis of teeth at different post-extraction time periods, the time span between extraction and performing Raman spectrometric measurements ranged between 0.1 and 5.5 years. No special selection criteria were applied; teeth affected with various pathological processes were deliberately included to simulate a realistic sample.

Raman spectra were recorded using an FT-Raman accessory of the Spectrum GX spectrometer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with an Nd-YAG laser of 1064 nm wavelength. Each spectrum was recorded by averaging 100 scans in the spectral range between 3500 and 200 cm^{-1} and with a spectral resolution of 4 cm^{-1} . Spectra were collected from three distinct sites on each tooth: crown, neck, and apex. The spectra were stored in a dataset and connected with the donor's age and collection site.

All spectra were baseline corrected and normalized using the peak at 960 cm^{-1} (symmetric PO_4 stretching) to exclude possible differences caused by variations in recording conditions. Whole Raman spectra ($3500 - 200\text{ cm}^{-1}$) were used for principal component analysis (PCA) and principal component regression (PCR) with 3 to 7 principal components. PCR was used to establish a relationship between the recorded spectra and the donor's age. PCA and PCR were performed using a model built within Matlab 2010 (MathWorks, Natick, MA, USA) and its add-on PLS_Toolbox (Eigenvector Research, Manson, WA, USA). Separate PCA/PCR models were built according to the spectra collection site and donor's gender, resulting in the following six combinations: apex male, apex female, crown male, crown female, neck male, and neck female. Additionally, spectra from both genders were mixed together in three "joint" models that accounted only for the spectra collection site. All models were cross-validated using the Venetian blinds method.

Results: Raman spectra of dental hard tissues featured the inorganic part represented by vibrational bands in the wavenumber range of $1100 - 400\text{ cm}^{-1}$ (PO_4 and CO_3 vibrations) and the organic part represented in the range of $3100 - 1100\text{ cm}^{-1}$ (amide bands and C-H vibrations). The inorganic/organic ratio was considerably higher in spectra collected from the crown compared to the other two sites. The changes in the intensity of bands representing both the inorganic and organic components of tooth tissues indicated that it is possible to build a PCA model for distinguishing donor's age using Raman spectra. Also, the spectral changes occurring as a function of donor's age indicates that a PCR model for age determination can be built.

The predictive capabilities of PCR models for age determination differed according to different spectra collection sites. The highest coefficients of correlation and lowest error values were obtained in models based on apex spectra (R^2 values of 0.84 and 0.71 for males and females, respectively). Models based on other combinations of genders and spectra collection sites had comparably lower R^2 values, ranging from 0.17 to 0.59. Low R^2 values (0.18 – 0.24) were also obtained for joint models that were built using spectra from both genders.

The PCA models based on apex spectra showed a comparatively better separation of age groups than the models based on neck and crown spectra. Accordingly, the PCR age determination models based on apex spectra showed higher coefficients of determination and lower error values compared to the models based on neck and crown spectra.

Conclusions: This study showed that the age determination model based on principal component regression can be built using Raman spectra collected from surfaces of non-sound teeth without any previous preparation. The optimal age determination capability was attained by using Raman spectra collected from cementum at root apex, whereas spectra collected from mineralized tissues at the tooth neck and crown were less suitable. The age determination model based on apex spectra showed an optimal performance only when tooth donor genders were analyzed separately.

Keywords: Raman spectrometry; principal component analysis; principal component regression; age determination; forensic dentistry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Forenzička dentalna medicina i određivanje dobi	2
1.2. Povijesni razvoj forenzičkih postupaka za određivanje dobi pomoću zubi	3
1.3. Metode procjene dobi u forenzičkoj dentalnoj medicini	4
1.3.1. Metode temeljene na nicanju zubi	4
1.3.2. Radiološke metode	5
1.3.2.1. Atlas metoda	6
1.3.2.2. Sustav bodovanja	9
1.3.2.3. Radiološke metode za procjenu dobi kod odraslih	17
1.3.3. Morfološke metode	18
1.3.4. Biokemijske metode	20
1.4. Analiza glavnih komponenata i regresija glavnih komponenata	21
1.5. Raman spektroskopija	22
1.5.1. Primjena Raman spektroskopije u dentalnoj medicini	24
1.5.2. Primjena Raman spektroskopije za određivanje dobi	31
2. CILJEVI I HIPOTEZE	34
3. MATERIJALI I METODE	36
3.1. Ekstrahirani zubi	37
3.2. Raman spektroskopija	42
3.3. Analiza glavnih komponenata i regresija glavnih komponenata	43

4. REZULTATI	46
4.1. Ramanovi spektri tvrdih zubnih tkiva	47
4.2. Ramanovi spektri u ovisnosti o dobi donora	48
4.3. Rezultati PCR modela za određivanje dobi	49
4.4. Rezultati opterećenja za glavne komponente	51
4.5. Dijagrami regresije i PCA dijagrami raspršenja	56
4.6. PCA dijagrami raspršenosti za odvajanje spektara prema spolu donora	65
5. RASPRAVA	74
6. ZAKLJUČAK	92
7. LITERATURA	94
8. ŽIVOTOPIS	118

Popis skraćenica

FT	Fourierova transformacija (eng. <i>Fourier-transform</i>)
FT-Raman	Ramanova spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng. <i>Fourier-transform Raman</i>)
GLSW	poopćeno ponderiranje najmanjih kvadrata (eng. <i>generalized least squares weighting</i>)
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju (eng. <i>International organization for standardization</i>)
LV	latentna varijabla
Nd:YAG	itrij-aluminijev granat dopiran atomima neodimija (eng. <i>neodymium-doped yttrium aluminum garnet</i>)
PC	glavna komponenta (eng. <i>principal component</i>)
PCA	analiza glavnih komponenata (eng. <i>principal component analysis</i>)
PCR	regresija glavnih komponenata (eng. <i>principal component regression</i>)

PLSR regresija parcijalnih najmanjih kvadrata
(eng. *partial least squares regression*)

RMSEC korijen iz srednjeg kvadrata pogreške kalibracije
(eng. *root mean standard error of calibration*)

RMSECV korijen iz srednjeg kvadrata pogreške kalibracije unakrsne validacije
(eng. *root mean square error of cross-validation*)

1. UVOD

1.1. Forenzička dentalna medicina i određivanje dobi

Forenzičku dentalnu medicinu je Keizer-Nielson 1970. godine definirao kao granu forenzičke medicine koja se u interesu pravde bavi pravilnim rukovanjem i ispitivanjem zubnih dokaza te pravilnom procjenom i prezentacijom zubnih nalaza (1). Kada su tijela žrtava podvrgnuta promjenama koje su toliko opsežne da vanjske karakteristike ne daju nikakve upotrebljive informacije, zubi su često jedini način identifikacije (2).

Procjena dobi je suptilna disciplina forenzičkih znanosti koja čini važan dio svakog identifikacijskog procesa, pogotovo kada informacije koje se odnose na pokojnika nisu dostupne. Tvrda zubna tkiva mogu se oduprijeti propadanju i razgradnji mnogo nakon gubitka drugih tkiva (3). Ovo svojstvo učinilo je zube korisnim materijalima za procjenu varijacija u ishrani, ekspresiji metaboličkih bolesti i određivanju dobi u vrijeme smrti (4).

Terminološki se razlikuju pojmovi biološke dobi i kronološke dobi (5). Biološka dob govori o stupnju razvoja pojedinih organa, organskih sustava i zrelosti osobe. Kronološka dob označava vrijeme koje je proteklo od rođenja osobe. Pojmovi kronološke i biološke dobi često se ne podudaraju zbog različitih varijacija u razvoju (6). Forenzička procjena kronološke dobi korisna je za različite svrhe, uključujući procese usvajanja djece, sudjelovanja sportaša u sportskim događanjima, ostvarivanje prava na državne naknade, postupke vezane uz imigraciju, kaznene postupke, te verifikaciju dobi kao kriterija za mirovinu, brak ili polazak u školu (7,8). Kronološku dob važno je odrediti zbog zakonskih razlika u odnosu prema maloljetniku i odrasloj osobi, posebno u slučaju kada ispitanik nema osobne dokumente ili drugi način identifikacije (9). U nekim društvima kronološka dob živih osoba ima veliko značenje zbog socijalnih olakšica, zapošljavanja i braka (10). Globalizacija je donijela probleme promjenjivog društva zbog olakšane mobilnosti stanovništva širom svijeta, stvarajući nove izazove za forenzičku medicinu (11). Posljednjih godina mnogobrojni migranti ulaze u zemlje visokog standarda, a kao jedan od najvažnijih postupaka njihova identificiranja je određivanje dentalne dobi očitavanjem s ortopantomograma (12,13).

Metode određivanja dobi pomoću skeleta mogu se koristiti za procjenu dobi, međutim pritom u obzir treba uzeti varijabilnost sazrijevanja kostiju koje je pod utjecajem niza okolišnih čimbenika (14). Čini se da je razvoj zuba pod jačom kontrolom genetike, dok je razvoj kosti više pod utjecajem čimbenika okoliša kao što su biomehanika, fiziološki stres i prehrana (15,16). Ljudska denticija slijedi pouzdanu i predvidljivu razvojnu sekvencu koja započinje oko četvrtog mjeseca nakon začeća i nastavlja se do početka trećeg desetljeća života kada se

dovršava razvoj svih trajnih zubi (17). Razvoj zubi općenito pokazuje manje varijabilnost od drugih razvojnih obilježja i bolje korelira s kronološkom dobi (18). Štoviše, tvrda zubna tkiva otpornija su na toplinske, kemijske i mehaničke utjecaje te su manje pogođena endokrinim poremećajima ili prehranbenim varijacijama od ostalih tkiva. Stoga tvrda zubna tkiva predstavljaju jedinstveni i prikladan materijal za forenzičku procjenu dobi (19).

Određivanje dentalne dobi neidentificiranih ljudskih trupala i ljudskih ostataka radi identifikacije koristi se kao tradicionalni postupak u forenzičkim istraživanjima. Osim u forenzičkim analizama, zbog postojanosti i očuvanosti zuba nakon smrti, metode određivanja dobi pomoću zubnih tkiva koriste se i u antropološkim, paleostomatološkim i paleoantropološkim istraživanjima (12,20). Pomoću dentalnih obilježja može se određivati i dob živih osoba, osobito ako pojedinci nastoje prikriti svoju kronološku dob i identitet (21).

1.2. Povijesni razvoj forenzičkih postupaka za određivanje dobi pomoću zubi

Zapisi o određivanju dobi živih ispitanika potječu iz starog Rima, gdje je erupcija drugih molara predstavljala kriterij za procjenu radne sposobnosti adolescenata (8). Prema legendi, Neronova ljubavnica Sabina nagovorila je Nerona da progna i ubije svoju tadašnju suprugu Klaudiju Oktaviju. Potom je njezinu glavu prepoznala po crnom prednjem zubu (22).

Najraniji poznati zapis o promjenama zubi koje se koriste kao indikatori dobi potječe s početka 19. stoljeća iz Engleske. Procjena dobi djece u tadašnjem je društvu imala važnu ulogu. Naime, tada je u Engleskoj bila definirana dob od 9 godina kao minimum starosti za zapošljavanje u pamučnim, vunanim ili pilanskim poslovima. Nadalje, djeca u dobi do 13 godina nisu smjela raditi više od 9 sati dnevno ili više od 48 sati tjedno. Zanimljivo je da je granica kaznene odgovornosti bila samo 7 godina (23). S obzirom da se prije 1837. godine nije vodio registar datuma rođenja, dob je često bilo moguće osporavati. Kako bi se izbjegli problemi povezani s takvom praksom, 1836. godine određeno je da se dobnu granicu za kaznenu odgovornost može procijeniti erupcijom trećeg molara (24).

Godine 1837. stomatolog E. Saunders je pred britanskim parlamentom predstavio svoj pamflet pod nazivom „*Teeth, a test of age*“ i ukazao na vrijednosti denticije za procjenu dobi (25). Izlaganje se temeljilo na njegovom istraživanju koje je obuhvaćalo dvije tisuće djece. Saunders je definirao tablicu za procjenu dobi prema kliničkoj vizualizaciji kronologije erupcije zuba; to je imalo velik društveni utjecaj i označio je početak forenzičke dentalne medicine utemeljene na znanstvenim dokazima.

Godine 1872. C. Wedl je opisao promjene koje nastaju s vremenom u trajnoj denticiji i koje mogu poslužiti za određivanje dobi. Spomenute promjene uključuju degeneraciju masnog tkiva, kalcifikacije, koloidne naslage, pigmentne nakupine u pulpnom tkivu, atrofije, smanjenje veličine pulpne komorice, povećanu debljinu cementa, atriciju i povećanu translucenciju tvrdih zubnih tkiva te makroskopske promjene boja zuba (26).

Suvremeno doba forenzičke dentalne medicine započelo uspješnom identifikacijom žrtava požara u Bazar de la Charité, koji se dogodio 4. svibnja 1897. godine u Rue Jean-Goujon u Parizu, pri čemu je poginulo 126 članova pariške aristokracije. Većina žrtava identificirana je vizualno ili pomoću osobnih predmeta. Međutim, za preostalih 30 žrtava koje nisu mogle biti identificirane drugim postupcima, primijenjena je identifikacija pomoću dentalnih obilježja (22).

1.3. Metode procjene dobi u forenzičkoj dentalnoj medicini

Među tradicionalnim metodama za određivanje dobi pomoću zubi načelno se razlikuju postupci primjenjivi kod djece i adolescenata te postupci primjenjivi kod odraslih ispitanika. Naime, kod djece i adolescenata moguće je koristiti faze razvoja i mineralizacije trajnih zuba. Stoga je određivanje dobi moguće provesti neinvazivnim postupcima pri kojima se klinička ili radiološka opažanja rasta i razvoja zuba koreliraju s približnom dobi ispitanika (6,10,21,27–30). Za razliku od određivanja dentalne dobi kod djece i adolescenata, što je brz, jednostavan i razmjerno precizan postupak, određivanje dentalne dobi u srednjoj i starijoj životnoj dobi zahtjevniji je postupak s manjom točnošću.

1.3.1. Metode temeljene na nicanju zubi

Metode za određivanje dobi kod djece temelje se na morfološkim i razvojnim promjenama krunskih i korijenskih dijelova zuba mliječne i trajne denticije (31). Spomenute promjene je načelno moguće pratiti na dva načina: radiografski i klinički vizualizacijom erupcije zuba. Klinički postupak za procjenu dentalne dobi temelji se na pojavi zuba u ustima. Klinička metoda je ekonomičnija i ne zahtijeva posebnu opremu (32). Erupcija zuba je jedna od promjena koje se mogu lako pratiti kroz faze koje uključuju formiranje zuba do njegovog konačnog izbijanja. Vrijeme erupcije zubi je prilično konstantno i procjena dobi pojedinca

pregledom zuba jedan je od prihvaćenih metoda određivanja dobi. Ova se činjenica može koristiti u utvrđivanju prosječne dobi erupcije zuba (33).

Dentalna dob može se procijeniti pomoću redoslijeda nicanja zubi ili pomoću rendgenskih snimaka na kojima se određuje stupanj kalcifikacije zuba. Međutim, na nicanje zuba utječu mnogi čimbenici kao što su nedostatak prostora, ankiloza, ektopični položaji zuba, rane ekstrakcije zubi te zaostali mliječni zubi (34). Svi navedeni čimbenici smanjuju preciznost određivanja dobi temeljem nicanja zubi. Nicanje se često izjednačava s pojavom zuba u usnoj šupljini, iako je to samo jedan stadij u kontinuiranom procesu (35). Osim toga, nicanje zubi ne može se pratiti između 3. i 6. godine života te nakon 13. godine života. Dakle, određivanje dobi temeljem nicanja zubi bilo je moguće samo u djece do 3 godine starosti (potpuna mliječna denticija), odnosno nakon dobi od 6 godina (nicanje prvog trajnog kutnjaka). Do sredine dvadesetog stoljeća, procjena dentalne zrelosti u djece određivala se prema izmjeni mliječnih i nicanju trajnih zuba.

Zbog navedenih ograničenja metode određivanja dobi koja se temelji isključivo na nicanju zubi, potrebni su drugi pristupi koji su primjenjivi na širu populaciju, po mogućstineovisno o dobi ispitanika. Mnogobrojne forenzičke metode određivanja dobi pomoću zubi općenito se dijele na radiološke, morfološke i biokemijske (36–38).

1.3.2. Radiološke metode

Radiologija igra nezamjenjivu ulogu u određivanju ljudske dobi (39). Primjena radiologije u forenzičkoj znanosti uvedena je 1896. godine, odnosno samo jednu godinu nakon otkrića rendgenskog zračenja i njegove forenzične primjene za vizualizaciju olovnih metaka unutar lubanje žrtve (40).

Radiološke metode su neinvazivne i relativno pouzdane, ali zahtijevaju specijalizirano osoblje i baždaren pristup (41). Ovisno o tome procjenjuje li se dob kod novorođenčadi, predškolske i školske djece, tinejdžera te mladih ili odraslih osoba, radiološke metode u obzir uzimaju različite pokazatelje poput stupnja razvoja i mineralizacije čeljusnih kostiju, kruna i korijenova zuba, nicanje zuba, stupanj resorpcije korijenova mliječnih zuba, stupanj otvorenosti apeksa zubnih korijenova, volumen pulpne komorice te omjer volumena pulpe i volumena zuba (42). Radiološke metode određivanja dobi relativno su jednostavne i uključuju identifikaciju stupnja mineralizacije na radiografskim slikama, nakon čega slijedi njihova usporedba sa standardnim stupnjem za procjenu približnog dobnog raspona (43,44).

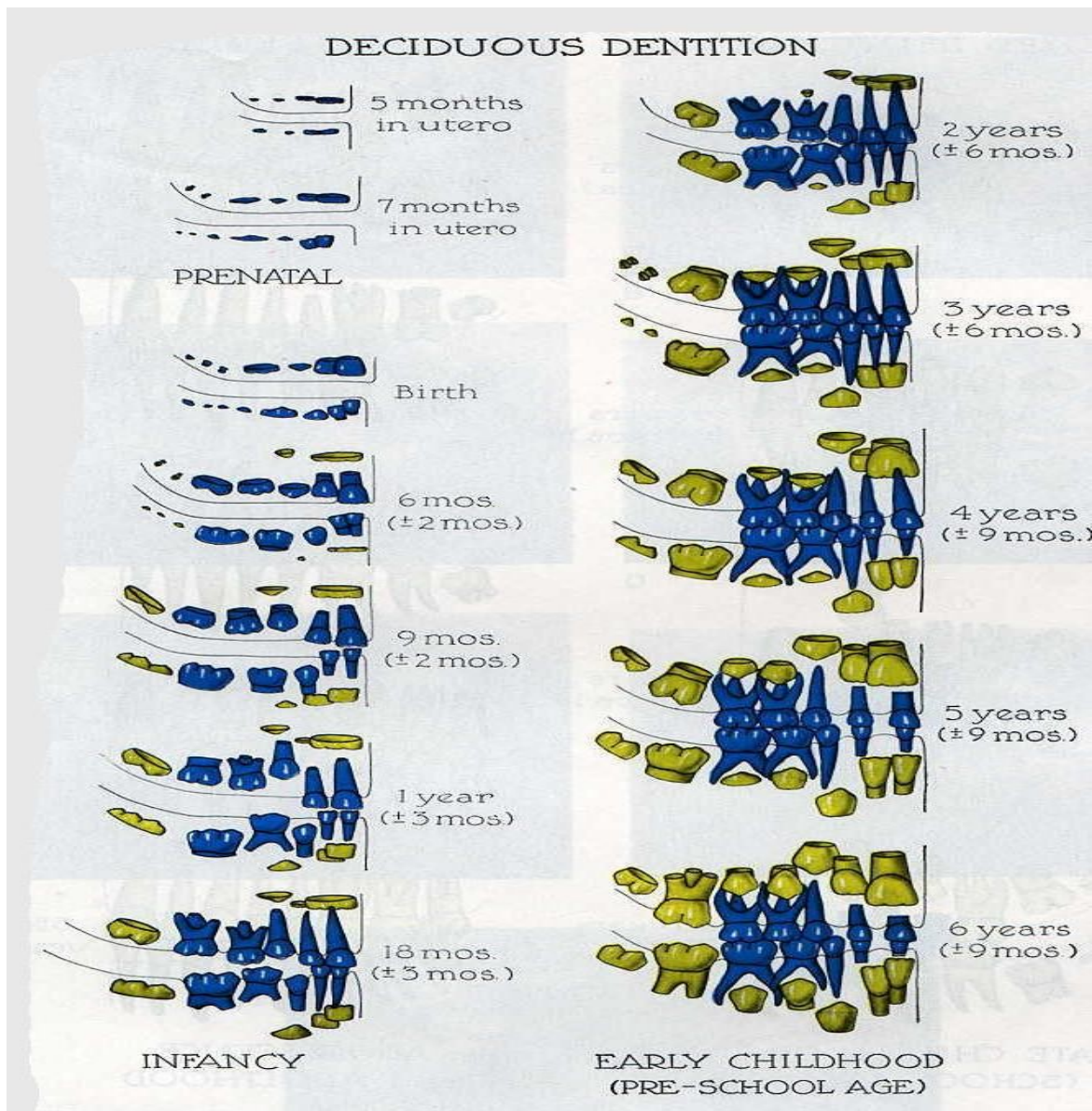
Za određivanje dobi pomoću rendgenskih snimaka koriste se dvije metode: "atlas metoda" u kojoj se uspoređuje razvoj i mineralizacija denticije s objavljenim standardima (45) te "metoda bodovanja", u kojoj se dentalni razvoj dijeli na različite faze kojima se dodjeljuju bodovi, a zatim se pomoću dobivenih bodova statističkim metodama procjenjuje dob (43,46). Radiografski, mineralizacija mliječnih zubi počinje u šesnaestom tjednu intrauterinog života. Prije početka mineralizacije zubnih zametaka, oni mogu biti vidljivi kao radiolucetna područja na radiogramu (47).

1.3.2.1. Atlas metoda

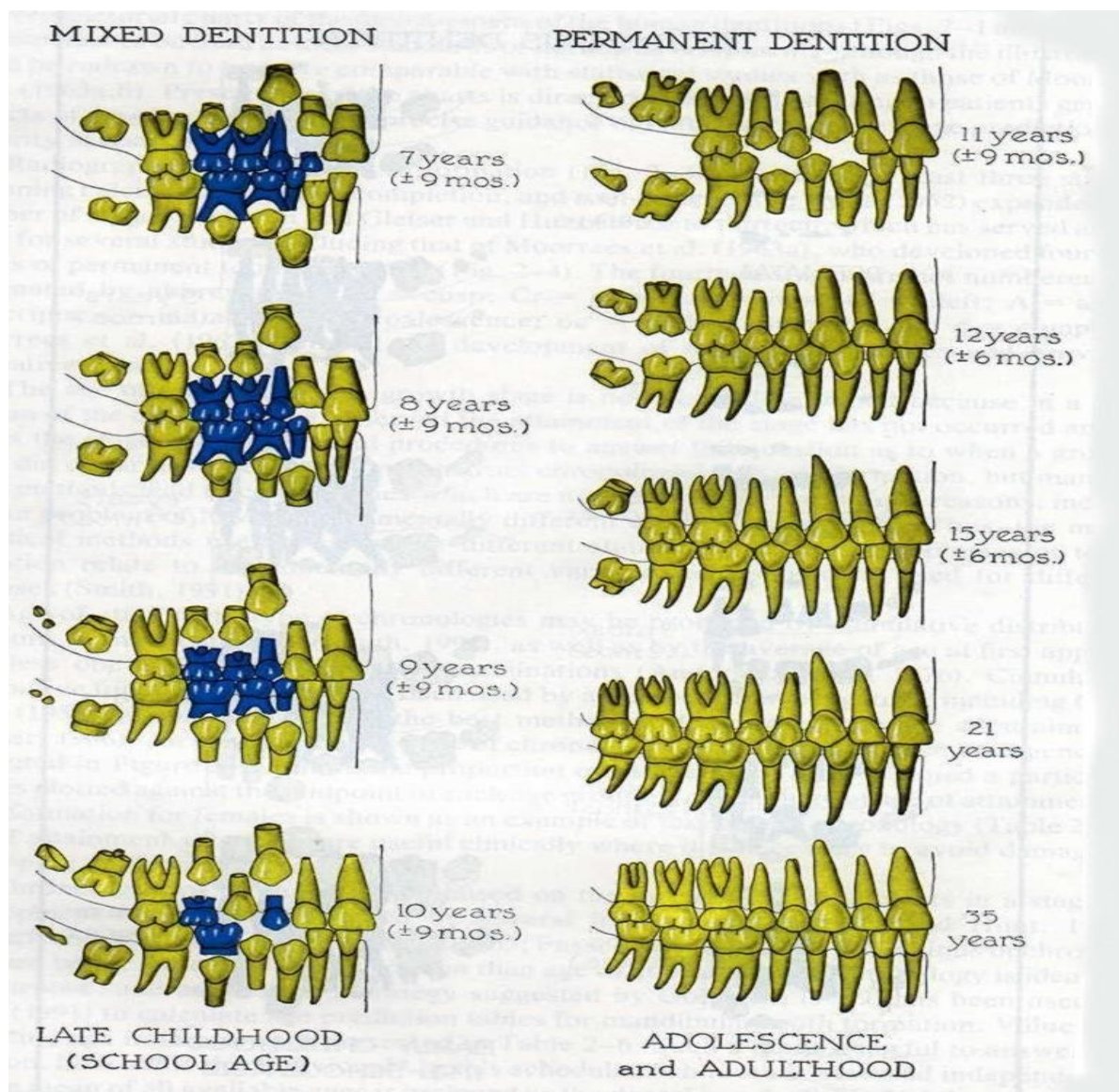
Atlas metoda temelji se na usporedbi radiografski zabilježenih promjena u mineralizaciji zubi s crtežima iz dentalnih atlasa koji predstavljaju obrise zubi u različitim razvojnim fazama (48).

Kraus i Jordan prvi su proučavali ranu mineralizaciju mliječnih zuba i prvih trajnih molara tijekom intrauterinog razdoblja. Razvoj je opisan u 10 stupnjeva, izraženih rimskim brojevima od I do X. Godine 1965. spomenuti autori proveli su detaljno istraživanje razvoja mliječnih zuba za vrijeme fetalnog razvoja, ali njihovo razdoblje praćenja završavalo je pri rođenju; stoga su procjene razvoja zuba bliže terminu rođenja podcjenjivale stvarnu dob (49). Schour i Massler su 1941. predstavili dijagram koji opisuje razvoj i erupciju ljudske denticije. Proučavali su razvoj mliječnih i trajnih zubi u sedam faza pomoću histoloških i radiografskih metoda (50). Predložena je numerička shema koja opisuje kronološku dob razvoja zuba u rasponu od 4 mjeseca *in utero* do 21 godine starosti. Američka stomatološka udruga (engl. American Dental Association) ažurirala je te grafikone i objavila ih 1982. godine.

Za određivanje dobi pomoću atlas metode koriste se panoramske snimke. Dentalna dob procjenjuje se temeljem razvoja zuba i stanja erupcije (51). Dijagram razvoja zuba prema Schouru i Massleru koristi se kao standard za usporedbu panoramskih radiograma. Dijagram se sastoji od niza 21 crteža koji obuhvaćaju razdoblje od intrauterinog do odrasle dobi (Slike 1 i 2). Svaki crtež prikazuje jednu stranu čeljusti s obrisima razvoja zuba i erupcije u odnosu na gingivnu liniju i odgovarajuću dob. Dobne kategorije uzastopne su do dvanaeste godine, nakon čega slijedi kategorija od 15 godina. U dobi od 21 do 35 godina, dijagram pokazuje potpuno formirane i iznikle zube. U ovom dijagramu dob je predstavljena u rasponima i odnosi se na oba spola, a dobiveni rezultati bili su točni za englesku djecu s pogreškom od oko 2 godine (50).



Slika 1. Razvoj mliječne denticije prema Schouru i Massleru. Preuzeto iz (51).



Slika 2. Razvoj mješovite i trajne denticije prema Schouru i Massleru. Preuzeto iz (51).

Moorees i suradnici određivali su razvoj zubnog tkiva kroz 14 faza mineralizacije u rasponu od formiranja kvržica do zatvaranja apikalnog otvora kod razvoja jednokorijenskih i višekorijenskih zubi, pri čemu su koristili panoramske ili lateralne kose radiograme. Nadalje, uzeli su u obzir spolne razlike i pripremili odvojene tablice za pojedini spol. Tablice omogućavaju dobnu procjenu od 6 mjeseci starosti do dobi koja odgovara razvoju trećeg mandibularnog molara (52). Naposljetku su AlQahtani i suradnici objavili tzv. London Atlas koji predstavlja najveći napredak u određivanju dobi u usporedbi s drugim dijagramima zuba, uz visoku razinu točnosti i ponovljivosti. Omogućena je dobna procjena za ispitanike u dobi od 28 tjedana *in utero* te za mlade ispitanike do 23 godine, a u sustav određivanja dobi uključen je i razvoj trećeg molara. Osim toga, London Atlas metoda može se koristiti i u

slučajevima kada spol ispitanika nije poznat, budući da sadrži spolno specifične i spolno neutralne tablice (53).

1.3.2.2. Sustav bodovanja

Sustav bodovanja uključuje različite metode koje definiraju faze mineralizacije zuba opažene na rendgenskim snimkama, te ih kodiraju prema unaprijed određenim vrijednostima (54).

Metoda prema Nolli (1960.)

Ova metoda temelji se na nizu pojedinačnih snimaka trajnih zubi od ukupno 25 dječaka i 25 djevojčica. Svaki set pojedinačnih snimaka sastojao se od lijeve i desne postranične snimke čeljusti, zagrizne snimke gornje i donje čeljusti te intraoralne snimke stražnjih zubi gornje čeljusti. Ukupan uzorak sastojao se od 1656 snimaka dječaka i 1746 snimaka djevojčica. Metoda za izračunavanje dentalne dobi sastoji se od više povezanih postupaka. Prvo se procjene razvojni stadiji prvih sedam zubi s lijeve strane donje čeljusti i prvih sedam zubi s lijeve strane gornje čeljusti. Za procjenu razvoja zubi koristi se sustav prema ljestvici razvojnih stadija označenih arapskim brojevima od 0 do 10 (Slika 3).

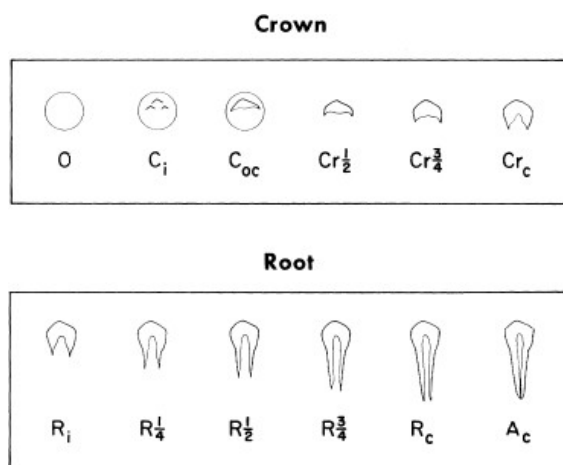


Slika 3. Crtež razvojnih stadija za određivanje dobi metodom prema Nolli. Preuzeto i prilagođeno iz (18).

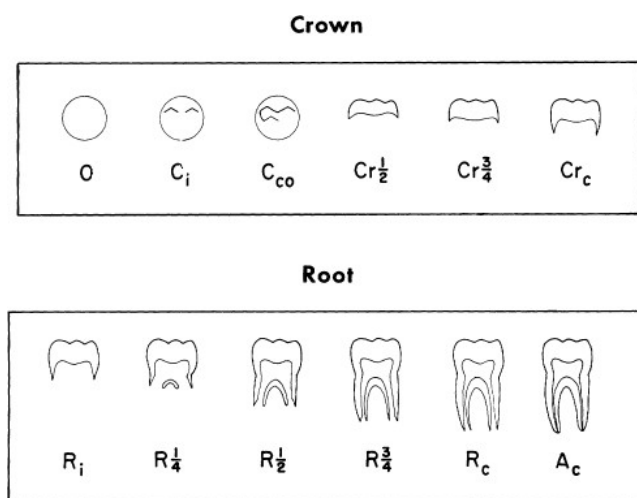
Uz 10 osnovnih stadija, predložena je i dodatna podjela svakog osnovnog stadija u 3 dodatna pod-stadija. Navedenim postupkom obuhvaćen je razvoj svih zubi gornje i donje čeljusti jedne strane lica, osim trećih kutnjaka. S obzirom da je ustanovljen podjednak razvoj istovrsnih zuba s obje strane čeljusti, za procjenu dobi mogu se koristiti zubi s bilo koje strane. Zbroj bodova svih četrnaest zubi (7 po čeljusti) se potom preračunava u dentalnu dob pomoću krivulja koje omogućavaju konverziju ukupnog broja bodova u dentalnu dob (18).

Metoda prema Haavikko (1970.)

U ovoj metodi mineralizacija zuba podijeljena je u 12 stadija od kojih se polovica odnosi na formiranje korijena, a polovica na formiranje krune zuba, uključujući i „Stadij 0“ koji označava pojavu zubne kripe. Ilustracije za određivanje stadija mineralizacije zuba odvojene su za jednokorijenske i višekorijenske zube (Slike 4 i 5). Metoda je razvijena na uzorku od 1162 ortopantomogramskih snimaka djece od 2 do 21 godine, od čega je bilo 615 muških i 547 ženskih ispitanika. Statističkom analizom podataka za sve trajne zube navedenog uzorka izračunati su i objavljeni medijani kronološke dobi uz raspon pouzdanosti od 90 % za sve trajne zube gornje i donje čeljusti (55).



Slika 4. Stadiji razvoja krune i korijena za jednokorijenske zube. Preuzeto iz: (55).

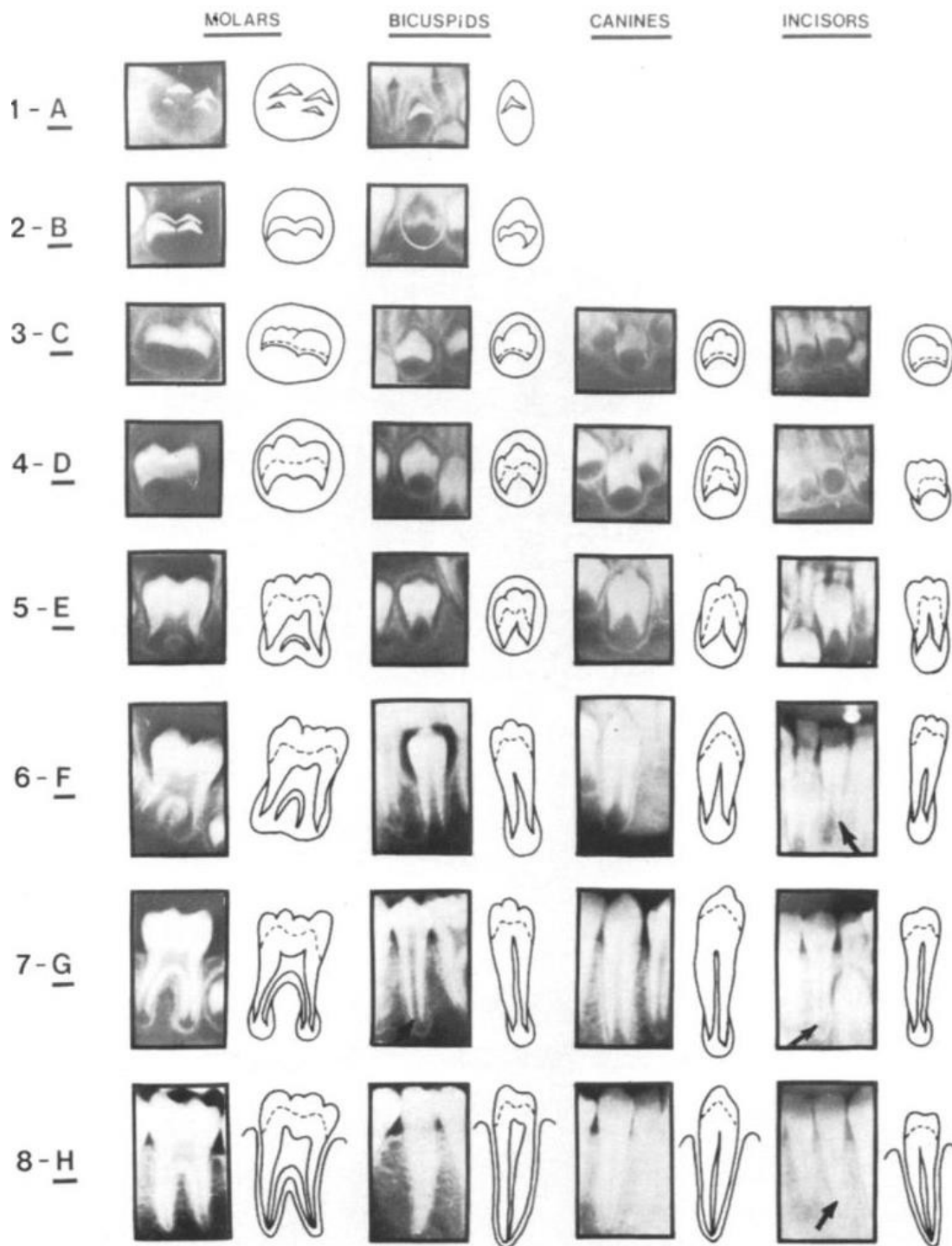


Slika 5. Stadiji razvoja krune i korijena za višekorijenske zube. Preuzeto iz: (55)

Postupak za izračun dentalne dobi prema Haavikko sastoji se od više povezanih postupaka. Na ortopantomogramskoj snimci svakog ispitanika ocijene se razvojni stadiji svih trajnih zubi, a zatim se za svaki zub u razvoju, koji nije dosegnuo stadij Ac, očita medijan dobi iz tablica. Procijenjena dob pacijenta izračuna se kao srednja dob svih zubi u razvoju (55).

Metoda prema Demirjian i sur. (1973.)

Metoda prema Demirjian i sur. temelji se na stadijima formiranja cijelog zuba. Naime, razvoj zuba prije pojave u usnoj šupljini odvija se u relativno izoliranoj okolini i stoga na njega utječe mnogo manje faktora nego tijekom erupcije. Spomenuta metoda razvijena je na temelju razvojnih stadija svih trajnih zubi (osim trećih kutnjaka) lijeve strane donje čeljusti na uzorku francusko-kanadske djece bjelačkog podrijetla. Osam stadija razvoja krune i korijena zuba označeno je slovima abecede od A do H. Svakom razvojnom stadiju pojedinog zuba pridružena je određena brojevana vrijednost (Slika 6). Zbroj odgovarajućih brojčanih vrijednosti za svih sedam zubi, uspoređena je s posebnim tablicama dentalne dobi s vrijednostima u rasponu od 0 do 100, odvojeno za djevojčice i dječake.



Slika 6. Pregled razvojnih stadija zubi prema Demirjaniu. Preuzeto iz (6).

Metoda određivanja dentalne dobi prema Demirjaniu jedan je od najjednostavnijih i najčešće korištenih postupaka procjene dobi (56). Njezina je prednost u jasno definiranim razvojnim stadijima i detaljno opisanim promjenama tijekom razvoja zuba, što smanjuje proizvoljnost pri bodovanju (6).

U nastavku istraživanja, Demirjian je 1976. objavio još tri prilagođena sustava za određivanje dentalne dobi. Prva metoda (Dem1976) odnosila se na istih sedam zubi lijeve strane donje čeljusti, druga metoda (Dem1976PM) temeljila se na četiri zuba (prvi i drugi pretkutnjak i prvi i drugi kutnjak), a treća (Dem1976IN2) se temeljila na izmijenjenom setu od četiri zuba (drugi sjekutić, prvi i drugi pretkutnjak i drugi kutnjak) (57).

Nedostatak metode prema Demirjian i sur. moguće je precjenjivanje dobi, a dodatne poteškoće proizlaze iz činjenice da se formule specifične za populaciju u kojoj su definirane ne mogu koristiti u cijelom svijetu (58). Točnost Demirjianove metode ispitana je na stanovnicima različitih europskih zemalja i etničkih skupina te analizom arheoloških nalaza. Mnoga od tih istraživanja pokazala su kako metoda precjenjuje kronološku dob preko više od jedne godine (59–61). Rezultati upućuju na razlike u usporedbi s francusko-kanadskim standardom, a razlozi tome su nedosljedni statistički postupci, ručno usklađivanje krivulja stanovništva, kao i razlike u okolišu te životnim i prehrambenim navikama populacije. Na temelju takvih rezultata, zaključeno je kako je potrebno provjeriti točnost izvornog francusko-kanadskog standarda prilagođenim referentnim tablicama zasebno za svaku populaciju. Stoga su pojedini istraživači razvili specifične formule primjenjive u različitim zemljama svijeta. Dodatno, razvijene su indirektna regresijske formule koje daju bolje dobne procjene od izvornih formula.

Jedan od primjera modifikacije izvorne Demirjianove metode je metoda prema Willemsu, koja se temelji na uzorku belgijske djece te koristi prilagođeni i pojednostavljeni sustav bodovanja. Formirane su nove standardizirane tablice u kojima su bodovi za svaki zub izraženi u godinama, čime je pojednostavljena primjena Demirjianovog postupka u kliničkoj praksi. Uz to, povećana je i točnost određivanja kronološke dobi (21).

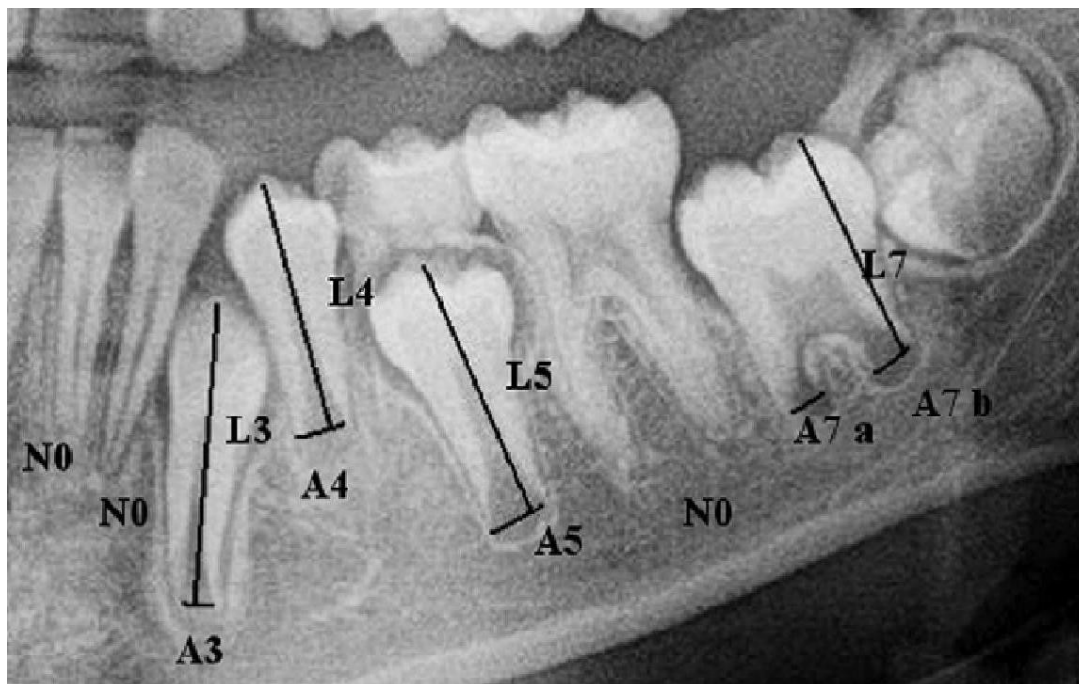
Metoda prema Chailletu (2005.)

Zbog odstupanja Demirjianovih tablica kod procjene dentalne dobi u različitim populacijama Chaillet je 2005. godine pripremio međunarodne tablice za određivanje dentalne dobi. Svrha takvog modela bila je mogućnost uporabe tablica u slučaju nepoznatog podrijetla određene osobe, što je osobito važno u forenzici. Na uzorku od 9577 ortopantomogramskih snimaka ispitanika u dobi od 2 do 25 godina iz osam različitih država određeni su stupnjevi mineralizacije na sedam zubi s lijeve strane donje čeljusti, prema Demirjianovoj 8-stupanjskoj skali (A–H). Ta skala pretvorena je u numeričku skalu (2–9), a dodan je i stupanj 0 koji označava fazu nezapočete mineralizacije zuba te stupanj 1 ili fazu kripe koja predstavlja

razdoblje vidljive koštane kripte bez zubnog zametka. Na taj način je svaki zub bio označen na 10-stupanjskoj skali vrijednostima od 0–9. Pomoću tih skala pripremljene su tablice i krivulje za procjenu dentalne dobi na međunarodnoj razini, u slučaju nepoznate etničke pripadnosti ispitanika (62).

Metoda prema Cameriereu (2006.)

Cameriereov izvorni postupak određivanja dentalne dobi na ortopantomogramu trajnih zubi u rastu i razvoju temelji se na mjerenju radiografskih projekcija otvorenih apeksa jednokorijenskih i dvokorijenskih zubi s jedne strane donje čeljusti, ne uključujući treće kutnjake (63). Postupak podrazumijeva snimanje ili skeniranje ortopantomograma i pohranu snimki u digitalni zapis pogodan za računalnu obradu (Slika 7). Postupak započinje određivanjem broja zubi sa završenim rastom korijena i zatvorenim apikalnim otvorom ($N0$). Nakon toga se na projekcijama jednokorijenskih zubi ($Ai, i=1-5$) mjeri međusobna udaljenost unutarnjih rubova otvorenog apeksa zuba, dok se na projekcijama dvokorijenskih zubi zbroje izmjereni razmaci na vrhu apeksa mezijalnog i distalnog korijena ($Ai, i=6,7$). Kako bi se postigla normalizacija izmjerenih vrijednosti otvorenih apeksa, one se podijele s izmjerenom duljinom zuba na ortopantomogramu ($Li, i=1-7$), čime se umanje utjecaj razlika u vertikalnom povećanju i kutovima projiciranja dentalnih struktura (64).



Slika 7. Prikaz mjerenja projekcija zuba za postupak prema Cameriereu. Kod jednokorijenskih zubi mjeri se razmak između unutarnjih rubova otvorenih apeksa, A_i , ($i=1-5$); kod dvokorijenskih zuba, A_i , ($i=6,7$), zbrajaju se širine obaju apeksa zuba ($A_i=A_{ia}+A_{ib}$); duljine zuba, L_i , ($i=1-7$); zubi s otvorenim apeksom, N_0 . Preuzeto iz (63).

Za određivanje dentalne dobi koristi se sljedeća jednadžba linearne regresije (65): Dentalna dob = $8,387 + 0,282 \cdot g - 1,692 \cdot x_5 + 0,835 \cdot N_0 - 0,116 \cdot s - 0,139 \cdot s \cdot N_0$, sa sljedećim varijablama: g = spol (1 za muški i 0 za ženski); x_5 = normalizirana vrijednost širine otvorenog apeksa drugog premolara ($x_5=A_5/L_5$); N_0 = broj zubi sa završenim rastom i razvojem korijena; s = zbroj normaliziranih vrijednosti otvorenih apeksa sedam zubi s lijeve strane donje čeljusti ($x_i=A_i/L_i$, $i=1, \dots, 7$).

Cameriere je u svojim istraživanjima za izračun dobi analizom sedam zubi donje čeljusti isti postupak iskoristio u istraživanju primjenjivosti razvoja trećih kutnjaka za procjenu punoljetnosti. Proveo je regresijsku analizu parametara donjih trećih kutnjaka u kojoj je zavisna varijabla poprimala vrijednosti punoljetnost/maloljetnost, a nezavisne varijable su bile indeks razvoja trećeg kutnjaka (I3M) i spol. Ustanovljeno je da nema značajnog utjecaja spola te da se I3M može samostalno koristiti kao prediktor punoljetnosti. I3M dobiva se sličnim postupkom kao i parametri za prve i druge kutnjake iz izvorne Cameriereove metode (A_i , $i=6,7$) u postupku za izračun dentalne dobi korištenjem sedam zubi. Analiza ROC krivulje (engl.

Receiver Operating Characteristics) pokazala je da se optimalno razdvajanje punoljetnih od maloljetnih osoba postiže uz graničnu vrijednost I3M od 0,08 (65).

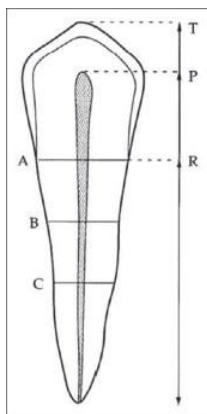
1.3.2.3. Radiološke metode za procjenu dobi kod odraslih

Razvoj trajne denticije završava erupcijom trećeg molara u dobi od 17 do 21 godine, nakon čega procjena dobi radiografskim metodama postaje otežana. Promjene koje se mogu koristiti za određivanje dobi nakon završetka erupcije zubi uključuju smanjenje volumena pulpne komorice i razvoj trećeg kutnjaka (66,67).

Procjena volumena pulpne komorice

Procjena dobi kod odraslih može se postići radiološkim određivanjem smanjenja volumena pulpne komorice koje je rezultat sekundarnog taloženja dentina, a proporcionalno je dobi ispitanika (68). Veličina pulpne komorice postupno se smanjuje zbog apozicije sekundarnog dentina, omogućavajući relativno pouzdanu procjenu dobi nakon 25 godina starosti. Odlaganje sekundarnog dentina odvija se na stijenkama pulpne komorice i korijenskih kanala tijekom cijelog životnog vijeka. Sekundarna apozicija dentina nije jednolična po cijeloj pulpnoj komorici, primjerice, kod molara je izraženija na krovu i dnu nego na postraničnim stijenkama, čime se više smanjuje visina nego širina pulpne komorice.

Jedna od najčešćih metoda određivanja dobi temeljena na promjenama volumena pulpne komorice je metoda prema Kvaalu, u kojoj se za šest mandibularnih i maksilarnih zubi izračunava omjer volumena pulpne komorice i zuba (68). Veličini pulpne komorice mjeri se na klasičnim periapikalnim rendgenskim snimkama gornjih sjekutića, drugih pretkutnjaka, lijevih i desnih donjih drugih sjekutića, očnjaka te prvih pretkutnjaka obostrano. Na rendgenskim snimkama mjerene su sljedeće udaljenosti: T: maksimalna duljina zuba, P: maksimalna duljina pulpe, R: duljina korijena na mezijalnoj površini, A: kvocijent širine korijena i širine pulpe u području caklinsko-cementnog spojišta, B: kvocijent širine korijena i širine pulpe između točaka A i C, C: kvocijent širine korijena i širine pulpe na razini između apeksa i caklinsko-cementnog spojišta (Slika 8). Iz izmjerenih parametara računaju se sljedeće vrijednosti: M: sredina svih pet odnosa (pulpa/zub) i W: sredina transverzalnih odnosa nivoa B i C, L: sredina dva vertikalna odnosa (zub/pulpa). Dob se računa uvrštavanjem posljednjih triju vrijednosti u sljedeću formulu: $Dob = 133,0 - 318,3M - 65,0(W - L)$.



Slika 8. Mjerenja potrebna za metodu prema Kvaalu. Preuzeto iz (68).

Razvoj trećeg kutnjaka

Treći kutnjak je jedini zub kod kojeg se razvojne promjene nastavljaju u kasnoj adolescenciji i ranoj odrasloj dobi. Klinički, razvoj trajne denticije završava erupcijom trećeg molara u dobi od 17–21 godine, nakon čega je procjena dobi radiografskim metodama otežana (69). Nakon tog razdoblja, zreli zubi se ne mogu koristiti za procjenu dobi jer nije poznato vrijeme u kojem su završili razvojne faze. Metoda praćenja kalcifikacije trećeg kutnjaka jedna je od rijetkih metoda koje se mogu koristiti za procjenu dobi nakon završetka dentalnog razvoja. U metodi prema Harris i Nortje, pet stadija razvoja korijena trećeg kutnjaka povezano je sa srednjom dužinom korijena i prosječnom dobi ispitanika (70). Na sličan način, metoda prema Van Heerdenu temelji se na procjeni razvoja mezijalnog korijena trećeg kutnjaka u pet stupnjeva pomoću ortopantomograma.

1.3.3. Morfološke metode

Morfološke metode temelje se na praćenju makroskopskih promjena na zubima koje se koriste kao parametri za određivanje dobi ispitanika (71). Klasična morfološka metoda prema Gustafsonu temelji se na ekstrakciji zuba iz alveole, sekciji i pripremi izbruska. Na izbrusku se promatra šest parametara: atricija (A), resorpcija alveolarne kosti (P), odlaganje sekundarnog dentina (S), odlaganje acelularnog cementa (C), translucencija korijena (T) i resorpcija korijena (R). Ovisno o stupnju izraženosti, svaki od navedenih parametara boduje se vrijednostima 0, 1, 2 ili 3. Zbroj svih bodova uvrštava se u sljedeću regresijsku formulu izvedenu na temelju rezultata dobivenih na zubima poznate dobi: Dob ispitanika = $11,43 + 4,56 \cdot (\text{zbroj bodova})$.

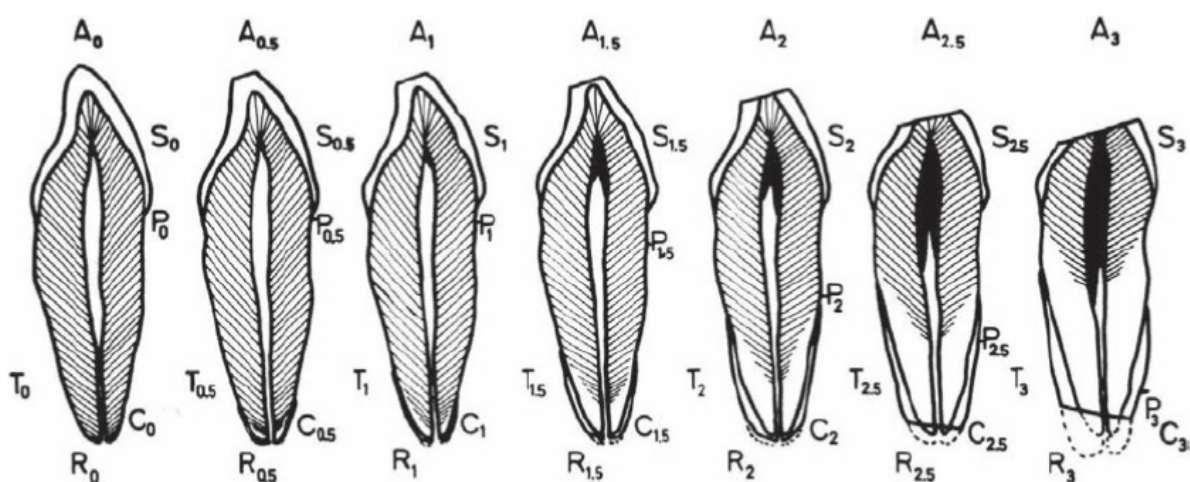
Gustafsonovim postupkom postižu se rezultati točnosti od +/- 9 godina u 99% slučajeva, uz prosječnu pogrešku od 3,6 godina (60).

Dalitz je 1962. godine modificirao Gustafsonovu metodu i umjesto dotadašnjeg sustava s 4 stupnja vrijednosti predložio sustav s 5 stupnjeva. Spomenuta modifikacija rezultirala je većom točnošću metode. Nadalje, rezultati su pokazali da je moguće zanemariti kriterij resorpcije korijena i formiranja acelularnog cementa. Preostali kriteriji, tj. atricija (A), resorpcija alveolarne kosti (P), odlaganje sekundarnog dentina (S) i translucencija korijena (T) kod 12 prednji zubi, pokazuju dobru korelaciju s dobi ispitanika, prema sljedećoj formuli (72): $Dob = 8,691 + 5,146 \cdot A + 5,338 \cdot P + 1,866 \cdot S + 8,411 \cdot T$.

Nedostatak ove metode je što ne uzima u obzir prekutnjake i kutnjake.

Nešto drukčija morfološka metodu koju su opisali su Bang i Ram koristi translucenciju dentina kao jedini prediktor za određivanje dobi. Prema njihovom modelu, dužina translucetne zone u milimetrima te se korelira s dobi ispitanika (73).

Još jednu u nizu modifikacija Gustafsonove metode predložio je Johanson 1971. godine, zadržavši šest promatranih parametara koji su graduirani u sedam stupnjeva (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0), kao što je prikazano na Slici 9. Dentalna dob se računa uvrštavanjem pojedinih vrijednosti u regresijsku formulu: $Dob = 11,02 + 5,14 \cdot A + 2,30 \cdot S + 4,14 \cdot P + 3,71 \cdot C + 5,57 \cdot R + 8,98 \cdot T$ (74).



Slika 9. Šest stadija promjena na zubima prema Johansonu. A: atricija, S: sekundarni dentin, P: parodontni pričvrstak, T: translucencija, C: cement, R: resorpcija korijena. Preuzeto iz (74).

Modifikacija Gustafsonove metode prema Maplesu koristi samo dva kriterija od izvorno korištenih šest: odlaganje sekundarnog dentina i translucenciju korijena. Redukcijom broja parametara nastojala se umanjiti pogreška istraživača. Uz to, ova metoda omogućava određivanje dobi korištenjem zubi sa slomljenim krunama i oštećenim cementom. Budući da atricija nije uključena kao prediktor dobi, metoda prema Maplesu je otpornija na varijabilnosti uslijed razlika u prehrambenim navikama (75).

Solheim je 1993. godine predložio modifikaciju Gustafsonove metode zadržavši pet izvornih parametara (atriciju, sekundarni dentin, resorpciju alveolarne kosti, odlaganje acelularnog cementa i translucencija korijena) te dodavši tri nova parametra koji neovisno o vrsti zubi dobro koreliraju s dobi ispitanika. Novi parametri bili su hrapavost površine, boja zuba i spol ispitanika (12).

Godine 1994. Kvaal i Solheim predstavili su kombiniranu, morfološku i radiološku metodu, a to je ujedno bila i posljednja metoda koja je iziskivala ekstrakciju zubi (76). U nastavku razvoja te metode, Kvaal i suradnici su 1995. godine predstavili metodu koja se temelji isključivo na radiološkim mjerenjima. Metoda se temelji na periapikalnim rendgenskim snimkama uz ispitivanje odnosa između kronološke dobi i dvodimenzionalne veličine pulpe u ispitanika starijih od 20 godina (68).

1.3.4. Biokemijske metode

Biokemijske metode za određivanje dobi temelje se na prirodnom procesu starenja koji inducira promjene u tkivima i organima na različitim razinama (77). Najpoznatije biokemijske metode određivanja dobi pomoću zubi temelje se na racemizaciji aminokiselina (78). Racemizacija aminokiselina je ireverzibilna reakcija prvog reda i relativno je brza u živim tkivima u kojima je metabolizam spor. Brzina racemizacije D i L enantiomera ostataka asparaginske kiseline u kolagenu dentina ovisi o vremenu. Racemizacija asparaginske kiseline proučavana je u cilju razvoja standarda za procjenu dobi kod odraslih osoba (79). Iako je racemizacija asparaginske kiseline pod utjecajem okolišnih čimbenika (ubrzava se povećanjem temperature), ipak je dovoljno stabilna za primjenu u procjeni dobi. Asparaginska kiselina ima najveću stopu racemizacije od svih amino kiselina i ostaje sačuvana tijekom starenja. Konkretno, L- enantiomer asparaginske kiseline se pretvara u D- enantiomer, stoga razine D- enantiomera u caklini, dentinu i cementnu rastu s godinama (80). Pokazalo se da omjer D / L enantiomera značajno korelira s dobi (81). Glavni nedostatak metoda određivanja dobi pomoću

racemizacije aminokiselina je invazivnost i cijena te potreba za specijaliziranom opremom i osobljem. Budući da je za ovu metodu bilo nužno ekstrahirati cijeli zub, Ritz i suradnici su 1995. godine predložili manje invazivan postupak za procjenu racemizacije pomoću uzoraka biopsije dentina iz kutnjaka, čime je metoda postala primjenjiva i na žive ispitanike (82).

1.4. Analiza glavnih komponenata i regresija glavnih komponenata

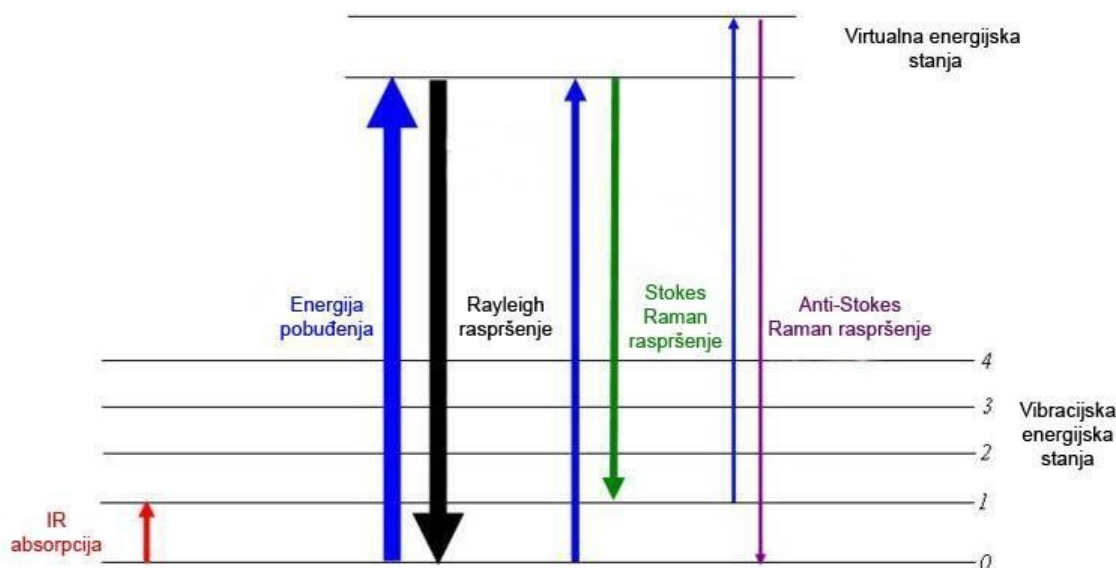
Analiza glavnih komponenata (PCA, od engl. *Principal Component Analysis*) je kemometrijska metoda koja pomoću statističkih ili matematičkih modela omogućuje obradu analitičko-kemijskih podataka bez potrebe za konkretnim fizikalnim modelom (83). Često se koristi za razne spektroskopske analize, između ostalog i za vibracijske spektroskopije, tj. infracrvenu i Raman spektroskopiju (84). Glavni cilj PCA metode pri obradi spektara je smanjenje dimenzionalnosti podataka. Naime, Ramanovi spektri sadrže veliku količinu informacija koje je teško istovremeno uzeti u obzir prilikom klasične analize pojedinih vibracijskih vrpca. S druge strane, PCA omogućava prepoznavanje najvažnijih informacija iz cjelovitih spektara i općenito smanjenje količine podataka (85). PCA se temelji na grupiranju seta podataka u manje odjeljke, pri čemu se nastoji zadržati što više informacija iz izvornog skupa podataka. Spomenuti odjeljci se formiraju tako da najbolje opisuju povezanost izvornih podataka, što olakšava interpretaciju rezultata. Glavne komponente (PC, od engl. *Principal Components*), predstavljaju linearne kombinacije svih varijabli i omogućavaju smanjenje dimenzionalnosti podataka. Pomoću ortogonalne transformacije se skup promatranja koreliranih varijabli transformira u skup vrijednosti linearno nekoreliranih varijabli. Tako nastaju glavne komponente koje su rangirane prema udjelu varijance iz izvornog skupa podataka. Primjerice, PC 1 predstavlja linearnu kombinaciju podataka koja sadržava najveći udio varijance, a nakon nje padajućim redom slijede PC 2, PC 3, itd. Svaka sljedeća glavna komponenta sadržava manji iznos varijacija od prethodne (86). Grafički prikaz opterećenja za pojedine glavne komponente (najčešće one s najvećim udjelom varijance, tj. PC 1 i PC 2) omogućava vizualni prikaz grupiranja, odnosno razdvajanja pojedinih grupa spektara. Spektri sa sličnim vrijednostima opterećenja su međusobno grupirani na dijagramu, dok se s porastom razlika u opterećenjima spektri međusobno udaljuju (87). Takav prikaz omogućava razlikovanje uzoraka prema karakteristikama njihovih spektara, koji pak odražavaju razlike u strukturi i kemijskom sastavu. Pritom se razdvajanje provodi isključivo na temelju karakteristika spektara, bez primjene konkretnog fizikalnog modela.

Regresija glavnih komponenti (PCR, od engl. *Principal Component Regression*) predstavlja metodu multivarijatne statističke analize koja se temelji na smanjenom broju dimenzija u linearnoj regresiji (88). Pomoću prethodno opisane metode PCA, skup koreliranih varijabli transformira se u manji broj izvedenih nekoreliranih varijabli (89) na kojima se provodi regresija najmanjih kvadrata i računaju parametri modela. PCR služi kao metoda rješavanja multikolinearnosti i smanjivanja varijance, a omogućava redukciju izvorno velikog broja varijabli do malog broja najvažnijih varijabli, što je korisno za izradu modela koji omogućava predviđanje budućih opažanja (90). Naime, dobiveni rezultati glavnih komponenti u PCR mogu se iskoristiti kao regresijske varijable za izgradnju predikcijskog modela. PCA i PCR metode su osobito korisne kod visoko kolinearnih nezavisnih varijabli jer omogućavaju učinkovito smanjenje dimenzionalnosti pri izradi modela.

1.5. Raman spektroskopija

Raman spektroskopija temelji se na neelastičnom nekoherentnom raspršenju svjetlosti koje su 1928. godine otkrili indijski fizičari Sir Chandrasekhara Venkata Raman i Kariamanickam Srinivasa Krishnan. Ukoliko na neki materijal pada snop monokromatske svjetlosti, u raspršenoj se svjetlosti, osim upadne frekvencije, opaža niz novih spektralnih linija koje se nazivaju Ramanovim linijama (91). Ramanova spektroskopija je tehnika koja se koristi za promatranje vibracijskih, rotacijskih i drugih niskofrekventnih stanja u sistemu koji se oslanja na Ramanovo raspršenje monokromatske svjetlosti i može se koristiti za analizu površine, tankih slojeva, prahova, svih vrsta otopina i plinova (92). Ramanov spektar smatra se „otiskom prsta” pojedine molekule (93). U usporedbi s elastičnim raspršenjem, Ramanovo raspršenje ima relativno nizak intenzitet jer se na taj način raspršuje samo 1 na 10^6 – 10^8 fotona (94). Međutim, zahvaljujući modernoj tehnologiji te razvoju lasera i osjetljivih detektora, danas se ovaj proces može koristiti za spektroskopska istraživanja različitih materijala (95–97).

Pri Ramanovom raspršenju dolazi do promjene energije fotona za iznos koji odgovara energiji pojedinog vibracijskog prijelaza (Slika 10). U Stokesovu procesu, koji odgovara apsorpciji, raspršenim fotonima se snižava frekvencija, zbog prelaska energija sa pobuđenog fotona na molekulu. U anti-Stokesovu procesu, koji odgovara emisiji, raspršenim fotonima povećava se frekvencija zbog primanja energije oslobođene iz molekula prilikom prijelaza u osnovno stanje (98). Međutim, najveći broj fotona (99,99 %) zadržava svoju izvornu frekvenciju i raspršuje se elastično u tzv. Rayleighovu raspršenju (99).



Slika 10. Promjene u energijama neelastično raspršenih fotona pri Stokesovu i anti-Stokesovu procesu te usporedba s elastičnim (Rayleighovim) raspršenjem. Preuzeto iz (99).

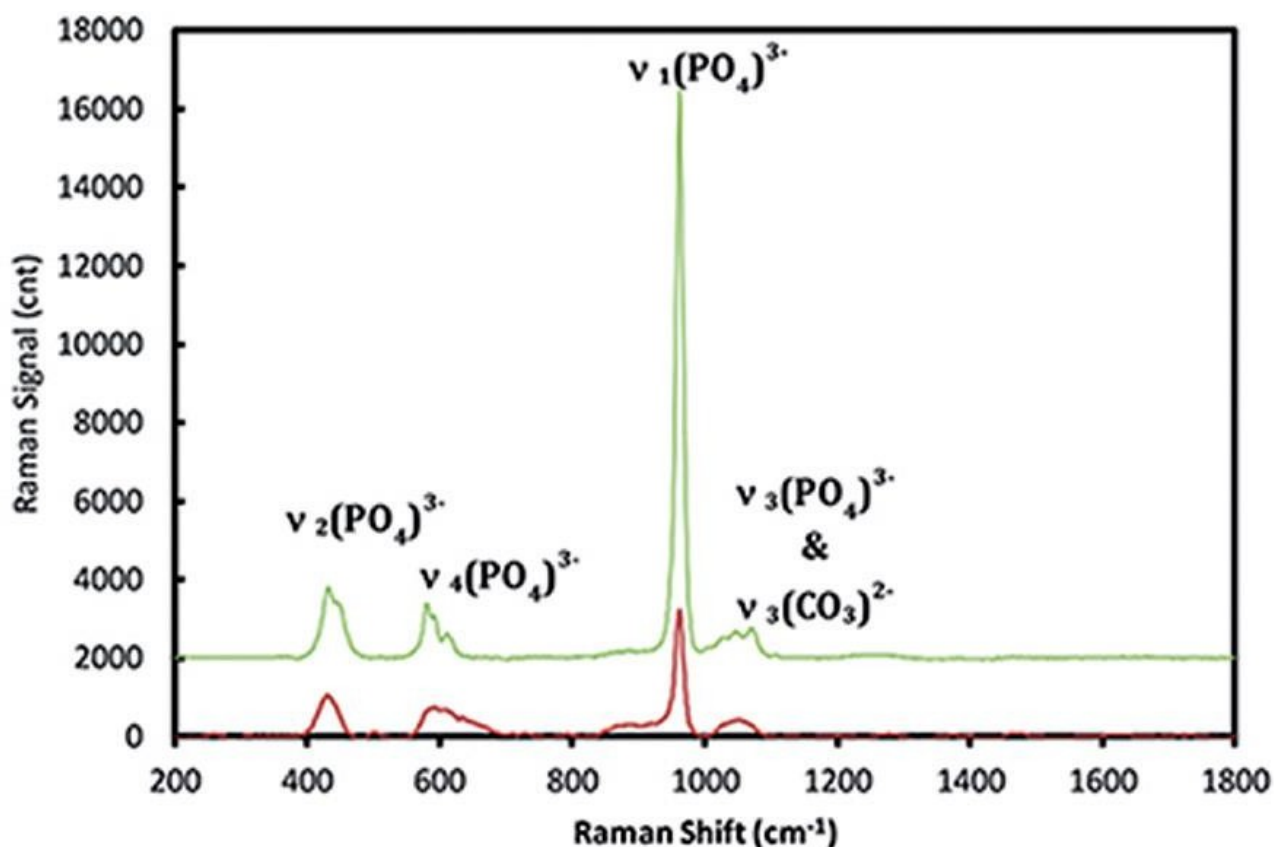
Ramanova spektroskopija široko se primjenjuje u kemiji jer su vibracijske informacije specifične za kemijske veze u molekulama, odnosno može se reći da ne postoje dvije različite molekule s istim vibracijama (100). Ramanova spektroskopija ima prednost nad infracrvenom spektroskopijom jer se Ramanovi spektri mogu snimati i u vodenim otopinama (101). Spomenuta prednost je osobito važna za primjenu u biomedicini jer tkiva sadržavaju veliku količinu vode, a voda ima minimalnu interferenciju s Ramanovim spektrima (102). Snimanje Ramanovih spektara provodi u konfiguraciji povratnog raspršenja i tkiva se mogu analizirati u svojem nativnom stanju uz malo ili nimalo pripreme. U tijeku su istraživanja kojima je cilj, uz uobičajene laboratorijske instrumente, proizvesti i komercijalizirati napredne i osjetljive sonde za intraoralnu primjenu (103).

Ramanova spektroskopija omogućava mapiranje mineralnog sastava tvrdih zubnih tkiva, tako da se dobiveni podaci mogu usporediti s referentnim vrijednostima karakterističnim za zdrava zubna tkiva (104). Ramanov spektar bilo koje mineralne strukture, uključujući zube, može otkriti detaljan kemijski sastav i stoga omogućava visoko selektivna istraživanja. Analize spektara u konačnici su usmjerene identifikaciji specifičnih vrpci koje se koriste za karakterizaciju strukture i sastava istraživnog materijala (105). Glavne prednosti Raman

spektroskopije su neinvazivnost, nedestruktivnost i reproducibilnost te mogućnost korištenja uzorka bez potrebe za prethodnom pripremom (106).

1.5.1. Primjena Raman spektroskopije u dentalnoj medicini

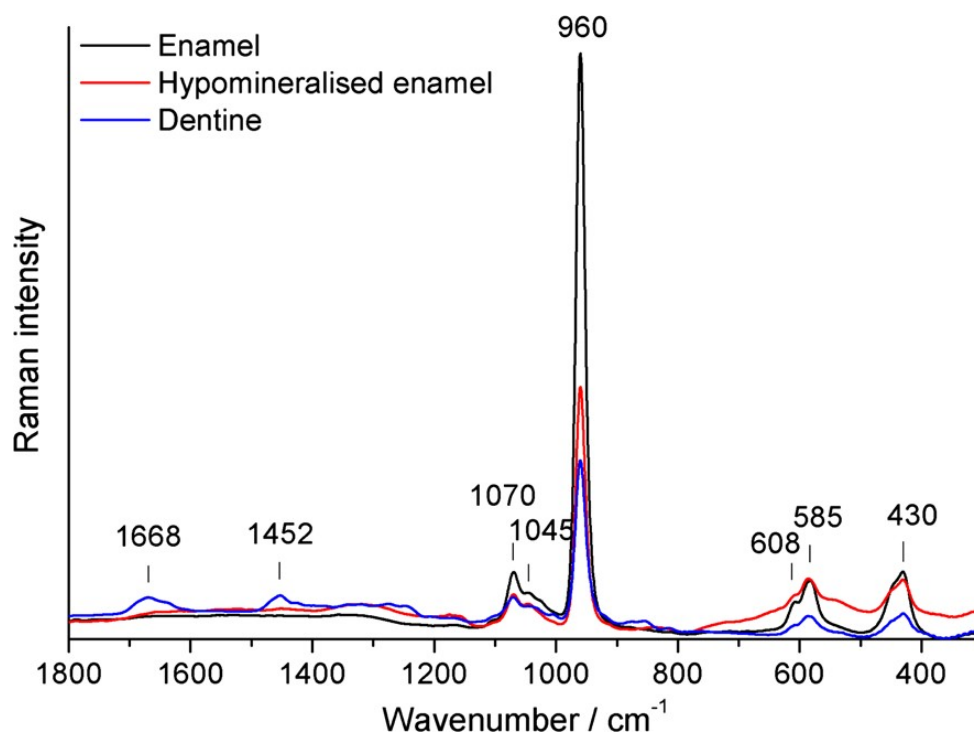
Ramanova spektroskopija se u istraživanjima na području dentalne medicine koristi za različite namjene, prije svega za analizu tvrdih zubnih tkiva (107–113) i dentalnih materijala (114–118). Budući da su vrpce koje odgovaraju vibracijama PO_4 skupina u Ramanovom spektru dobro definirane, Ramanova spektroskopija omogućava kvantifikaciju stupnja mineralizacije cakline (119–121). Mjerenje mineralnog sastava kod zdravih zubi može pomoći u određivanju rizika pojedinih ispitanika od razvoja zubnog karijesa (119). Ramanova spektroskopija je pokazala visoku osjetljivost za mjerenje mineralnog sastava tvrdih zubnih tkiva, stoga se već i razmjerno male razlike u mineralizaciji odražavaju na spektar. Primjerice, velike razlike u intenzitetu vrpce na 960 cm^{-1} uvjetovane razvojnim razlikama u stupnju mineralizacije zdravih sjekutića upućuju na široki mjerni raspon i mogućnost praćenja malih promjena (Slika 11).



Slika 11. Ramanovi spektri zdravih sjekutića s različitim stupnjevima mineralizacije.

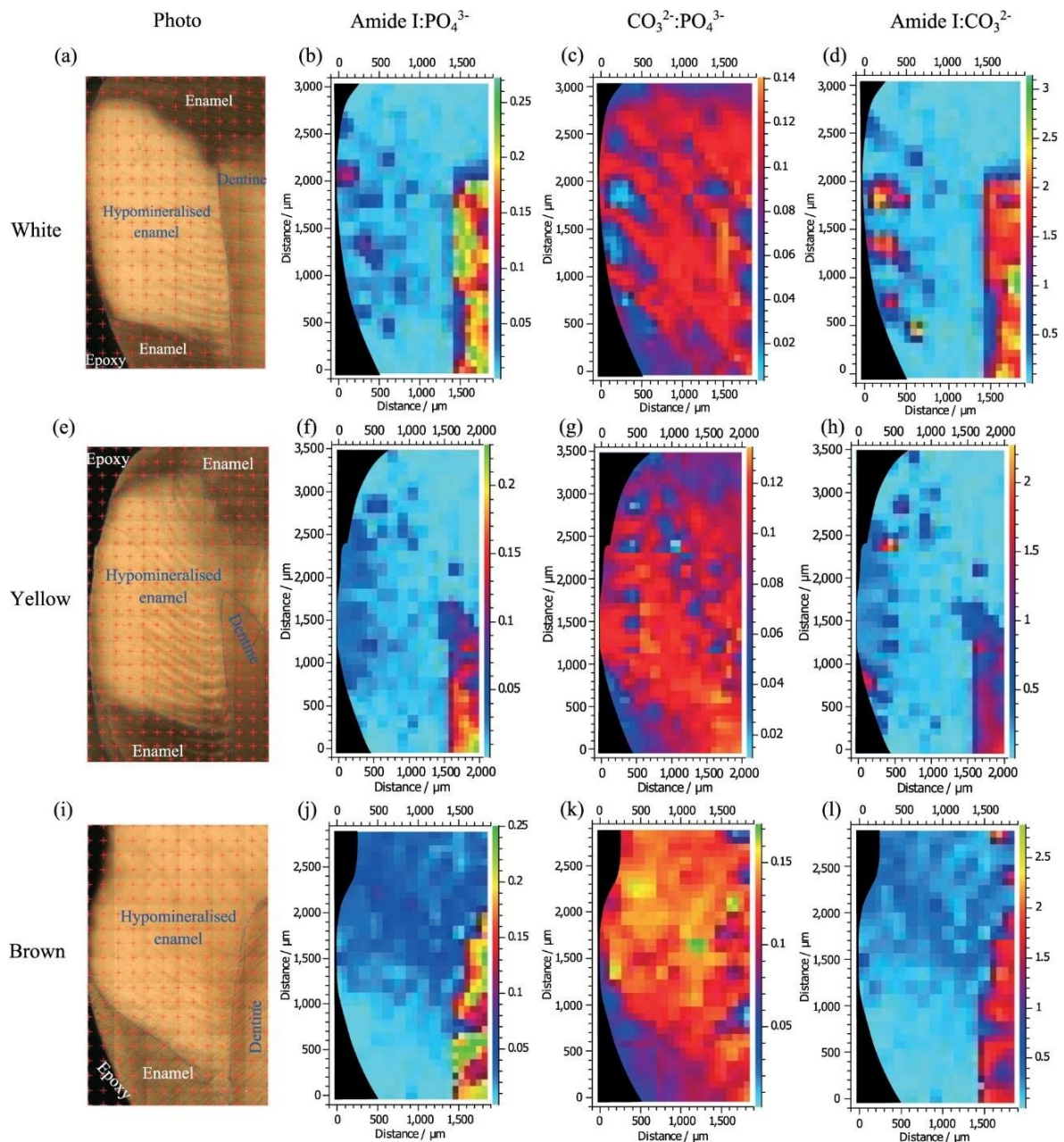
Preuzeto iz (119).

Ramanova spektroskopija primijenjena je i u istraživanjima molarno-incizivne hipomineralizacije, razvojne anomalije kod koje dolazi do poremećaja sastava i strukture cakline pojedinih skupina zubi (120). Stupanj demineralizacije određen je iz Ramanovih spektara iz razlika u intenzitetima vrpca koje odgovaraju mineralnim komponentama, prije svega vrpca na 960 cm^{-1} (Slika 12).



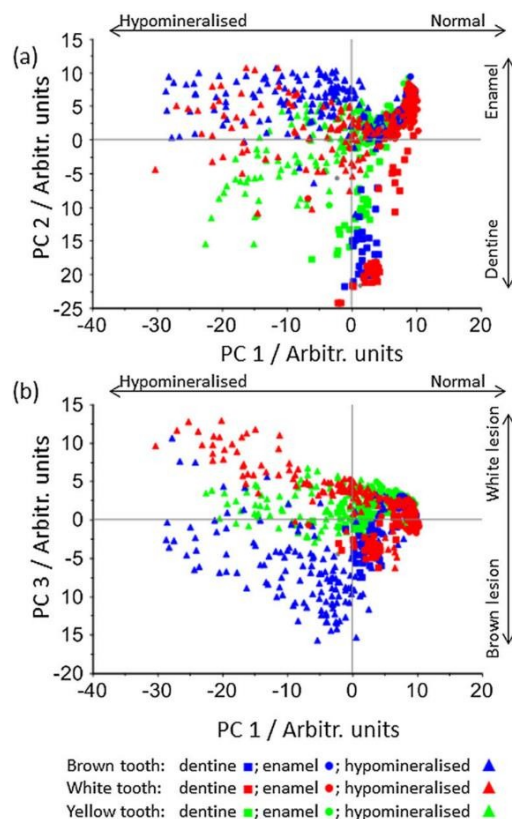
Slika 12. Usporedba Ramanovih spektara dentina (plavo), zdrave cakline (crno) i hipomineralizirane cakline (crveno). Preuzeto iz (120).

Primjena mikro-Raman spektroskopije kojom se izvode lokalna mjerenja na malim površinama uzorka omogućava mapiranje razlika u mineralnom sastavu tvrdih zubnih tkiva (120). Uzastopnim snimanjima malih dijelova hipomineralizirane lezije moguće je rekonstruirati mapu relativnih razlika s obzirom na glavne sastojke tvrdih zubnih tkiva. Primjerice, Slika 13 prikazuje razliku u raspodjeli organskih i anorganskih sastojaka tvrdih zubnih tkiva u različitim vrstama hipomineraliziranih lezija. Pritom se relativne razine amida odnose na organske komponente tvrdih zubnih tkiva (kolagen), dok relativne razine karbonatnih i fosfatnih skupina ukazuju na promjene u mineralnom sastavu.



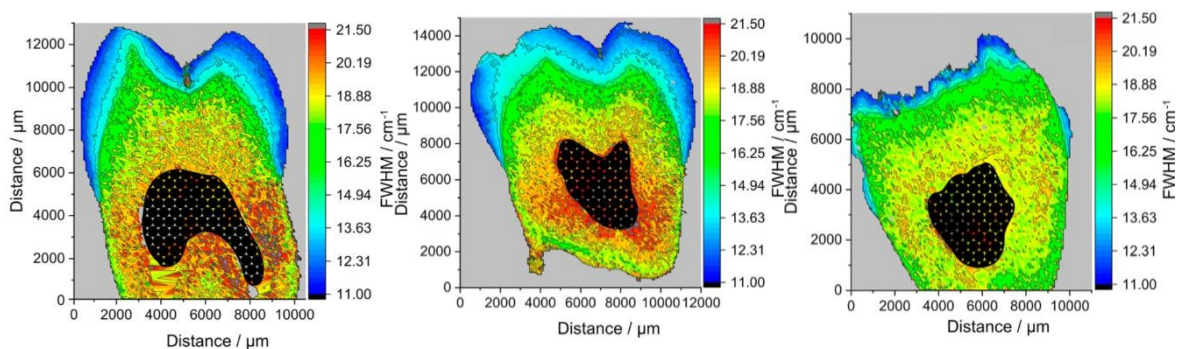
Slika 13. Mape kemijskog sastava za bijele, žute i smeđe hipomineralizirane lezije. Boje na mapama označavaju relativne razlike pojedinog sastojka (zeleno = najviša razina, svijetlo plavo = najniža razina). Preuzeto iz (120).

Nadalje, obradom spektara prikupljenih iz hipomineraliziranih lezija pomoću PCA moguće je pripremiti modele koji na temelju razlika u sastavu vizualno razdvajaju spektre (Slika 14.)

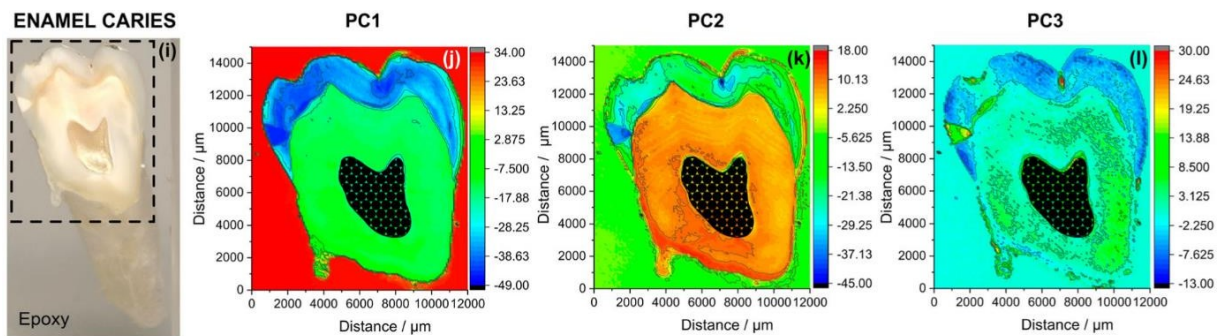


Slika 14 . Dijagram raspršenosti za glavne komponente kod spektara zdravog dentina, zdrave cakline i hipomineralizirane cakline. Preuzeto iz (120).

Ramanova spektroskopija može se koristiti i za opažanje razlika u mineralnom sastavu kod zubnog karijesa te različitih razvojnih anomalija tvrdih zubnih tkiva (121). Mape mineralnog sastava mogu se pripremiti temeljem parametara pojedinih vrpca, primjerice Slika 15 prikazuje relativne odnose pune širine na polovici maksimuma za vrpca na 960 cm^{-1} . Za razliku od takve analize koja uzima u obzir samo jednu vrpca, kemometrijske metode poput PCA omogućavaju karakterizaciju lezije temeljenu na svim spektralnim karakteristikama. Primjer mapiranja lezije pomoću PCA analize prikazan je na Slici 16.

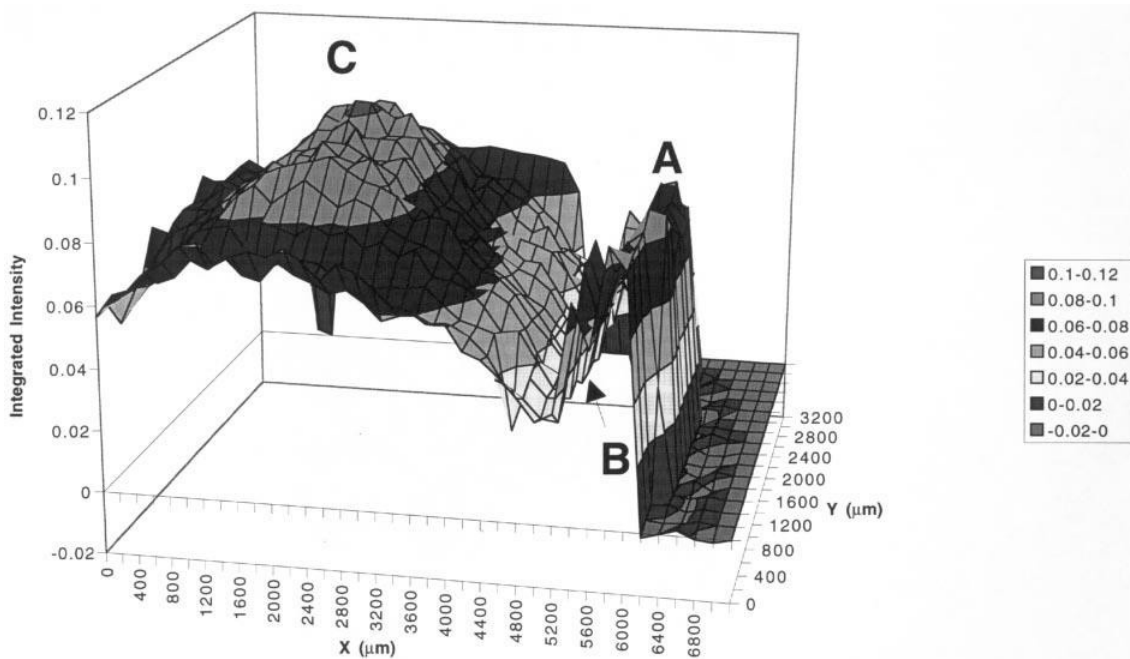


Slika 15. Mape presjeka tvrdih zubnih tkiva s obzirom na mineralni sastav. Lijevo: zdrava kontrola, sredina: karijes cakline, desno: razvojna anomalija amelogenesis imperfecta
Preuzeto iz (121).

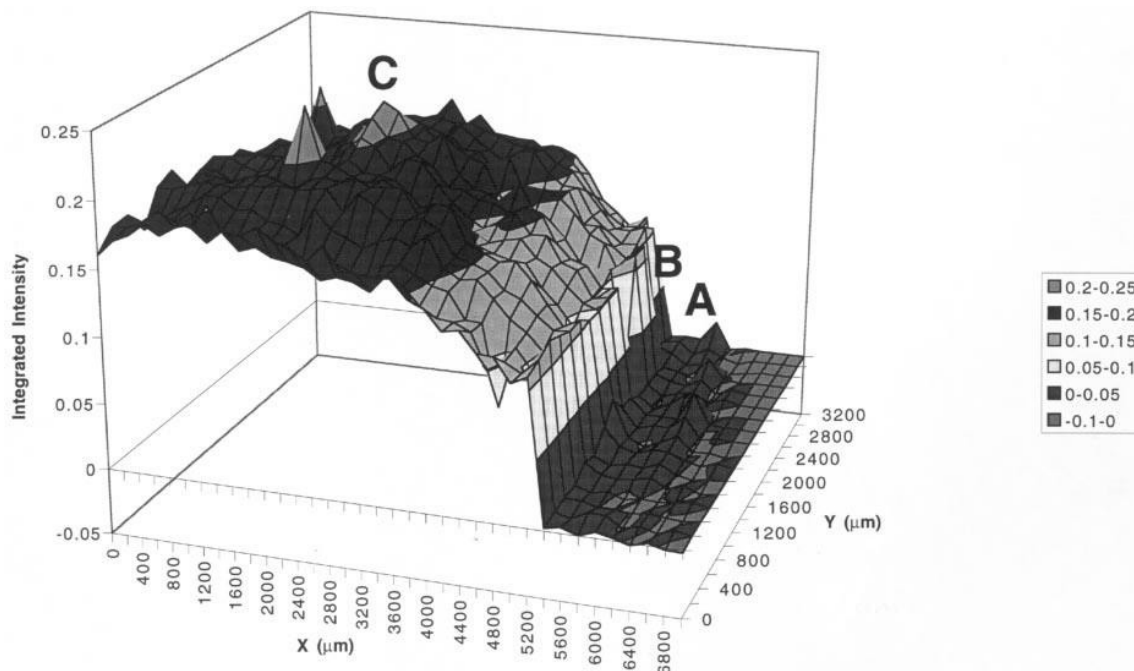


Slika 16. Mape vrijednosti prvih triju glavnih komponenti na presjeku zuba zahvaćenog karijesom. Preuzeto iz (121).

Ramanova spektroskopija je u raznim istraživanjima primjenjivana za detekciju ranih karijesnih lezija (122–124), za istraživanje razlika u sastavu između mliječnih i trajnih zubi (107) te mapiranje prostornih razlika u zastupljenosti organskih i anorganskih sastojaka tvrdih zubnih tkiva (125). Posljednje istraživanje je zanimljivo jer omogućava preciznu vizualizaciju razlika u sastavu tvrdih zubnih tkiva na caklinsko-dentinskom spojištu. Slika 17 predstavlja promjene u mineralnom sastavu na temelju intenziteta vrpce na 960 cm^{-1} , dok Slika 18 prikazuje promjene udjela organskih sastojaka na temelju vrpce koje odgovaraju C-H istezanju.

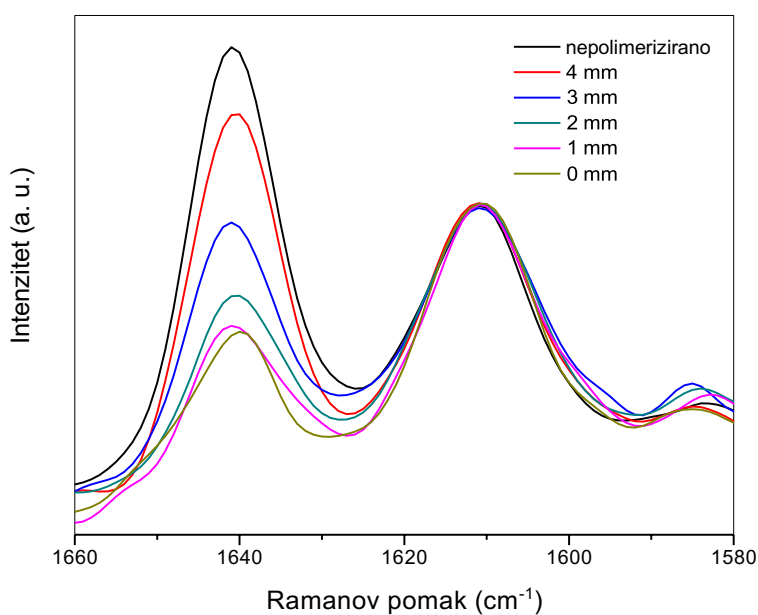


Slika 17. Mapa integriranih intenziteta vrpce na 960 cm⁻¹ na transverzalnom presjeku zuba. A: caklina, B: caklinsko-dentinsko spojište, C: dentin. Preuzeto iz (125).

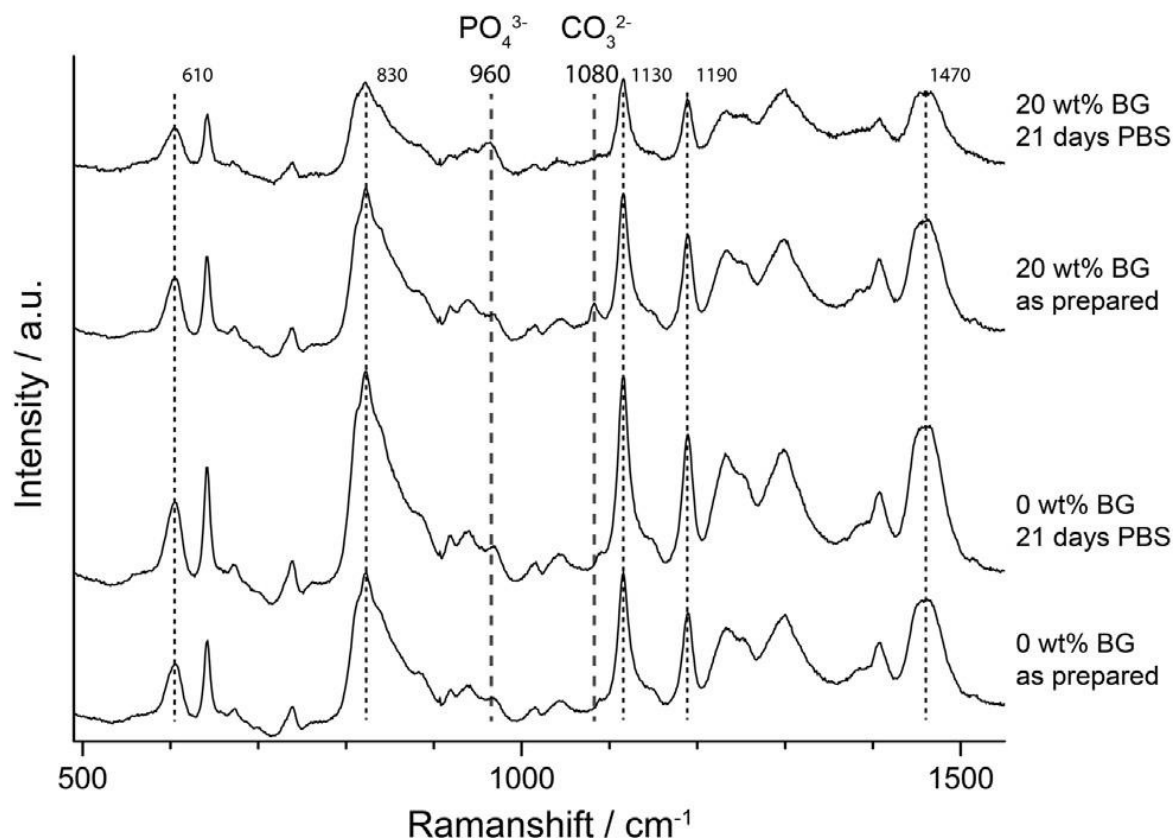


Slika 18. Mapa integriranih intenziteta vrpce na 2882, 2940 i 2978 cm⁻¹ koje predstavljaju C-H istežanje na transverzalnom presjeku zuba. A: caklina, B: caklinsko-dentinsko spojište, C: dentin. Preuzeto iz (125).

Osim u istraživanjima tvrdih zubnih tkiva, Ramanova spektroskopija se koristi i za istraživanja dentalnih materijala. Primjerice, mjerenjem stupanja konverzije polimernih materijala može se pratiti učinkovitost polimerizacije (126) (Slika 19). Nadalje, Ramanova spektroskopija može poslužiti za identifikaciju različitih spojeva otpuštenih iz eksperimentalnih reaktivnih dentalnih materijala, poput kompozitnih materijala s bioaktivnim staklom koji na svojoj površini precipitiraju sloj kalcijevog fosfata (127) (Slika 20).



Slika 19. Dio Ramanovog spektra koji se koristi za mjerenje stupnja polimerizacije kod kompozitnih materijala. Nakon normiranja spektara na referentnu vrpce na 1610 cm⁻¹, razlike u intenzitetu vrpce na 1640 cm⁻¹ ukazuju na smanjenje učinkovitosti polimerizacije s povećanom debljinom sloja kompozitnog materijala. Preuzeto i prilagođeno iz (126).



Slika 20. Ramanovi spektri snimljeni s površine bioaktivnih materijala koji na svojoj površini precipitiraju hidroksiapatit. Promjene intenziteta vrpce na 960 cm^{-1} ukazuju na pojavu hidroksiapatita na površini materijala nakon imerzije u vodenom mediju. Preuzeto iz (127).

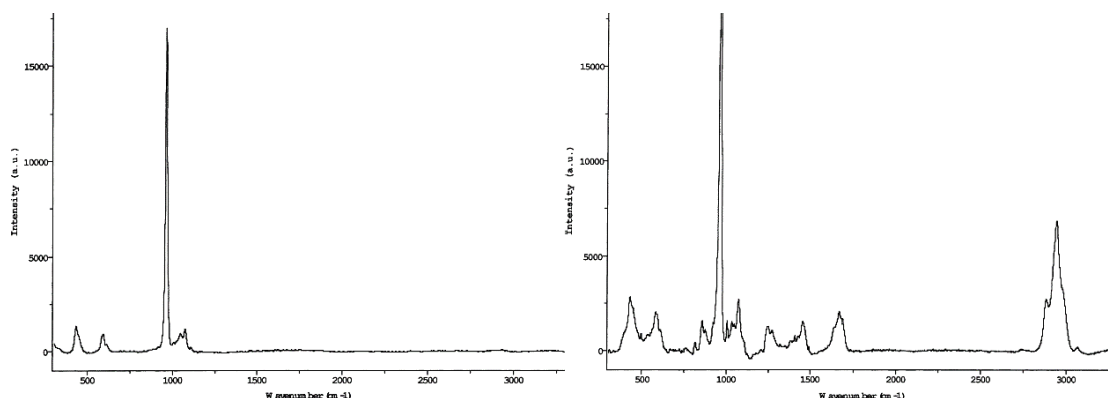
1.5.2. Primjena Raman spektroskopije za određivanje dobi

Unatoč zastupljenosti Raman spektroskopije u istraživanjima iz raznih područja dentalne medicine, samo dva istraživanja su koristila Ramanove spektre za forenzičko određivanje dobi (128,129). U spomenutim radovima autori koriste Ramanove spektre snimljene na uzdužnim presjecima zubi i izvede parcijalnu regresiju najmanjih kvadrata kako bi korelirali prethodno definirane kompozicijske varijable iz Ramanovih spektara s dobi donora. Spomenuta istraživanja temeljena su na idealnom scenariju u kojem su Ramanovi spektri snimani sa standardiziranih, ravnih i glatkih presjeka zdravih zubi. Takav dizajn istraživanja ima prednosti u smislu standardizacije i reproducibilnosti, međutim, uvjeti u kojima se analiza provodi uvelike se razlikuju od realističnih scenarija. Naime, u stvarnim forenzičkim situacijama, često nisu dostupni cjeloviti i potpuno zdravi zubi, a destruktivna priprema uzorka (sekcija zubi) je načelno nepoželjna.

Dodatno ograničenje dosadašnjih istraživanja Raman spektroskopije za određivanje dobi

predstavlja pristup u kojem se umjesto cijelog spektra analiziraju samo proizvoljno definirane varijable izvedene iz parametara pojedinih vrpca. Primjerice, Tramini i suradnici su na spektrima tvrdih zubnih tkiva identificirali 5 glavnih vrpca (Slika 21), čije su karakteristike u raznim linearnim kombinacijama koristili za izradu modela za određivanje dobi metodom regresije parcijalnih najmanjih kvadrata (PLSR, od engl. *Partial Least Squares Regression*). Karakteristike pojedinih vrpca bile su maksimalni intenzitet, integrirani intenzitet (površina ispod krivulje) i puna širina na polovici maksimuma. U spomenutoj analizi korišteno je sljedećih 5 spektralnih vrpca:

- 963 cm^{-1} (PO_4)
- 1235 cm^{-1} (amidi III)
- 1450 cm^{-1} (amidi II)
- 1668 cm^{-1} (amidi I)
- 2940 cm^{-1} (C-H)



Slika 21. Ramanovi spektri cakline (lijevo) i dentina (desno) koje su Tramini i suradnici koristili za određivanje dobi. Preuzeto iz (128).

Slično prethodno opisanom postupku određivanja dobi, autori drugog spomenutog istraživanja Ramanove spektroskopije za određivanje dobi (129) koristili su različite kombinacije parametara iz Ramanovih spektara prikupljenih s različitih mjesta na presjeku zuba. Ukupno je korišteno 59 kombinacija parametara, od kojih je 29 odabrano za uporabu u regresijskoj analizi. Nedostatak oba spomenuta rada je da proizvoljan odabir parametara spektara, kao i definicija njihovih kombinacija koje se koriste u regresijskim formulama.

Kako bi se nadopunili rezultati spomenutih istraživanja, ovaj rad simulira realističniji forenzički scenarij uključivanjem zubi koji su zahvaćeni različitim patološkim promjenama poput parodontne bolesti i zubnog karijesa. Dodatno, analiza spektara provedena je kroz sve dostupne valne brojeve (tj. na cijelim spektrima), za razliku od dosadašnjih istraživanja koja su koristila različite kombinacije parametara pojedinačnih vibracijskih vrpca. Umjesto sekcije zubi kako bi se analizirao njihov unutarnji sastav, Ramanova spektroskopija u ovom radu provedena je na pristupačnijoj vanjskoj površini zuba. Opisani pristup je odabran kako bi se procijenila primjenjivost određivanja dobi Raman spektroskopijom pri uporabi nedestruktivne obrade zubi koji su zahvaćeni različitim patološkim procesima.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost primjene Ramanove spektroskopije za forenzičko određivanje dobi. Ispitivani uzorak su sačinjavali ekstrahirani zubi zahvaćeni različitim patološkim promjenama kako bi se simulirao realističan forenzički scenarij. Ramanovi spektri snimljeni s različitih dijelova zuba analizirani su metodama PCA i PCR kako bi se izradio model za forenzičko određivanje dobi.

Specifični ciljevi rada bili su sljedeći:

1. Ispitati mogu li se promjene u Ramanovim spektrima uzrokovane razlikama u dobi ispitanika koristiti za izradu modela za određivanje dobi;
2. Ispitati mogućnost metode PCA za razdvajanje spektara na temelju dobi donora;
3. Izraditi PCR model koji omogućava određivanje dobi ispitanika temeljem Ramanovih spektara snimljenih s površine zuba;
4. Ispitati utjecaj različitih tipova tvrdih zubnih tkiva na točnost PCR modela za određivanje dobi;
5. Ispitati utjecaj spola donora na točnost PCR modela za određivanje dobi;
6. Ispitati mogućnost primjene metode PCA za određivanje spola ispitanika temeljem Ramanovih spektara snimljenih s površine zuba.

Postavljene su sljedeće radne hipoteze:

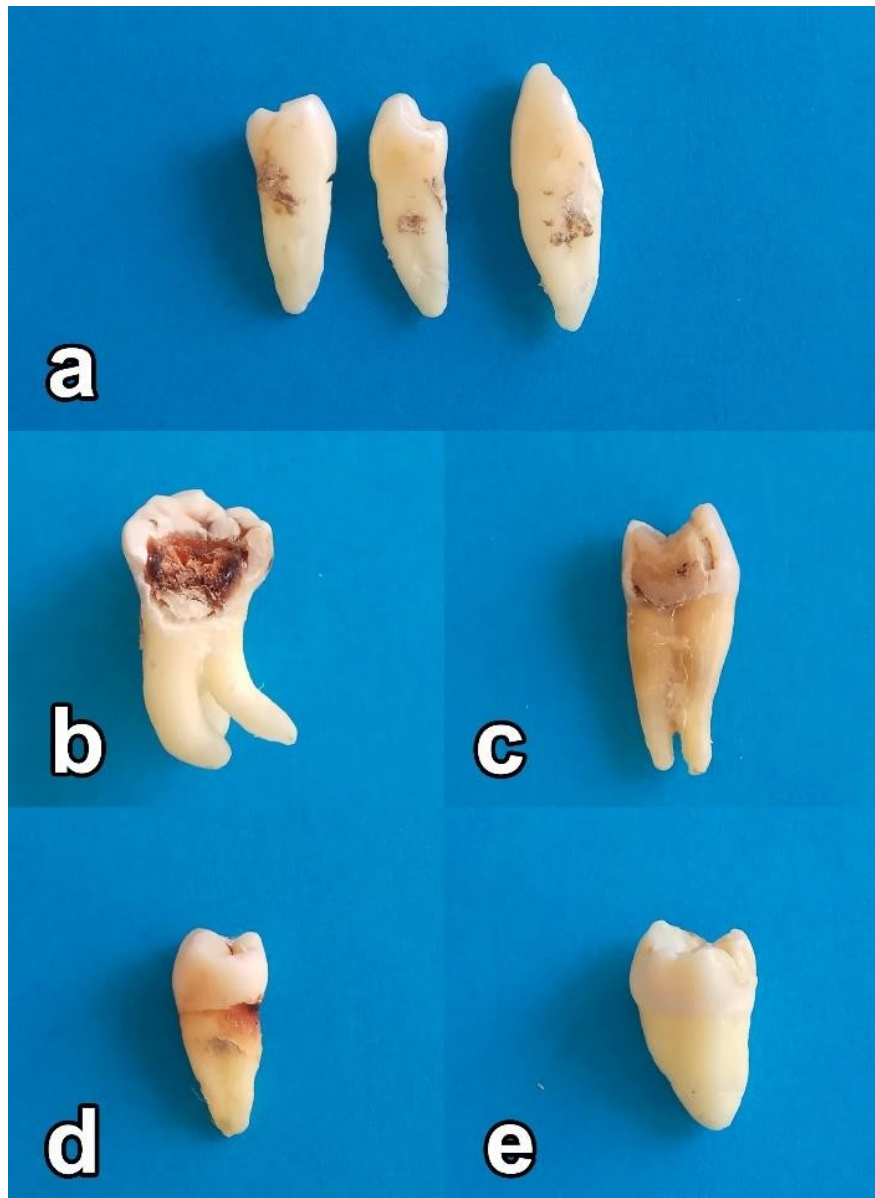
1. Ramanovi spektri zubi koreliraju s dobi donora;
2. Različite pozicije na zubu s kojih se prikupljaju spektri (kruna, vrat i apeks) utječu na preciznost modela za određivanje dobi;
3. Osim za određivanje dobi, Ramanovi spektri mogu poslužiti i za određivanje spola donora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ekstrahirani zubi

Zubi ispitani u ovom istraživanju ekstrahirani su na klinici Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U sklopu uobičajene prakse informiranog pristanka koja se provodi na klinici Fakulteta, svi donori dali su suglasnost za pohranu i korištenje zubi u istraživačke svrhe. Istraživačima nisu bili poznati osobni podaci donora niti druge informacije pomoću kojih bi bilo moguće identificirati donore. Prikupljanje i rukovanje biološkim materijalom provedeno je u skladu s helsinškom deklaracijom Svjetske zdravstvene organizacije o etičkim načelima za medicinska istraživanja koja uključuju ljudske ispitanike. Meka tkiva zaostala nakon ekstrakcije uklonjena su plastičnom četkicom, a potom su zubi dezinficirani natapanjem u 1 % otopini formaldehida tijekom 24 sata. Nakon toga su zubi pohranjeni u tami na sobnoj temperaturi (23 ± 3 °C) u arhivi Zavoda za dentalnu antropologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorak od 71 zuba koji je korišten u ovom istraživanju dobiven je nasumičnim odabirom zubi iz spomenute arhive. Dob donora kretala se u rasponu od 11 do 76 godina (Tablica 1). Zubi su ekstrahirani iz različitih razloga, od kojih su najčešći bili parodontitis (51 %) i neuspjeh endodontske terapije (39 %). Kako bi se simulirala forenzička analiza zubi nakon različitih postekstrakcijskih razdoblja, vremenski raspon između ekstrakcije i snimanja Ramanovih spektara iznosio je između 0,1 i 5,5 godina. Pri izboru zubi nisu primjenjivani specifični kriteriji; zubi zahvaćeni različitim patološkim promjenama namjerno su uključeni kako bi se dobio realističniji uzorak. Izgled zubi zahvaćenih najčešćim patološkim promjenama prikazan je na Slici 22.



Slika 22. Reprezentativni primjeri zubi zahvaćanih različitim patološkim procesima:
a – subgingivne tvrde zubne naslage koje dosežu do sredine korijena indikativne za uznapredovali parodontitis, b – opsežna destrukcija krunice zuba povezana s ireverzibilnom upalom pulpe, c – opsežno restaurirani zub s diskoloriranim korijenom i neuspjelom endodontskom terapijom, d – karijes u razini zubnog vrata, e – intaktni treći kutnjak ekstrahiran zbog impakcije.

Tablica 1. Karakteristike zubi korištenih u istraživanju. Razlozi ekstrakcije: orto – ortodontski razlozi, endo – neuspjeli endodontski zahvat ili nemogućnost endodontskog liječenja, paro – vađenje zbog uznapredovanog parodontitisa, imp/ret – impaktirani ili retinirani zub.

Redni broj zuba	Spol donora (M / Ž)	Vrsta zuba prema ISO 3950 sustavu	Dob donora (godine)	Vrijeme između ekstrakcije i snimanja spektara (godine)	Razlog ekstrakcije
1	M	14	15	0,2	orto
2	M	14	16	3,5	orto
3	M	35	16	3,5	endo
4	M	47	22	0,2	endo
5	M	18	23	0,1	imp/ret
6	M	37	31	0,1	endo
7	M	37	32	0,2	endo
8	M	47	35	0,3	endo
9	M	27	44	0,1	endo
10	M	45	45	2,9	endo
11	M	33	46	2,5	paro
12	M	14	47	4,2	endo
13	M	21	49	0,3	paro
14	M	48	49	0,3	paro
15	M	25	52	3,9	paro
16	M	46	52	0,2	endo
17	M	47	54	0,3	paro
18	M	15	55	3,7	paro
19	M	27	55	4,0	paro

20	M	21	58	4,2	paro
21	M	37	58	4,2	paro
22	M	17	58	4,2	endo
23	M	13	59	3,8	paro
24	M	17	64	0,4	paro
25	M	44	64	0,1	paro
26	M	36	65	0,3	endo
27	M	17	67	0,2	endo
28	M	27	67	0,1	paro
29	M	45	68	4,0	paro
30	M	13	70	3,8	paro
31	M	12	73	3,7	paro
32	M	36	76	0,3	endo
33	Ž	24	11	4,0	orto
34	Ž	36	17	0,5	endo
35	Ž	35	23	0,3	orto
36	Ž	36	23	0,4	endo
37	Ž	47	23	0,5	endo
38	Ž	18	26	5,5	endo
39	Ž	28	29	0,4	imp/ret
40	Ž	28	31	0,3	endo
41	Ž	24	35	4,4	endo
42	Ž	28	35	0,4	endo
43	Ž	11	38	4,5	paro
44	Ž	13	38	4,0	endo

45	Ž	27	38	0,6	paro
46	Ž	43	39	4,0	paro
47	Ž	12	39	4,0	paro
48	Ž	18	39	0,6	endo
49	Ž	45	39	3,8	paro
50	Ž	48	39	0,3	imp/ret
51	Ž	22	46	4,1	paro
52	Ž	33	46	4,0	paro
53	Ž	37	46	0,6	endo
54	Ž	36	48	0,1	endo
55	Ž	35	49	3,4	paro
56	Ž	44	49	3,7	paro
57	Ž	27	51	0,5	paro
58	Ž	25	53	3,9	paro
59	Ž	37	55	0,5	endo
60	Ž	27	56	0,5	paro
61	Ž	11	58	4,1	paro
62	Ž	13	58	3,2	paro
63	Ž	34	58	0,2	paro
64	Ž	37	58	0,6	paro
65	Ž	45	62	4,0	paro
66	Ž	17	64	0,5	endo
67	Ž	21	64	4,0	paro
68	Ž	45	65	4,1	paro
69	Ž	26	66	0,6	paro

70	Ž	23	69	0,1	endo
71	Ž	37	73	0,6	endo

Tablica 2. Dobne skupine donora za analizu glavnih komponenata

Broj skupine	Dob (godine)
1	10-19
2	20-29
3	30-39
4	40-49
5	50-59
6	60-69
7	70-79

3.2. Raman spektroskopija

Ramanovi spektri snimljeni su pomoću FT-Raman spektrometra Spectrum GX (Perkin Elmer, Waltham, MA, SAD) s neodimij-itrij-aluminij (Nd:YAG) laserom koji emitira svjetlost valne duljine od 1064 nm (Slika 23). Za snimanje pojedinog spektra izvršeno je 100 skenova u rasponu od 3500-200 cm^{-1} , uz rezoluciju spektrometra od 4 cm^{-1} . Spektri su prikupljeni sa sljedeće tri pozicije na zubu: kruna, vrat i apeks (Slika 24). Na svakoj od odabranih pozicija, određeno je područje promjera 2,5 mm unutar kojeg se laserski snop promjera 0,25 mm pomicao po pravcu na 10 različitih točaka na zubu kako bi se snimili Ramanovi spektri (Slika 25). Takav način snimanja je usvojen kako bi se uzele u obzir lokalne heterogenosti u sastavu tvrdih zubnih tkiva, tj. kako bi se umanjio njihov utjecaj na ukupni rezultat. Ukupno je snimljeno 30 spektara po zubu (10 spektara sa svake od 3 pozicije). Spektri su spremljeni u podatkovni set i povezani s dobi donora i pozicijom snimanja.

3.3. Analiza glavnih komponenata i regresija glavnih komponenata

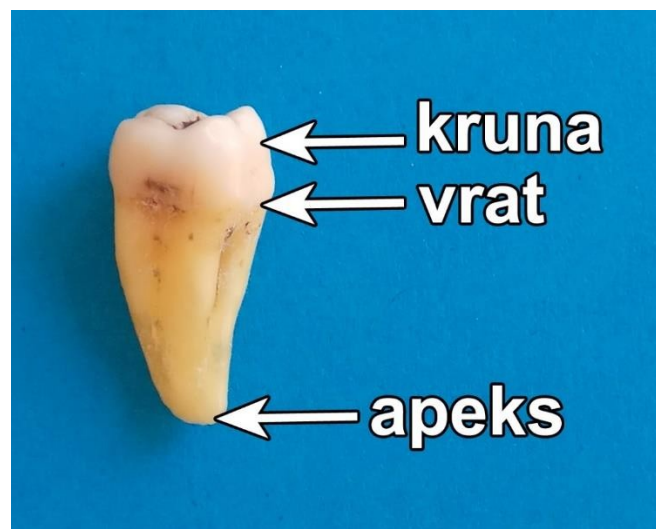
Na svim spektrima učinjena je korekcija bazne linije (engl. *Baseline correction*) i normiranje na vrpce s maksimumom na valnom broju od 960 cm^{-1} (simetrično istezanje PO_4), kako bi se isključile razlike uzrokovane varijacijama u uvjetima snimanja. Cijeli Ramanovi spektri ($3500\text{--}200\text{ cm}^{-1}$) upotrijebljeni su za PCA i PCR analize, uz korištenje 3 do 7 glavnih komponenti. Kako bi se procijenila sposobnost PCA za odvajanje spektara prema dobi donora, spektri su podijeljeni u 7 dobnih skupina (Tablica 2). Spomenuto grupiranje učinjeno je kako bi se podaci označili bojama u PCR bodovnim dijagramima, tj. kako bi se olakšalo vizualno opažanje odvajanja spektara u skladu s dobi donora. Kako bi se ustanovila povezanost snimljenih spektara s dobi donora, primijenjena je metoda PCR. PCA i PCR su provedene pomoću modela ugrađenih u Matlab 2010 (The MathWorks Inc., Natick, MA, SAD) i pripadajućeg dodatka PLS_Toolbox (Eigenvector Research, Manson, WA, USA). Napredna tehnika pretprocesiranja, poopćeno ponderiranje najmanjih kvadrata (GLSW, od engl. *generalized least squares weighting*) je primijenjeno prije PCA modeliranja kako bi se uklonile informacije iz interferirajućih spojeva bez gubitka relevantne varijabilnosti povezane s dobi donora (130–133). Zasebni PCA i PCR modeli pripremljeni su s obzirom na različite pozicije snimanja spektara i spol donora, što je rezultiralo sa sljedećih šest kombinacija: apeks muški, apeks ženski, kruna muški, kruna ženski, vrat muški i vrat ženski. Dodatno, spektri obaju spolova obrađeni su zajedno u tri „zajednička“ modela, u kojim je uzeta u obzir samo pozicija snimanja spektra (kruna, apeks i vrat). Svi modeli unakrsno su validirani metodom *Venetian blinds*.

Kako bi se dodatno potvrdila valjanost korelacija dobivena uporabom metode PCR, na cjelokupnom setu podataka provedena je i regresija pomoću PLSR, tj. algoritma sličnog onom korištenom u prethodnim istraživanjima za određivanja dobi iz Ramanovih spektara tvrdih zubnih tkiva (128,129).

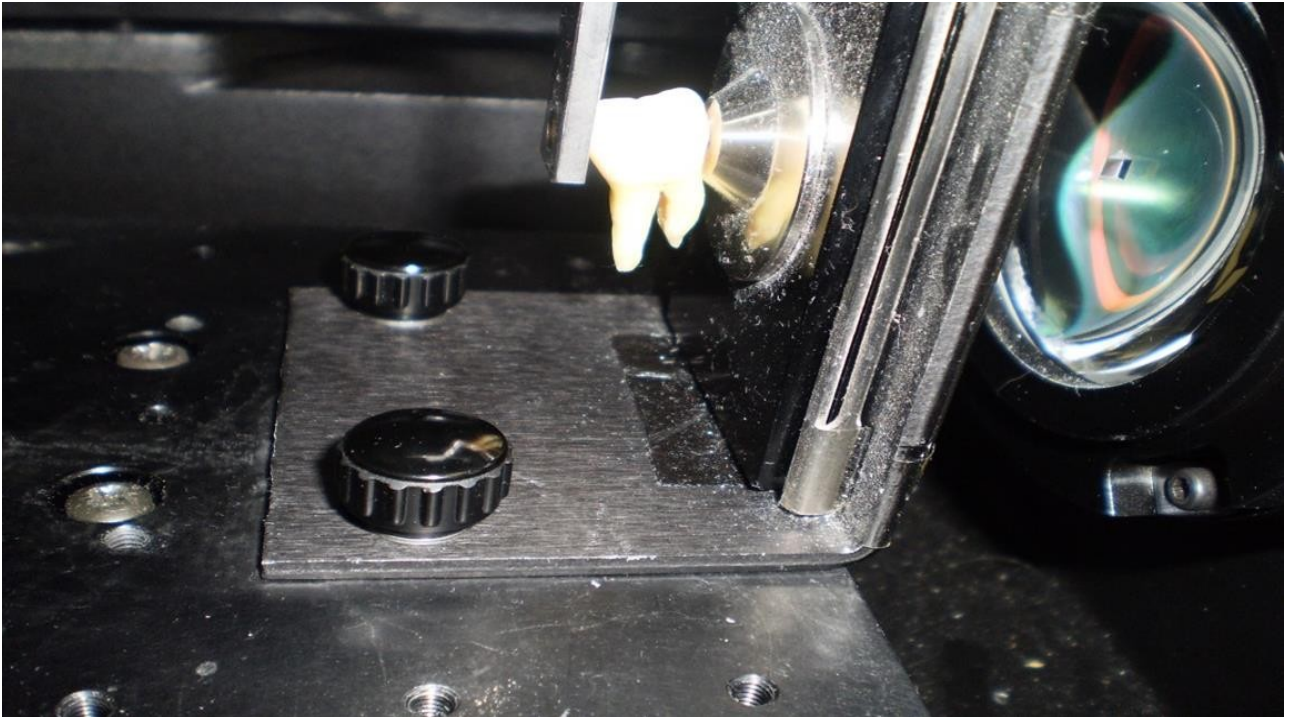
S obzirom na značajne razlike u Ramanovim spektrima opažene ovisno o spolu donora, ispitana je primjenjivost metode PCA u svrhu razdvajanja spektara prema spolnoj pripadnosti. Kako bi se ispitali učinci pozicije snimanja spektra (apeks, kruna i vrat), vrste zuba (sjekutići, očnjaci, pretkutnjaci, kutnjaci) i dobi ispitanika na mogućnost razdvajanja spolova pomoću PCA, navedene kategorije su analizirane zasebno.



Slika 23. FT-Raman spektrometar Spectrum GX na Zavodu za fiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 24. Shematski prikaz triju pozicija na vanjskoj površini zuba s kojih su prikupljeni Ramanovi spektri

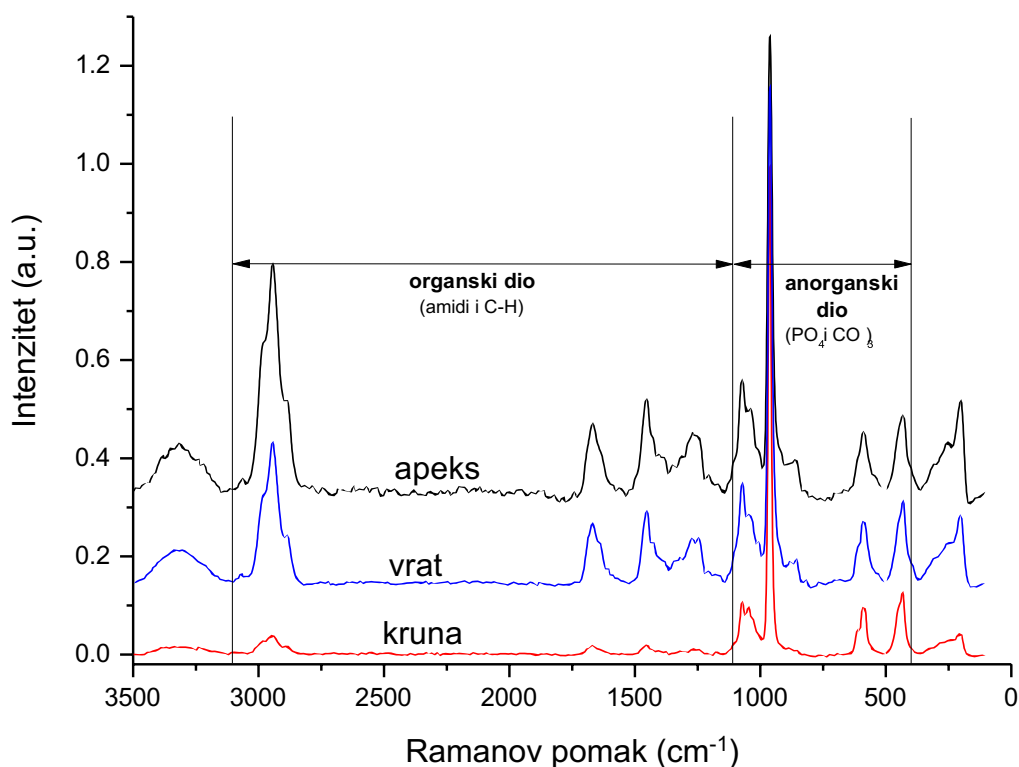


Slika 25. Zub postavljen u držač uzoraka s otvorom promjere 2,5 mm koji je korišten za određivanje mjerne površine

4. REZULTATI

4.1. Ramanovi spektri tvrdih zubnih tkiva

Reprezentativni Ramanovi spektri za svaku od pozicija snimanja (apeks, vrat i kruna) prikazani su na Slici 26. Anorganski dio predstavljaju vibracijske vrpce u rasponu valnih brojeva od $1100\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (PO_4 i CO_3 vibracije), a organskom dijelu zubnih tkiva odgovara raspon valnih brojeva od $3100\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ (amidne vrpce i C-H vibracije) (125,134). Spektri sa svih triju snimanih pozicija sadržavali su iste vibracijske vrpce, ali se omjer organskih i anorganskih sastojaka razlikovao među tvrdim zubnim tkivima. Tako je omjer anorganskih naspram organskih sastojaka bio značajno veći u spektrima snimljenim na kruni nego na spektrima snimljenim na vratu i apeksu. Takav rezultat odražava činjenicu da su sva tvrda zubna tkiva sastavljena od istih temeljnih sastojaka, ali u različitim relativnim odnosima. Valni brojevi maksimuma pojedinih spektralnih vrpce prikazani su u Tablici 3. S biokemijskog stajališta, glavni sastojak anorganskog dijela tvrdih zubnih tkiva je kalcij-deficijentni hidroksiapatit, dok se glavnina organskog dijela sastoji od kolagena (135,136).



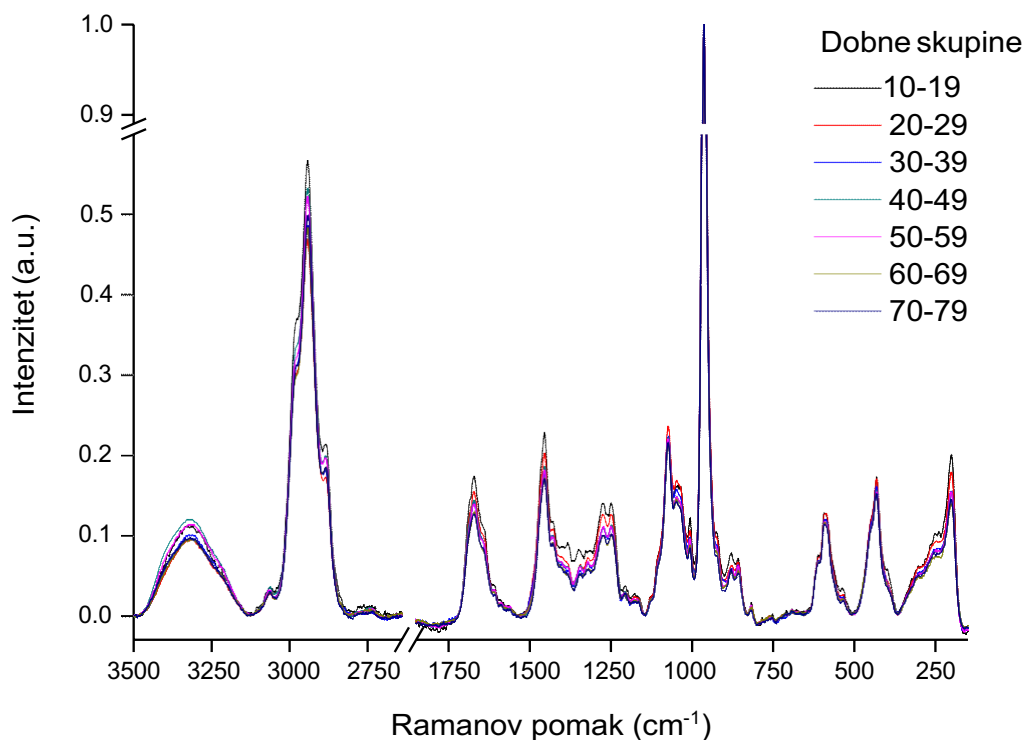
Slika 26. Reprezentativni Ramanovi spektri snimljeni s pozicija apeksa, vrata i krune. Spektri su normirani na vibracijsku vrpcu koja odgovara PO_4 skupini na 960 cm^{-1} .

Valni broj (cm ⁻¹)	Vrpca
2940	C-H istezanje
1665	Amidi I (C=O)
1450	C-H savijanje
1242	Amidi III (N-H)
1069	V3 asimetrično istezanje PO ₄
1069	V1 simetrično istezanje tip B CO ₃
960	V1 simetrično istezanje PO ₄
590	V4 asimetrično savijanje PO ₄
431	V2 simetrično savijanje PO ₄

Tablica 3. Valni brojevi karakterističnih vrpca u Ramanovom spektru

4.2. Ramanovi spektri u ovisnosti o dobi donora

Za ilustraciju promjena u spektrima koje su povezane s dobi, normirani spektri s korigiranim baznim linijama, snimljeni na apeksima muških donora, prikazani su u obliku prosječnih spektara za svaku od sedam dobnih skupina (Slika 27). Opažene razlike u intenzitetima vrpca koje odgovaraju organskim i anorganskim sastojcima tvrdih zubnih tkiva ukazuju na mogućnost izrade PCA modela za razdvajanje dobi donora na temelju Ramanovih spektara. Uz to, dosljedne promjene spektara koje se javljaju kao funkcija dobi donora pokazuju da je moguće izraditi PCR model za određivanje dobi.



Slika 27. Ramanovi spektri za sedam dobnih skupina. Prikazani spektri snimljeni su s apeksa muških donora.

4.3. Rezultati PCR modela za određivanje dobi

Prediktivne vrijednosti PCR modela za određivanje dobi temeljenih na različitim pozicijama za prikupljanje spektra prikazane su u Tablici 4. Najviši koeficijenti korelacije i najniže vrijednosti parametara pogreške ostvareni su u modelima koji se temelje na spektrima s apeksa (R^2 vrijednosti od 0,84 za muške i 0,71 za ženske donore). Modeli temeljeni na ostalim kombinacijama spola donora i pozicije snimanja pokazali su niže vrijednosti R^2 , u rasponu od 0,17-0,59. Niske vrijednosti R^2 (0,18-0,24) zapažene su i kod zajedničkih modela koji su uključivali spektre oba spola. Modeli određivanja dobi temeljeni na PLSR pokazali su usporedive vrijednosti koeficijenta determinacije kao i modeli temeljeni na PCR (Tablica 5).

Tablica 4. Karakteristike i prediktivne vrijednosti različitih PCR modela: broj spektara na kojima su modeli temeljeni (n), koeficijenti determinacije (R^2), korijen iz srednjeg kvadrata pogreške kalibracije (RMSEC) i korijen iz srednjeg kvadrata pogreške kalibracije unakrsne validacije (RMSECV).

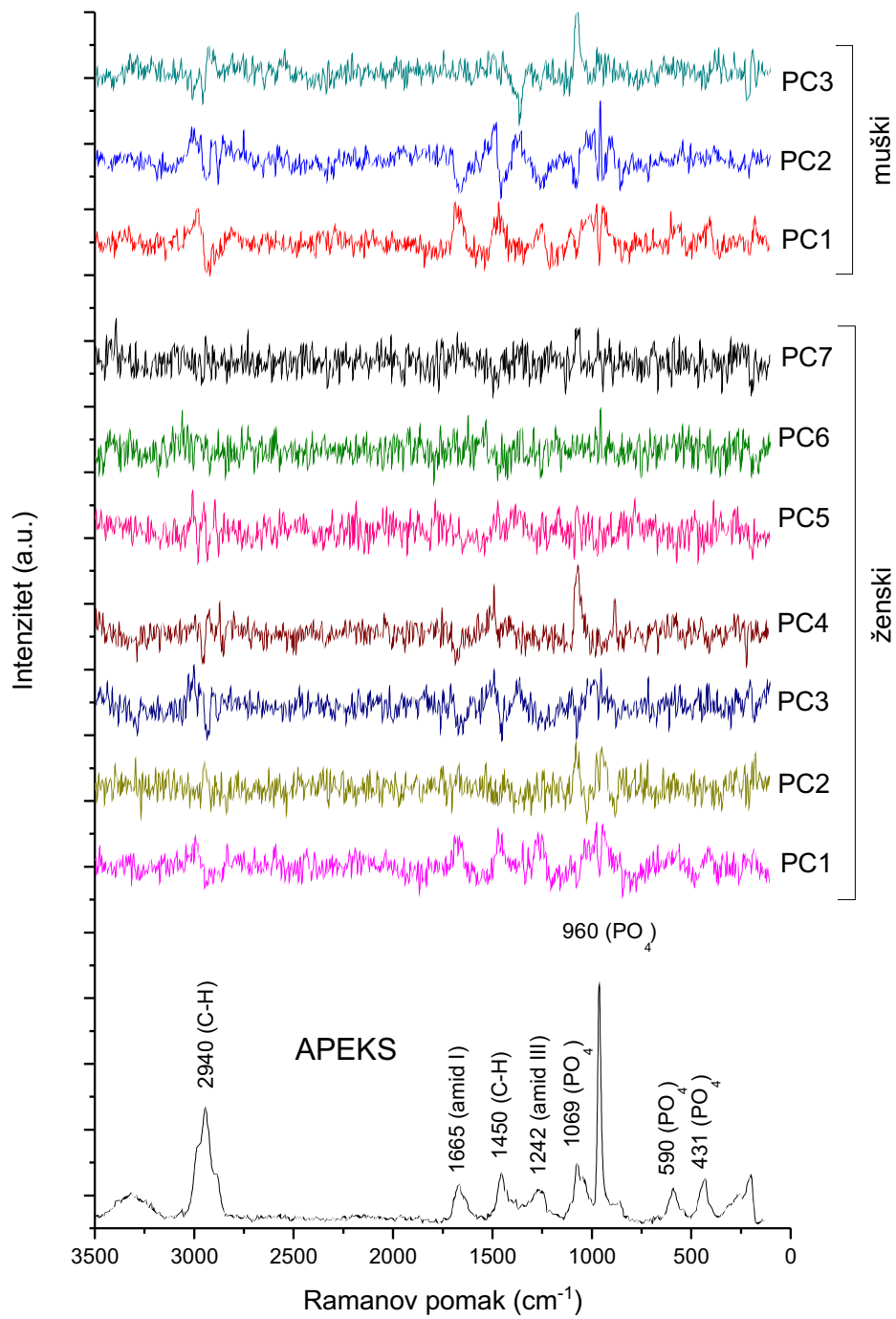
Model	Broj spektara	R^2	RMSEC (godine)	RMSECV (godine)
Apeks muški	320	0,84	5,7	7,2
Apeks ženski	390	0,71	7,3	8,1
Kruna muški	320	0,42	11,9	13,8
Kruna ženski	390	0,43	10,6	11,5
Vrat muški	320	0,59	9,2	11,3
Vrat ženski	390	0,17	13,9	14,0
Zajednički apeks	710	0,24	14,3	14,6
Zajednički kruna	710	0,22	14,5	14,7
Zajednički vrat	710	0,18	14,6	14,9

Tablica 5. Usporedba rezultata regresije dobivenih metodama PCR i PLSR.

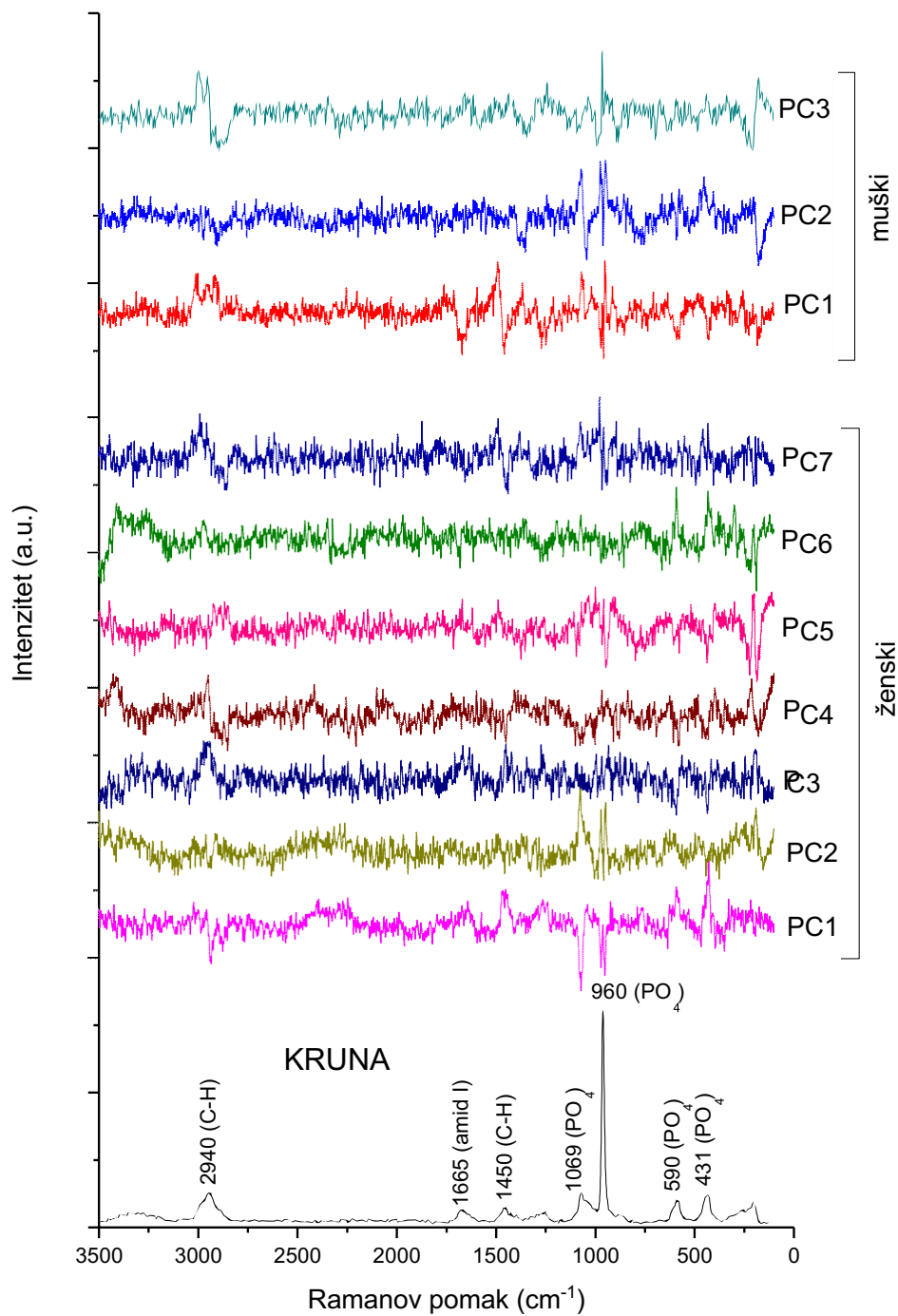
Tip modela	PCR		PLSR	
	R^2	Broj PC	R^2	Broj LV
Apeks muški	0,839	3	0,841	2
Apeks ženski	0,713	7	0,728	2
Kruna muški	0,42	3	0,387	3
Kruna ženski	0,428	7	0,465	2
Vrat muški	0,52	7	0,636	4
Vrat ženski	0,167	6	0,355	3

4.4. Rezultati opterećenja za glavne komponente

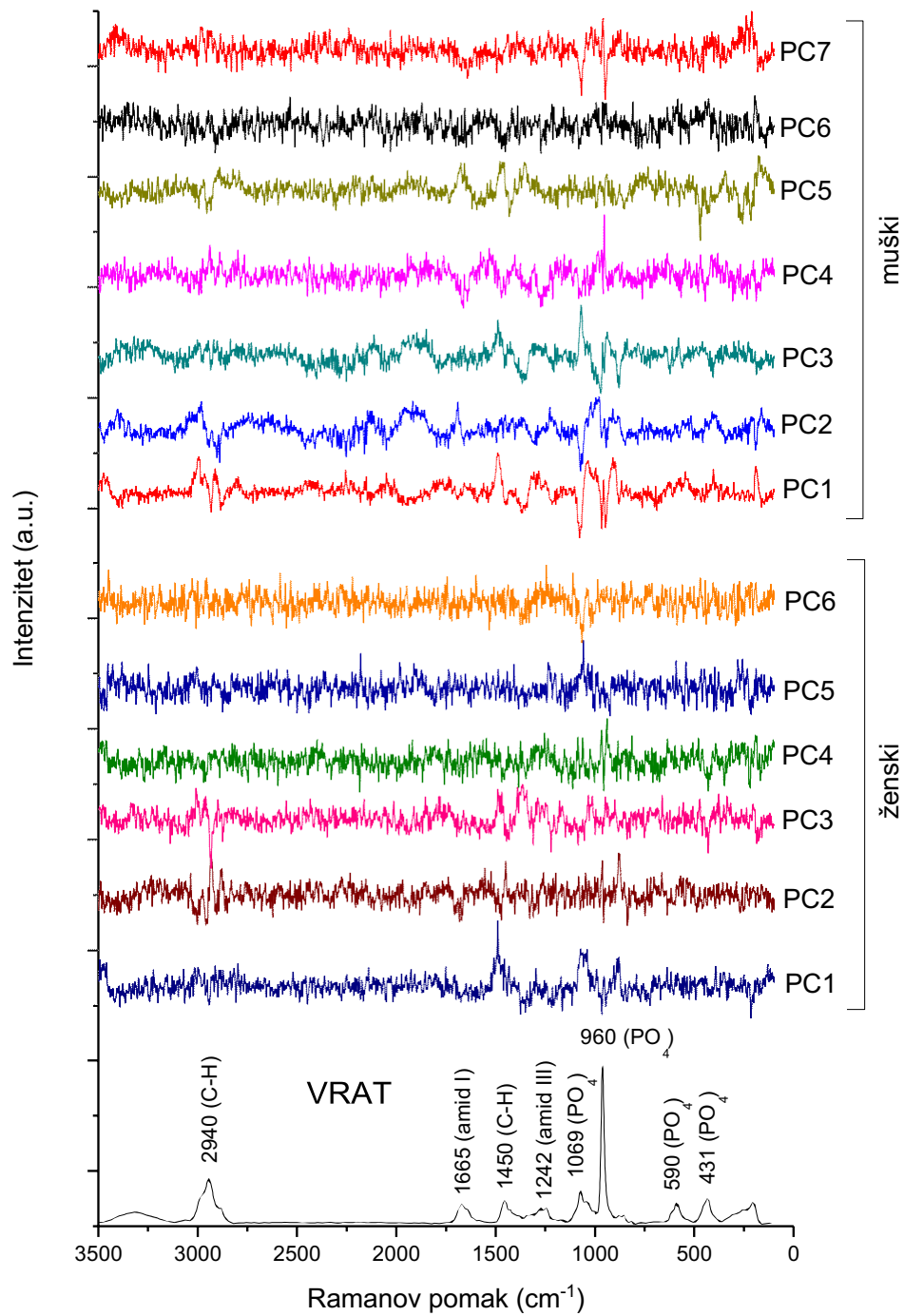
Dijagrami opterećenja za glavne komponente PC1 i PC2 prikazani su zajedno s pripadajućim reprezentativnim spektrima tvrdih zubnih tkiva na Slikama 28-30. Na svim pozicijama snimanja (kruna, vrat i apeks), doprinosi prvim dvjema glavnim komponentama potjecali su od organskog i anorganskog dijela Ramanovih spektara.



Slika 28. Dijagram opterećenja za glavne komponente korištene u modelu određivanja dobi za spektre snimljene s apeksa.



Slika 29. Dijagram opterećenja za glavne komponente korištene u modelu određivanja dobi za spektre snimljene s krune.



Slika 30. Dijagram opterećenja za glavne komponente korištene u modelu određivanja dobi za spektre snimljene s vrata zuba.

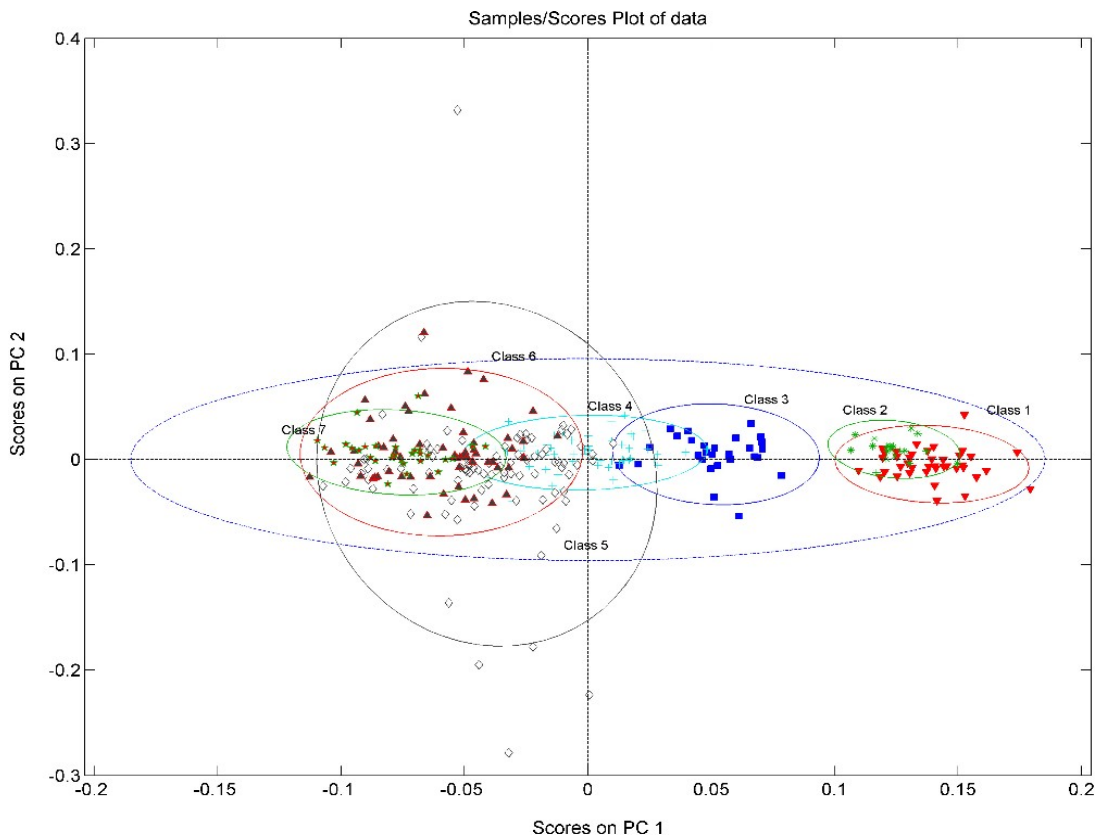
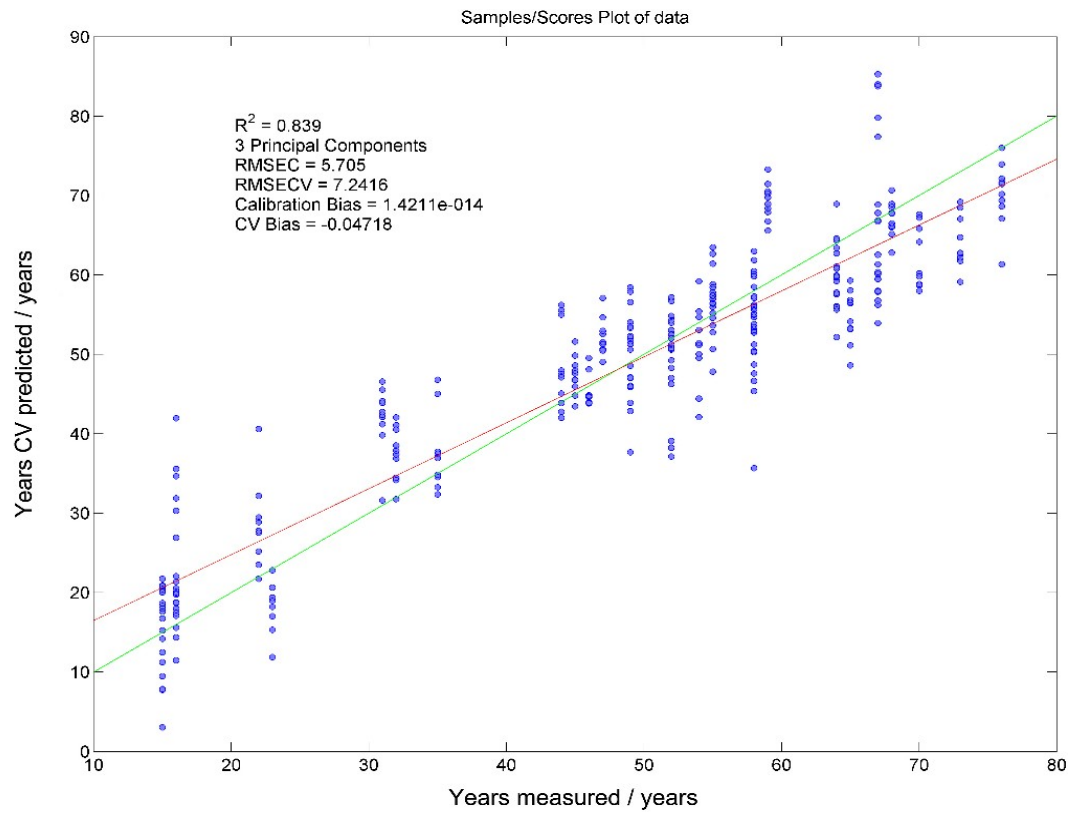
Na Slici 28 prikazani su dijagrami opterećenja za spektre s apeksa korijena. Referentni spektar odgovarajućeg tvrdog zubnog tkiva ispod dijagrama opterećenja prikazuje glavne vibracijske vrpce prisutne u spektru snimljenom na apeksu korijena: C-H istezanje (2940 cm^{-1}), amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), amidi III (1242 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}), simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}), asimetrično savijanje PO_4 (590 cm^{-1}) i simetrično savijanje PO_4 (431 cm^{-1}). Na dijagramima opterećenja pojedinih glavnih komponenata vidljivo je kako su informacije za određivanje dobi potjecale iz organskog i anorganskog dijela spektra tvrdih zubnih tkiva.

Slika 29 prikazuje dijagrame opterećenja za spektre snimljene na kruni zuba. Referentni spektar ispod dijagrama opterećenja prikazuje glavne vibracijske vrpce prisutne u spektru snimljenom na kruni i odgovara spektru cakline s visokim omjerom anorganskih naspram anorganskih komponenata. U spektru su prisutne i vrpce koje predstavljaju organski dio spektra tvrdih zubnih tkiva, međutim one su značajno slabije izražene nego u spektrima tkiva s manjim mineralnim udjelom. Na spektru cakline snimljenom na kruni zuba opažaju se sljedeće vibracijske vrpce: C-H istezanje (2940 cm^{-1}), amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}), simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}), asimetrično savijanje PO_4 (590 cm^{-1}) i simetrično savijanje PO_4 (431 cm^{-1}). Dijagrami opterećenja za glavne komponente pokazuju kako korisne informacije za određivanje dobi potječu iz organskog i anorganskog dijela spektra.

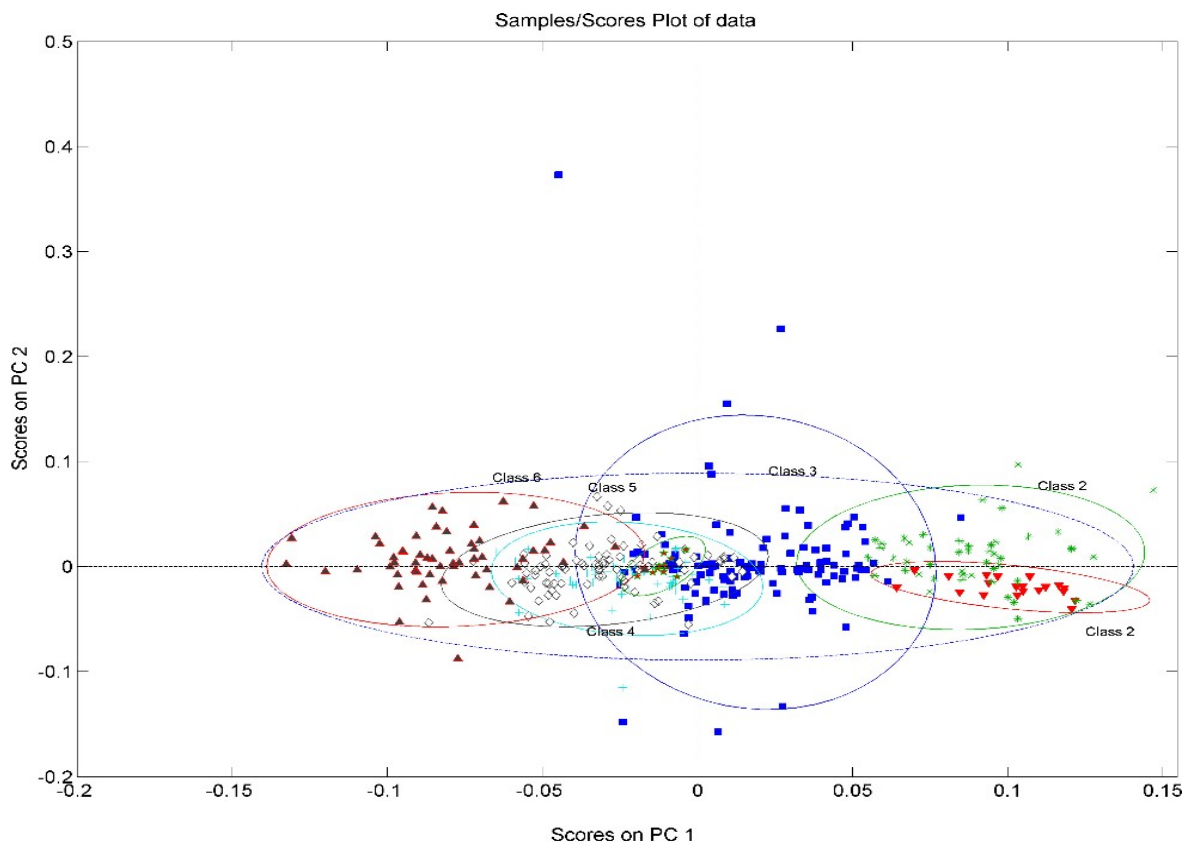
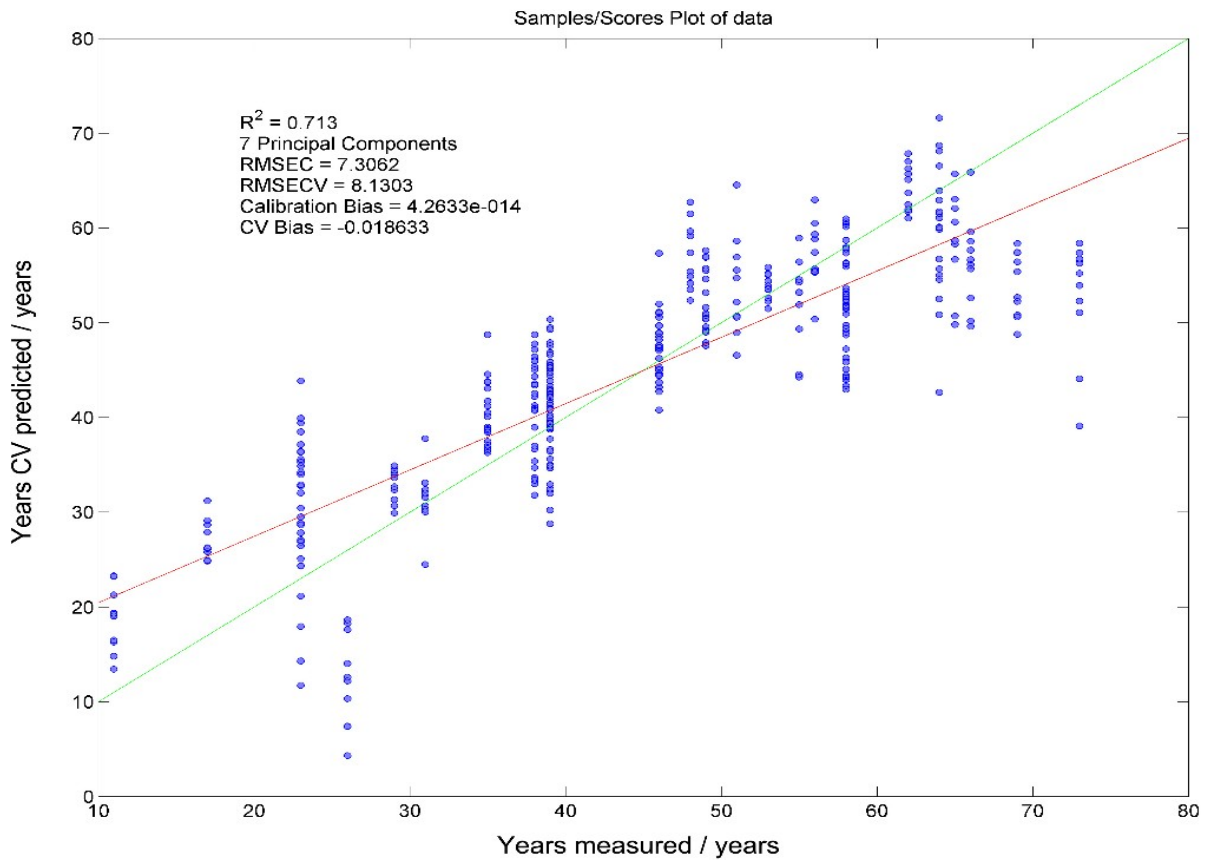
Na Slici 30 prikazani su dijagrami opterećenja za spektre zubne krune. Referentni spektar ispod dijagrama opterećenja prikazuje vibracijske vrpce organskih i anorganskih komponenata. Prema relativnim intenzitetima vrpce koje pripadaju organskom, odnosno anorganskom dijelu spektra mineraliziranih zubnih tkiva, prikazani spektar nalikuje spektru snimljenom na apeksu korijena prikazanom na Slici 28. Opažaju se sljedeće vibracijske vrpce: C-H istezanje (2940 cm^{-1}), amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), amidi III (1242 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}), simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}), asimetrično savijanje PO_4 (590 cm^{-1}) i simetrično savijanje PO_4 (431 cm^{-1}). Prisutnost vrpce koje odgovaraju organskim i anorganskim komponentama tvrdih zubnih tkiva ukazuje na prisutnost dentina i cementa na području zubnog vrata.

4.5. Dijagrami regresije i PCA dijagrami raspršenja

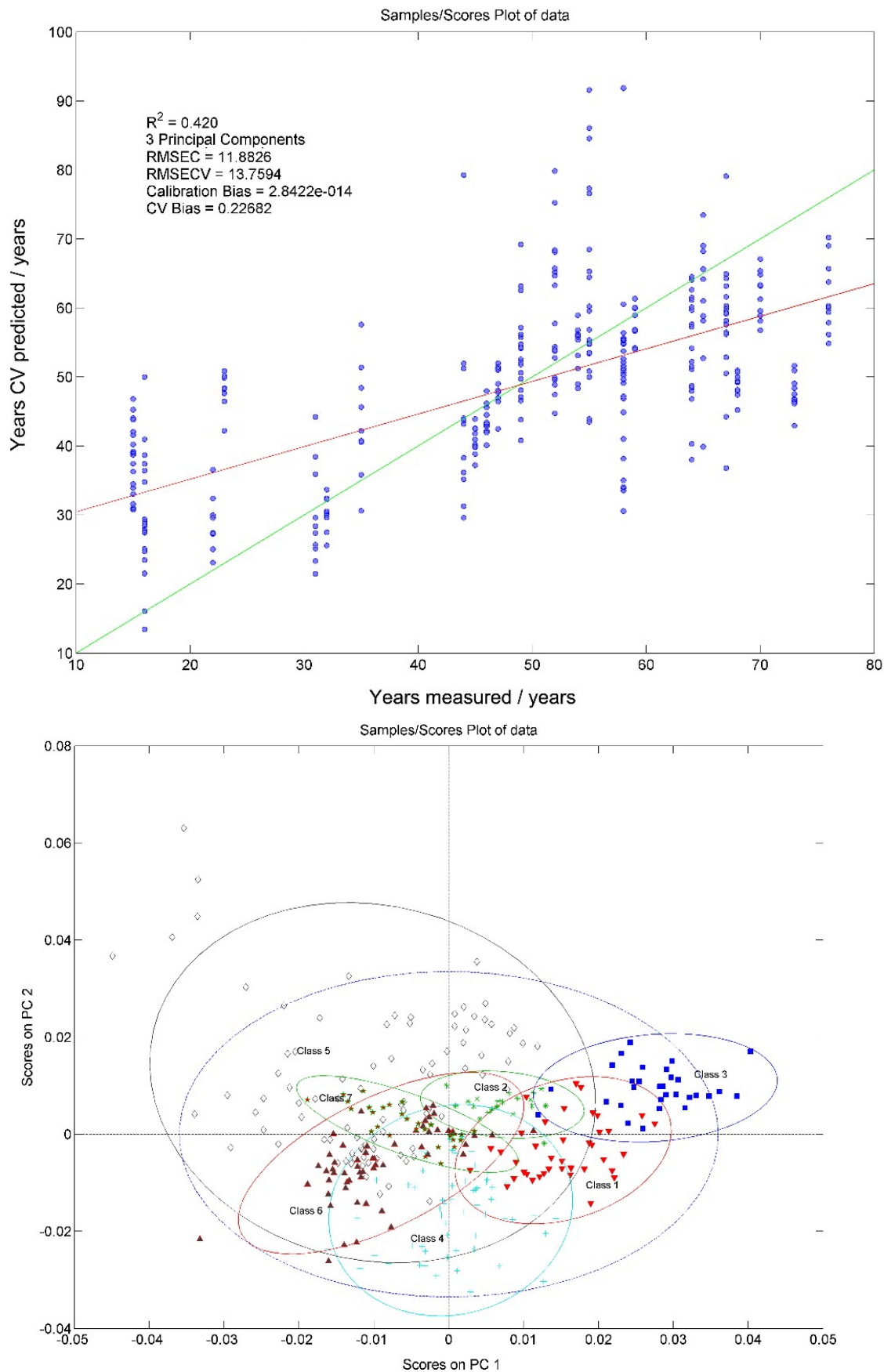
Dijagrami regresije za dob donora i dijagrami raspršenja za prve dvije glavne komponente su prikazani na Slikama 31-36, zasebno za svaku kombinaciju spola i pozicije snimanja. Crvene linije na regresijskim dijagramima predstavljaju aktualnu korelaciju između izmjerenih i predviđenih vrijednosti, a zelene linije predstavljaju idealnu korelaciju. PCA modeli temeljeni na spektrima apeksa pokazali su bolje razdvajanje dobnih skupina u usporedbi s modelima temeljenim na spektrima s krune i vrata. U skladu sa spomenutim rezultatima, PCR modeli za određivanje dobi temeljeni na spektrima apeksa pokazali su više koeficijente determinacije i niže vrijednosti parametara pogreške u usporedbi s modelima temeljenim na spektrima s krune i vrata. Dijagrami raspršenosti za spektre snimljene na apeksu pokazuju da su dobne skupine razdvojene samo uzduž osi koja odgovara PC1. U PCA modelu za muški apeks, mlađe dobne skupine (10-39 godina) bile su osobito dobro razdvojene od starijih dobnih skupina (40-79 godina). U usporedbi sa spomenutim rezultatima, više preklapanja među dobnim skupinama opaženo je u PCA modelu za ženski apeks. Suprotno modelima temeljenim na spektrima s apeksa, spektri snimljeni na kruni i vratu razlikovali su se prema obje glavne komponente (PC1 i PC2).



Slika 31. Dijagram regresije i dijagram raspršenosti za prve dvije glavne komponente, za model temeljen na apeksima muških donora.



Slika 32. Dijagram regresije i dijagram raspšenosti za prve dvije glavne komponente, za model temeljen na apeksima ženskih donora.

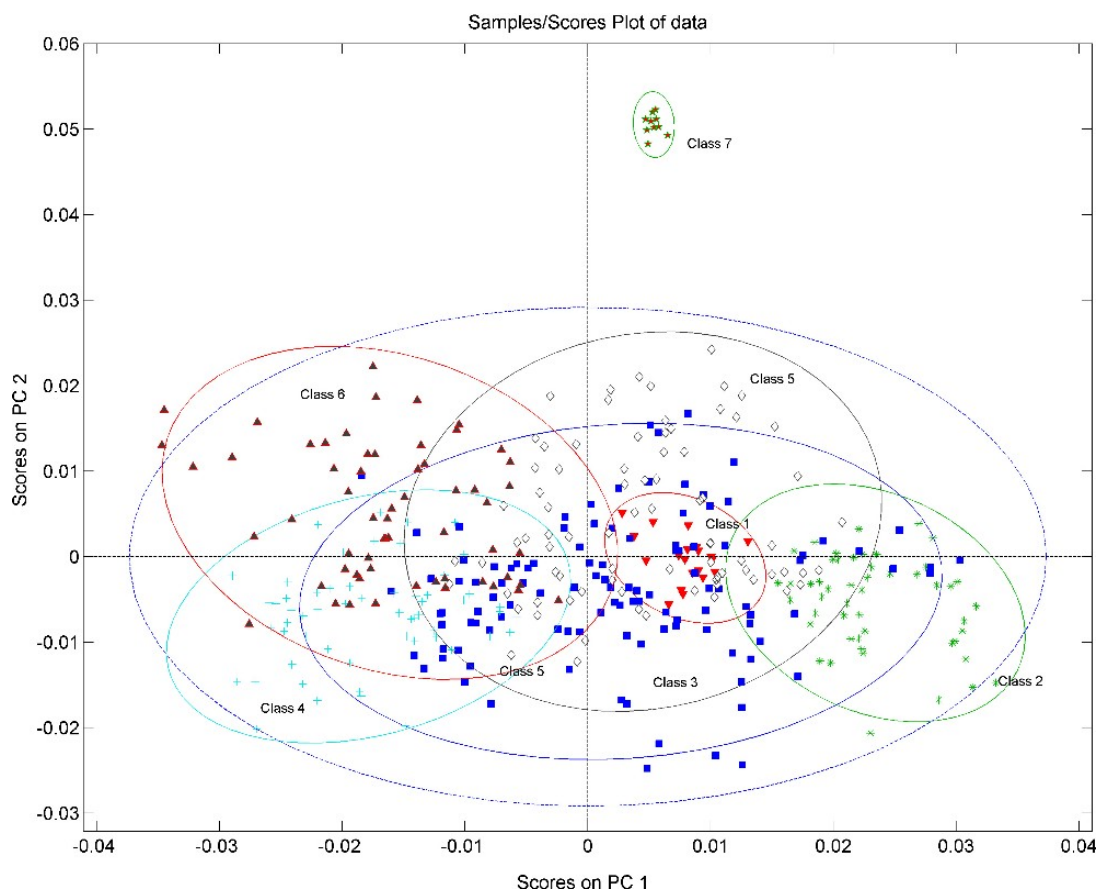
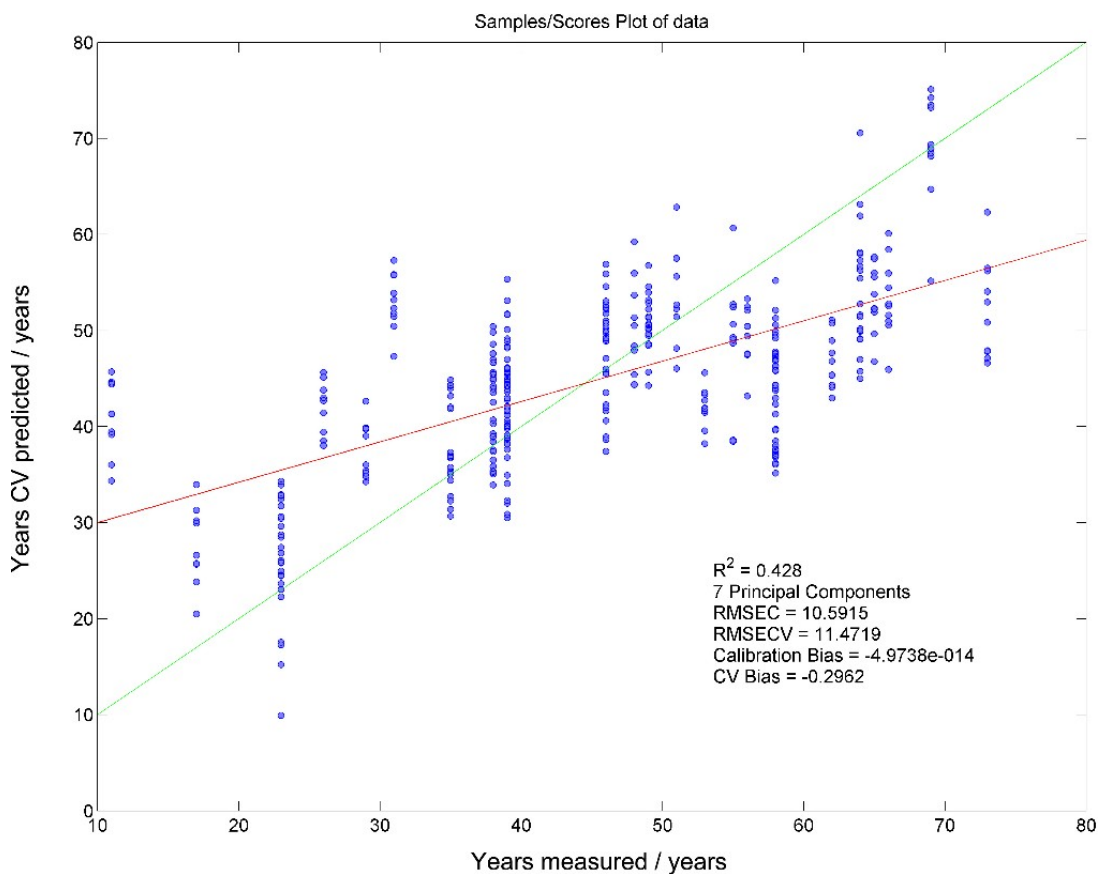


Slika 33. Dijagram regresije i dijagram raspršenosti za prve dvije glavne komponente, za model temeljen na krunama muških donora.

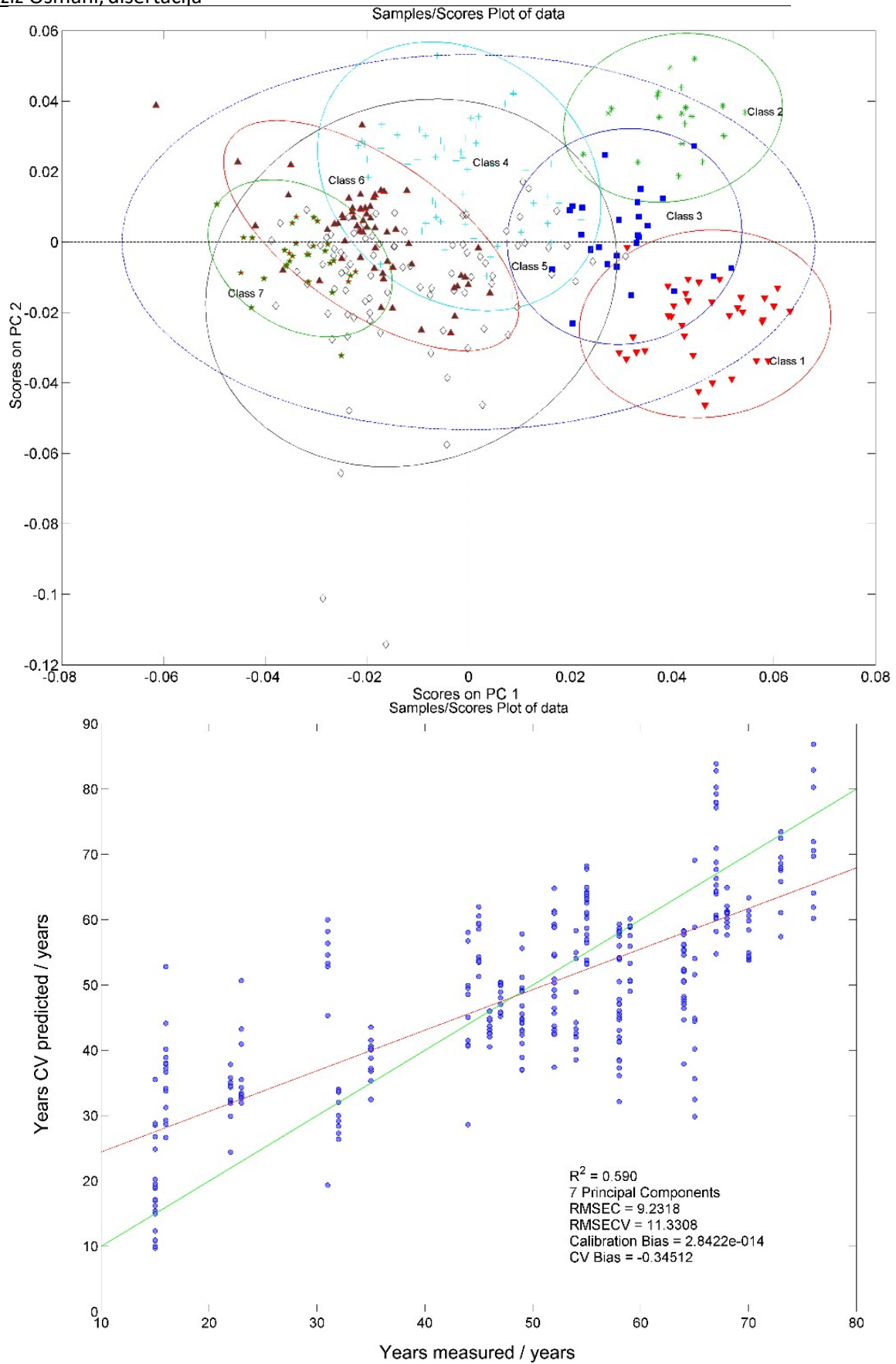
Slika 31 prikazuje dijagrame regresije i raspršenosti prvih dviju glavnih komponenata za model određivanja dobi pomoću spektara snimljenih na apeksima muških donora. Crvena linija u PCR dijagramu predstavlja stvarnu korelaciju između izmjerenih i predviđenih vrijednosti, a zelena linija predstavlja idealnu korelaciju. PCR model određivanja dobi iz spektara apeksa muških donora pokazao je relativno visok koeficijent determinacije od 0,839. PCA dijagram raspršenosti pokazuje dobro razdvajanje spektara nižih dobnih skupina, odnosno manju sposobnost razdvajanja kod starijih dobnih skupina. Najviše preklapanja među dobnim skupinama opažena je za tri najstarije dobne skupine.

Slika 32 prikazuje dijagrame regresije i raspršenosti prvih dviju glavnih komponenata za model određivanja dobi iz spektara snimljenih na apeksima ženskih donora. Idealna korelacija između izmjerenih i predviđenih vrijednosti na PCR dijagramu predstavljena je zelenom linijom, dok crvena linija predstavlja stvarnu korelaciju. PCR model određivanja dobi iz spektara apeksa ženskih donora pokazao je koeficijent determinacije od 0,713. Razdvajanje spektara na PCA dijagramu raspršenosti je slabije u usporedbi s PCA modelom koji se temeljio na spektrima s apeksa muških donora. Preklapanja su prisutna u svim dobnim skupinama.

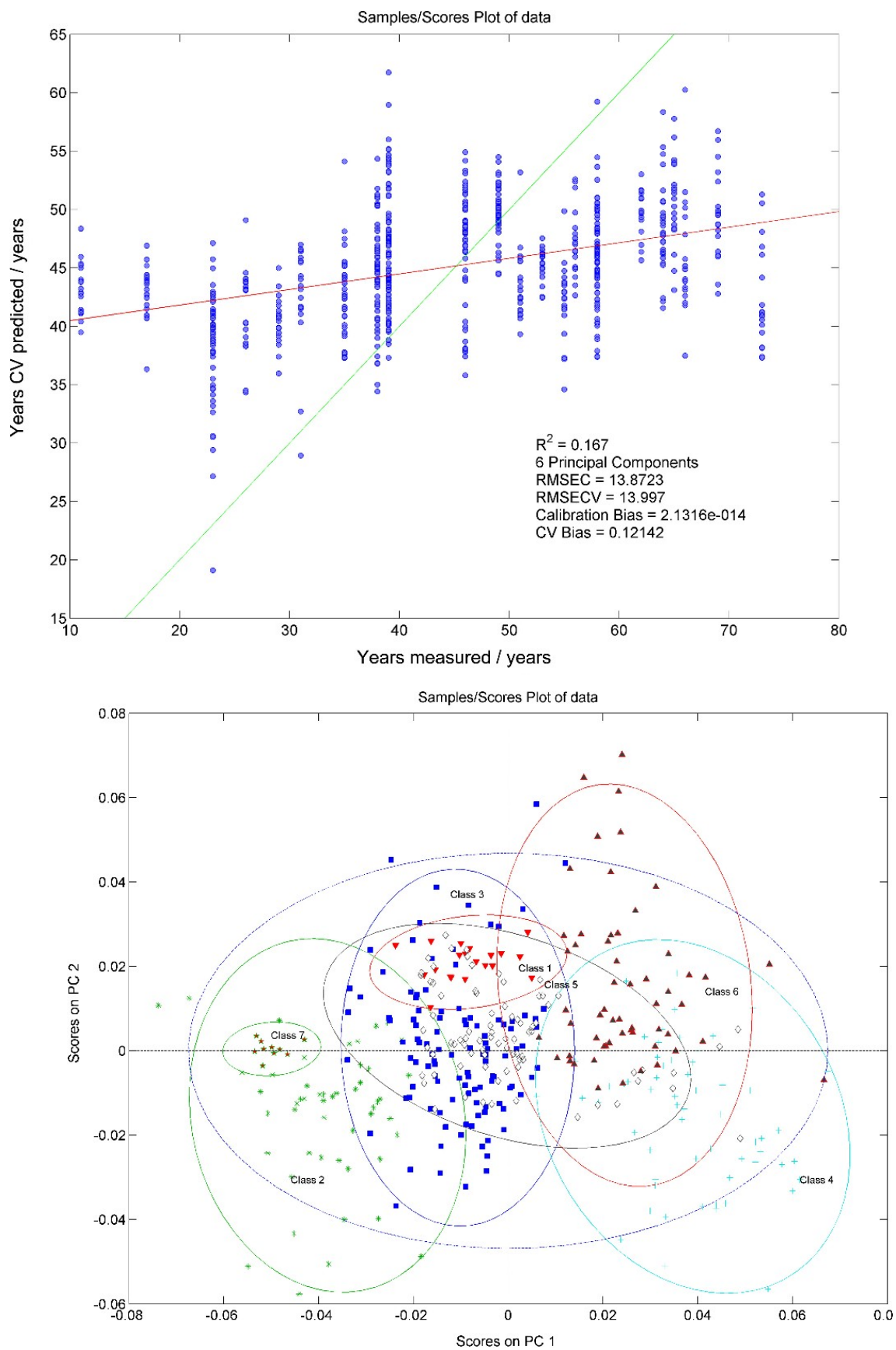
Na Slici 33 prikazani su dijagrami regresije i raspršenosti prvih dviju glavnih komponenata za model određivanja dobi iz spektara snimljenih na krunama muških donora. Crvena linija u PCR dijagramu predstavlja stvarnu (opaženu) korelaciju između izmjerenih i predviđenih vrijednosti, a zelena linija predstavlja idealnu korelaciju. PCR model određivanja dobi iz spektara zubnih kruna muških donora pokazao je koeficijent determinacije od 0,420. PCA dijagram raspršenosti pokazuje vrlo slabu sposobnost razdvajanja spektara u svim dobnim skupinama.



Slika 34. Dijagram regresije i dijagram raspršenosti za prve dvije glavne komponente, za model temeljen na krunama ženskih donora.



Slika 35. Dijagram regresije i dijagram raspršenosti za prve dvije glavne komponente, za model temeljen na zubnim vratovima muških donora.



Slika 36. Dijagram regresije i dijagram raspršenosti za prve dvije glavne komponente, za model temeljen na zubnim vratovima ženskih donora.

Na Slici 34 prikazani su dijagrami regresije i raspršenosti prvih dviju glavnih komponenata za model određivanja dobi iz spektara snimljenih na krunama ženskih donora. PCR model određivanja dobi iz spektara zubnih kruna ženskih donora pokazao je koeficijent determinacije od 0,428. Opažena korelacija izmjerenih i predviđenih vrijednosti označena je crvenom linijom, a idealna korelacija zelenom linijom. PCA dijagram raspršenosti pokazuje vrlo slabu sposobnost razdvajanja spektara uz izražena preklapanja pojedinih dobnih skupina.

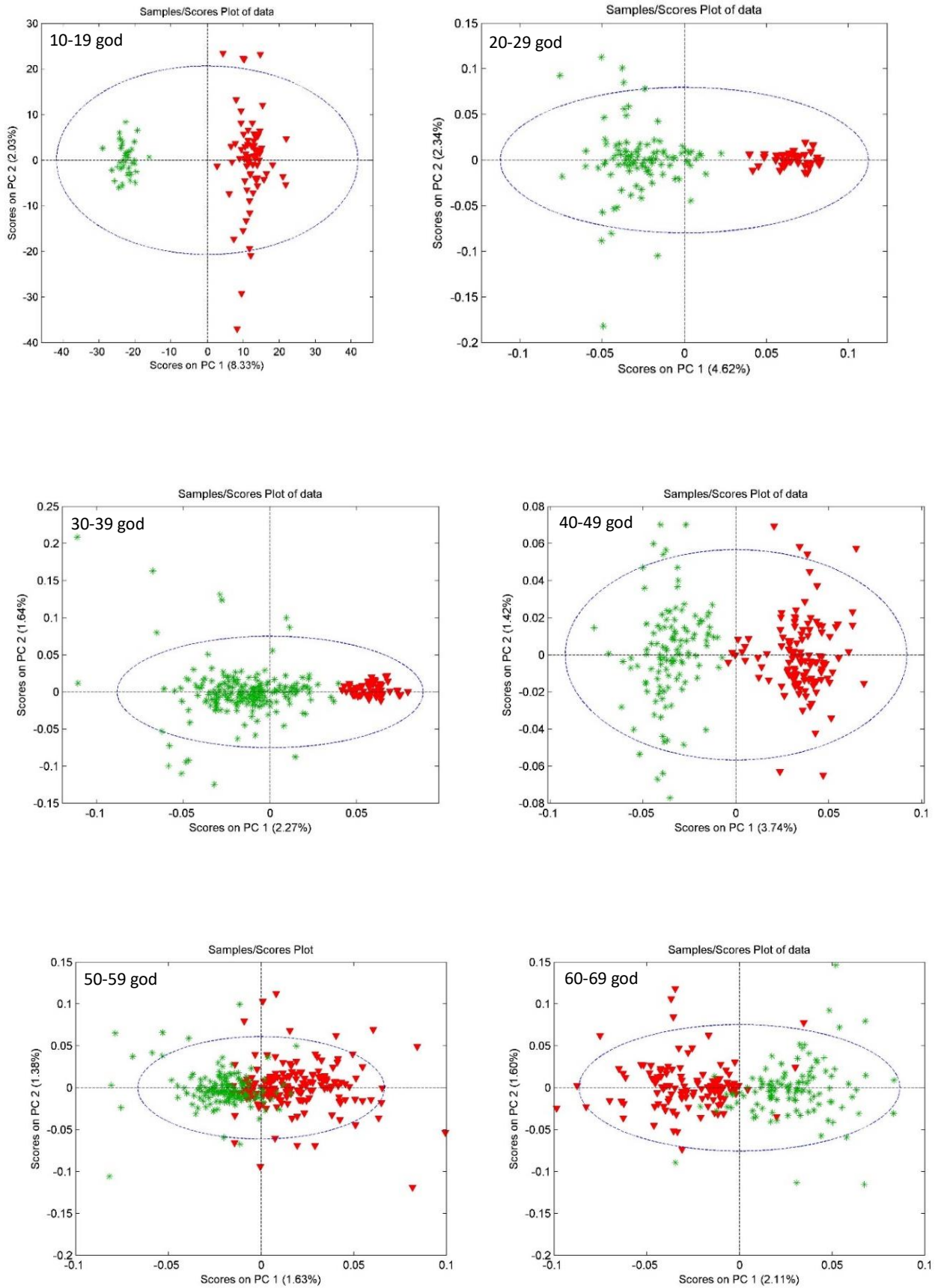
Na Slici 35 prikazani su dijagrami regresije i raspršenosti prvih dviju glavnih komponenata za model određivanja dobi iz spektara snimljenih na zubnim vratovima muških donora. Koeficijent determinacije za PCR model iznosio je 0,590. PCA dijagram raspršenosti pokazuje razmjerno slabu sposobnost razdvajanja spektara prema dobnim skupinama.

Slika 36 prikazuje dijagrame regresije i raspršenosti prvih dviju glavnih komponenata za model određivanja dobi iz spektara snimljenih na zubnim vratovima ženskih donora. Koeficijent determinacije PCR modela temeljenog na spektrima vratova ženskih donora iznosio je 0,167 i bio je najniži u usporedbi s koeficijentima determinacije dobivenim u PCR modelima temeljenim na spektrima snimljenim s drugih pozicija na zubu. Parametri pogreške RMSEC i RMSECV bili su najviši u usporedbi sa svim drugim PCR modelima određivanja dobi. PCA dijagram raspršenosti pokazao je slabu sposobnost razdvajanja spektara prema dobnim skupinama.

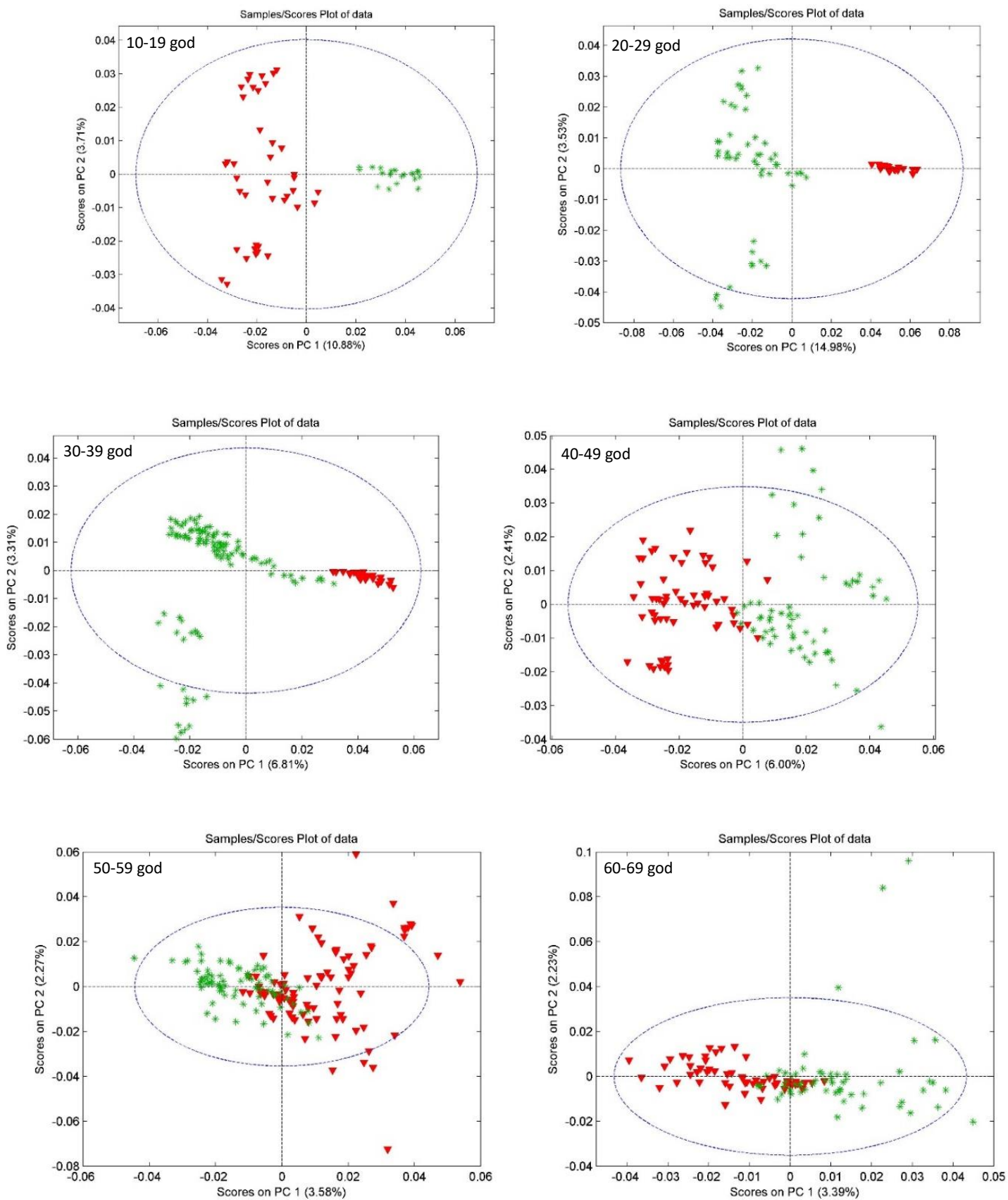
4.6. PCA dijagrami raspršenosti za odvajanje spektara prema spolu donora

Dijagrami raspršenosti za odvajanje spektara prema spolu prikazani su na Slikama 37-39. Zasebno su prikazani rezultati za spektre snimljene na apeksu, kruni i vratu zuba. Za svaku poziciju snimanja, zasebno su analizirani spektri za svaku od prethodno definiranih šest dobnih skupina. Grupiranje spektara prema spolu opaženo je za sve pozicije snimanja, pri čemu je razdvajanje općenito bilo bolje kod mlađih ispitanika i postupno opadalo s porastom dobi.

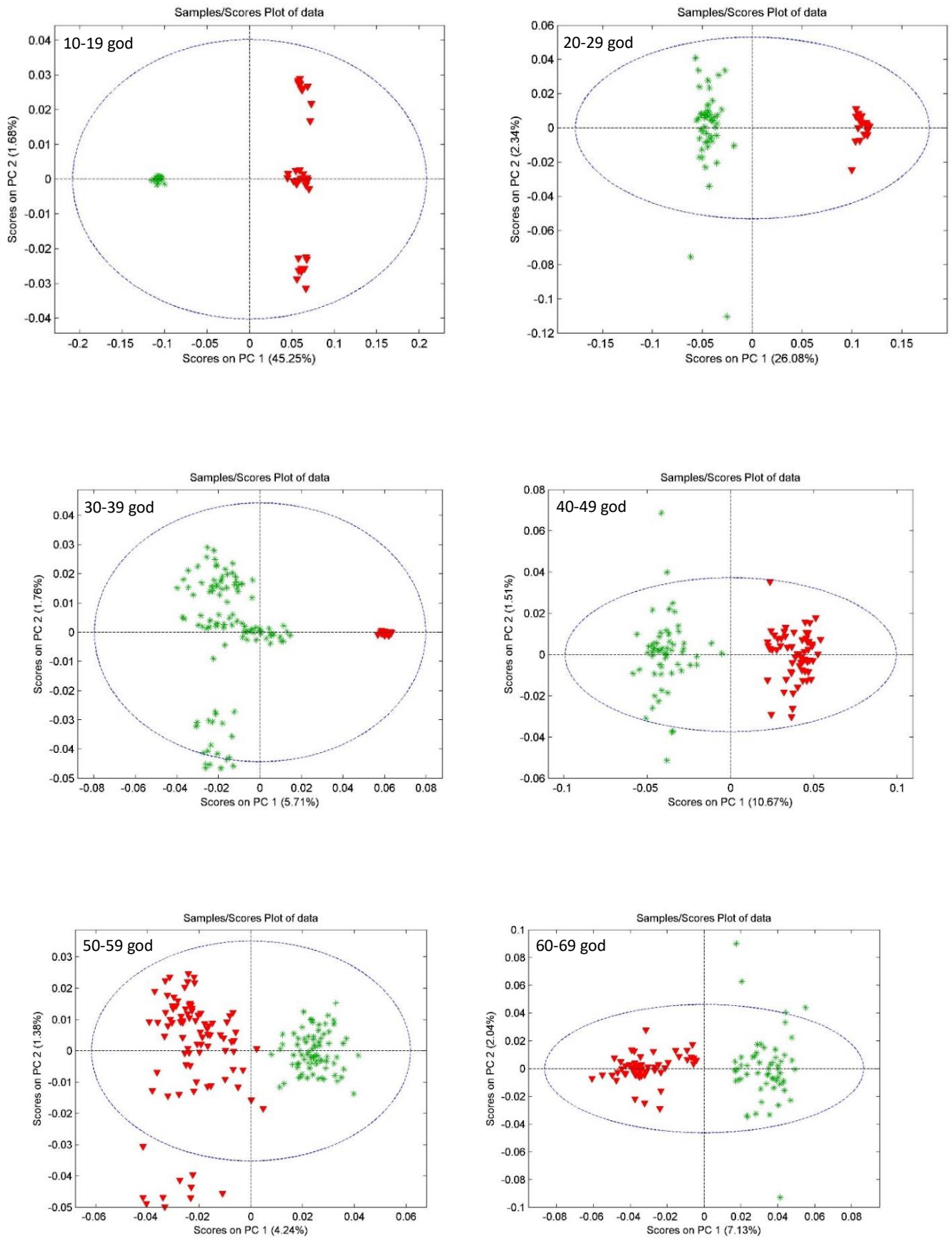
Na Slikama 41-43 prikazani su dijagrami raspršenosti za odvajanje spektara prema spolu temeljeni na podjeli prema skupini zuba (sjekutići, očnjaci, pretkutnjaci, kutnjaci) te za sve skupine zuba zajedno. Spektri sa svih triju pozicija snimanja (apeks, kruna i vrat zuba) bili su prikladni za odvajanje prema spolu. Za razdvajanje prema spolu najprikladnijim su se pokazali spektri snimljeni sa sjekutića i očnjaka, dok su pretkutnjaci i kutnjaci pokazali slabiju diskriminatornu vrijednost. Model u kojem su uzete u obzir sve skupine zubi bio je najslabije uspješan u razdvajanju prema spolu ispitanika.



Slika 37. Dijagrami raspšenosti za prve dvije glavne komponente PCA modela za određivanje spola temeljenog na spektrima s apeksa.



Slika 38. Dijagrami raspšenosti za prve dvije glavne komponente PCA modela za određivanje spola temeljenog na spektrima s kruna.



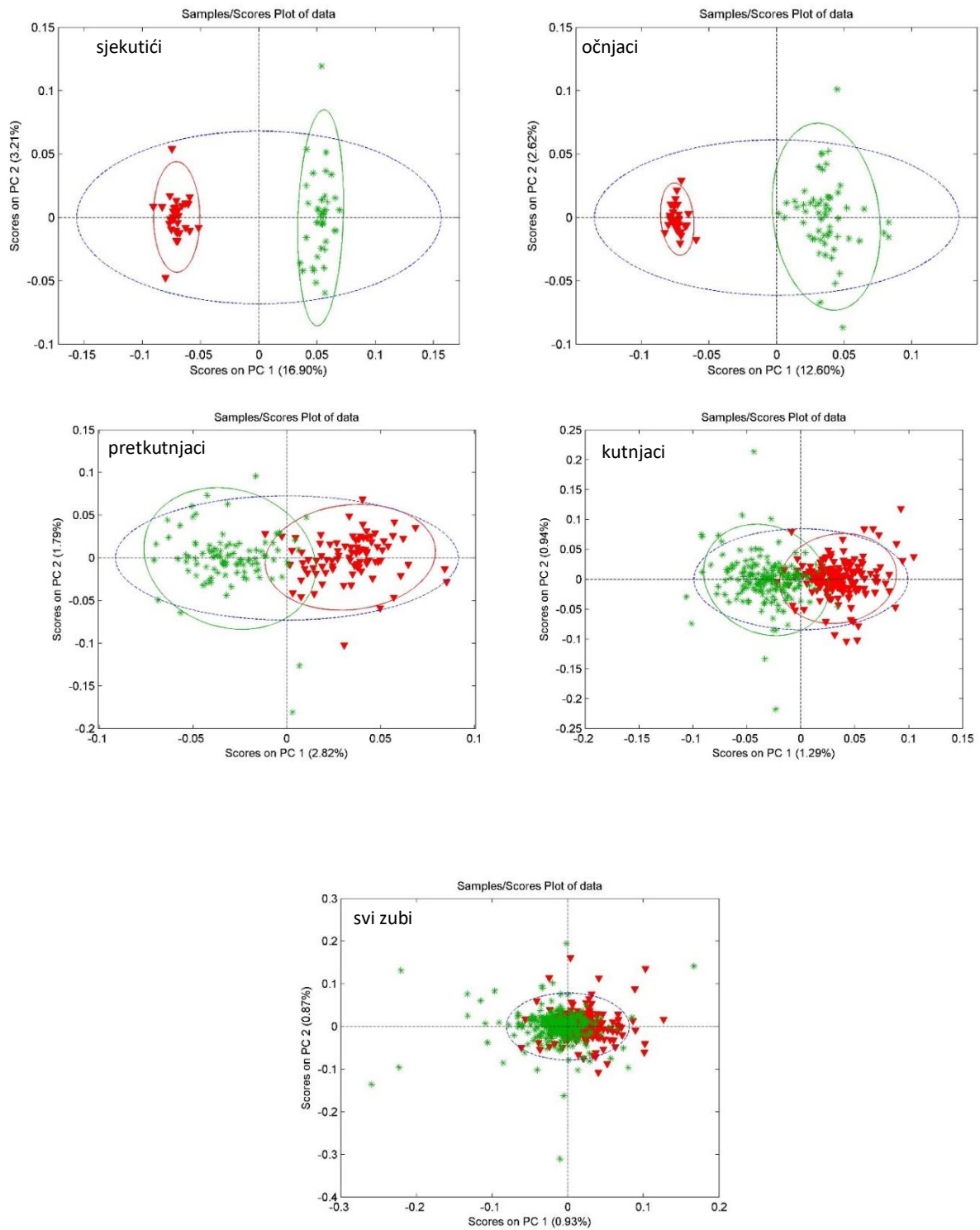
Slika 39. Dijagrami raspršenosti za prve dvije glavne komponente PCA modela za određivanje spola temeljenog na spektrima s vrata zuba.

Slike 37–39 prikazuju rezultate PCA modela za određivanje spola pomoću Ramanovih spektara snimljenih s različitih pozicija na zubu. Modeli su pripremljeni odvojeno za svaku od 7 dobnih skupina (10–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59 i 60–69 godina).

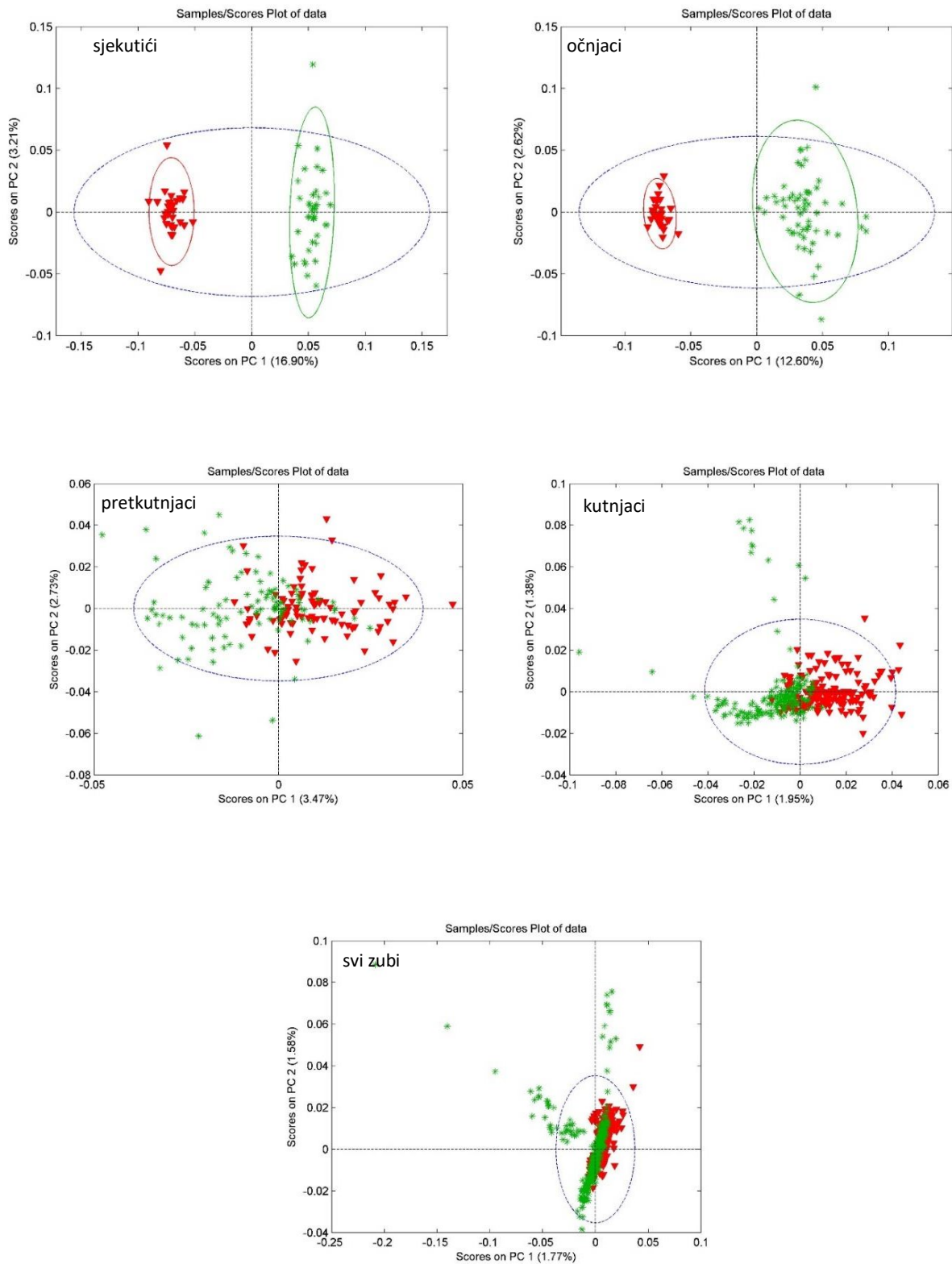
Na Slici 37 prikazano je razdvajanje spektara s apeksa korijena. Dobro razdvajanje prema spolovima opaženo je za dobne skupine od 10–19, 20–29 i 30–39 godina, dok su za dobnu skupinu od 40–49 godina opažena djelomična preklapanja. Najstarije dobne skupine (50–59 i 60–69 godina) pokazale su izraženija preklapanja.

Na Slici 38 prikazano je razdvajanje spektara snimljenih na kruni zuba prema spolu ispitanika. Dvije najmlađe dobne skupine (10–19 i 20–29 godina) pokazale su izrazito dobro razdvajanje spektara, dok je u dobnj skupini od 30–39 godina opaženo više preklapanja između spolova. U dobnim skupinama od 40–49, 50–59 i 60–69 godina preklapanja između spolova postala su još izraženija.

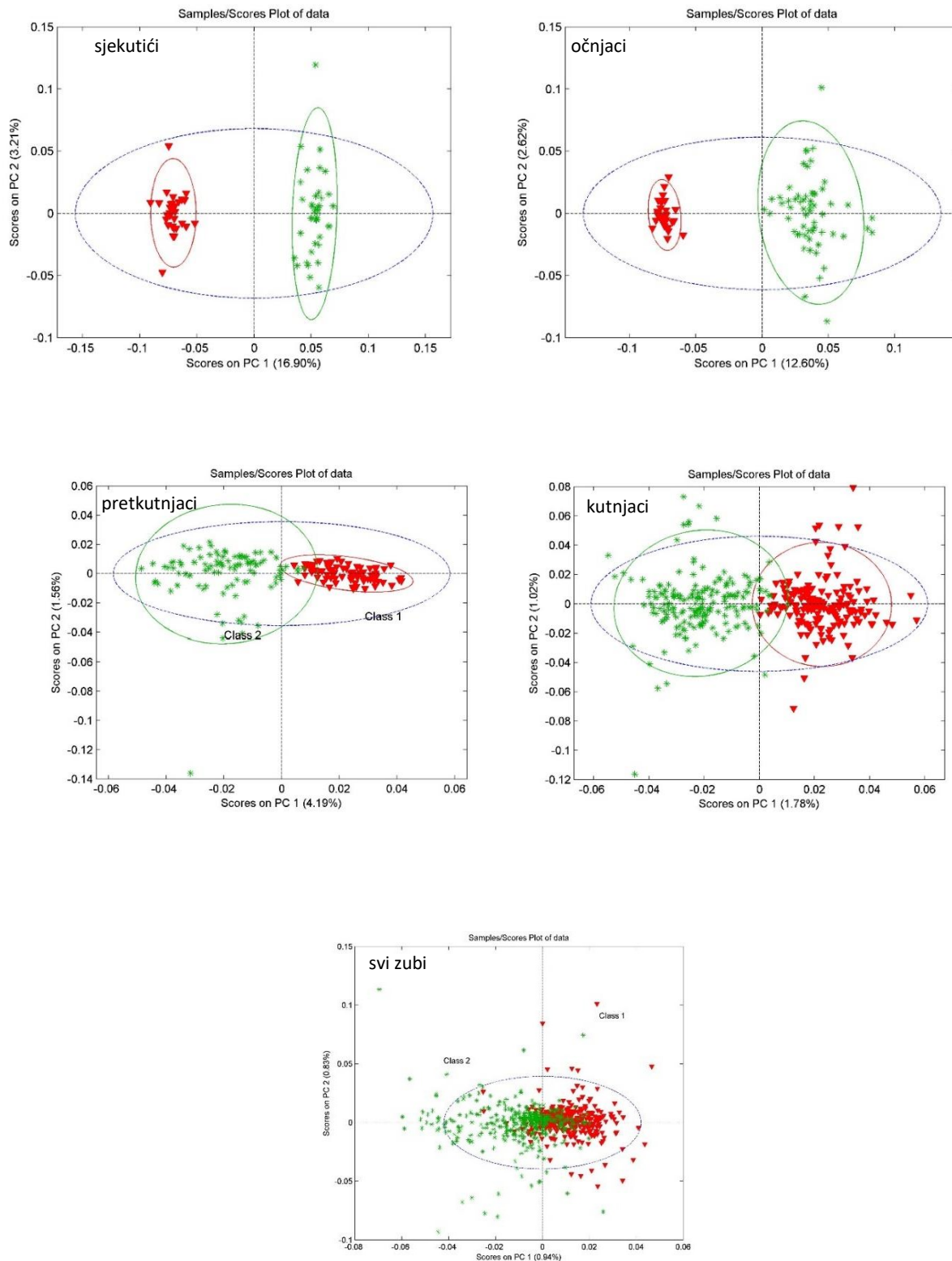
Na Slici 39 prikazano je razdvajanje spektara snimljenih na zubnom vratu prema spolu ispitanika. Razdvajanje prema spolovima bilo je vrlo dobro u svim dobnim skupinama (10–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59 i 60–69 godina).



Slika 40. Dijagrami raspšenosti za prve dvije glavne komponente PCA modela za određivanje spola temeljenog na spektrima s apeksa.



Slika 41. Dijagrami raspšenosti za prve dvije glavne komponente PCA modela za određivanje spola temeljenog na spektrima s krune.



Slika 42. Dijagrami raspšenosti za prve dvije glavne komponente PCA modela za određivanje spola temeljenog na spektrima s vrata zuba.

Slike 40–42 prikazuju rezultate PCA modela za određivanje spola na temelju Ramanovih spektara snimljenih s apeksa, krune i vrata zuba. Modeli su pripremljeni zasebno za različite skupine zubi: sjekutiće, očnjake, pretkutnjake i kutnjake.

Slika 40 prikazuje razdvajanje spolova ispitanika pomoću PCA modela temeljenog na spektrima s apeksa korijena. Opaženo je vrlo dobro razdvajanje za spektre sjekutića i očnjaka, dok je za pretkutnjake i kutnjake razdvajanje bilo razmjerno slabije. U zajedničkom PCA modelu razdvajanja spolova koji se temeljio na spektrima svih skupina zubi opažena su izraženija preklapanja.

Slika 41 prikazuje razdvajanje spolova ispitanika pomoću PCA modela temeljenog na spektrima s krune zuba. Razdvajanje je bilo slabije u usporedbi s rezultatima PCA modela temeljenog na spektrima s apeksa korijena. Preklapanja su opažena kod svih skupina zubi, a bila su jače izražena kod pretkutnjaka i kutnjaka u usporedbi sa sjekutićima i očnjacima. U zajedničkom PCA modelu za spektre s krune zuba u kojem su uzete u obzir sve skupine zubi opažena su znatna preklapanja.

Slika 42 prikazuje razdvajanje spolova ispitanika pomoću PCA modela temeljenog na spektrima s vrata zuba. Opažene su razlike u sposobnosti razdvajanja modela između pojedinih skupina zubi. Bolje razdvajanje postignuto je za spektre sjekutića i očnjaka, dok je slabije razdvajanje opaženo za spektre pretkutnjaka i kutnjaka. U zajedničkom modelu za spektre snimljene s vrata zuba opaženo je značajno preklapanje među spolovima ispitanika.

5. RASPRAVA

Određivanje starosne dobi ima važnu ulogu u forenzičkim istraživanjima. Unatoč širokom rasponu dostupnih metoda za određivanje dobi (137–158), istraživanja novih pristupa su dobrodošla kako bi se procijenile njihove potencijalne prednosti u usporedbi s postojećim tehnikama. Budući da svaka od metoda određivanja starosne dobi ima svoje prednosti i nedostatke, u praksi je poželjno na raspolaganju imati što veći broj različitih metoda kako bi se mogla odabrati najprikladnija metoda za pojedinu forenzičku primjenu. U ovom kontekstu, Ramanova spektroskopija predstavlja zanimljivu i nedostavno istraženu tehniku za forenzičko određivanje dobi (159,160). Za potencijalnu forenzičku primjenu Ramanove spektroskopije bilo je potrebno ispitati mogu li se promjene strukture i sastava tvrdih zubnih tkiva uzrokovane starenjem pratiti pomoću Ramanovih spektara tvrdih zubnih tkiva. Stoga su Ramanovi spektri snimljeni na zubima donora poznatih starosnih dobi i analizirani pomoću PCA kako bi se ustanovile glavne komponente koje najviše koreliraju s dobi. Pomoću dobivenih glavnih komponenata priređen je PCR model koji povezuje spektralne informacije sadržane u glavnim komponentama sa starosnom dobi donora zubi, omogućavajući forenzičku primjenu modela za određivanje dobi nepoznatih ispitanika.

U vrijeme izrade ovog rada, dvije istraživačke skupine već su bile opisale primjenu Ramanove spektroskopije za forenzičko određivanje dobi (128,129). Njihovi modeli određivanja dobi temelje se na određivanju pojedinih spektralnih karakteristika koje se zatim koriste za izradu regresijskog modela. Takav postupak uključuje odabir pojedinih spektralnih vrpca, njihovu kvantifikaciju i uporabu dobivenih parametara za izračun regresijskih formula. U ovom radu se koristi drukčiji pristup u kojem se umjesto odabranih spektralnih karakteristika u obzir uzimaju cijeli Ramanovi spektri (86). Prednost takvog pristupa je manja subjektivnost u odabiru pojedinih vrpca i izračunavanju regresijskih formula te maksimizacija iskoristivosti spektralnih informacija, s obzirom da se analiza temelji na svim valnim brojevima, a ne na pojedinim vrpcama. Nedostatak primijenjenih kemometrijskih metoda PCA i PCR predstavlja nepostojanje fizikalnog modela kojim bi se definirale konkretne promjene sastava i strukture tvrdih zubnih tkiva koje nastupaju s dobi (161). Međutim, za praktičnu primjenu u forenzici konkretni fizikalni model nije nužan, s obzirom da se analizom nastoji dobiti regresijski model temeljen na predviđanju dobi iz spektralnih informacija, bez potrebe za kvantifikacijom i interpretacijom pojedinačnih strukturnih i kemijskih promjena u tvrdim zubnim tkivima. U tom smislu je redukcija dimenzionalnosti i prepoznavanje glavnih komponenata od veće praktične vrijednosti nego identifikacija konkretnih promjena u pojedinim spektralnim karakteristikama. Međutim, praćenjem dijagrama opterećenja glavnih komponenata bilo je moguće ugrubo

identificirati dijelove spektra koji su nosili najveći dio korisnih informacija povezanih s dobi ispitanika. U okviru ovog istraživanja, ustanovljeno je da promjene povezane sa starenjem potječu iz anorganskog i organskog dijela tvrdih zubnih tkiva (162). Opsežnija analiza konkretnih strukturnih i kemijskih promjena koje nastupaju sa starenjem u tvrdim zubnim tkivima bila je izvan dosega ovog rada, ali može poslužiti kao potencijalna tema za buduća istraživanja.

Ovo istraživanje pokazalo je da se Ramanovi spektri tvrdih zubnih tkiva mogu koristiti za izradu PCR modela određivanja dobi za forenzičku primjenu. Prediktivne sposobnosti dobivenih modela razlikovale su se ovisno o poziciji snimanja spektara, odnosno o zastupljenosti pojedine vrste tvrdog zubnog tkiva na tim pozicijama (163).

Na Ramanovim spektrima snimljenim na apeksu, vratu i kruni zuba opažaju se vibracijske vrpce anorganskog dijela tvrdih zubnih tkiva ($1100\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), odnosno organskog dijela ($3100\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$) (Slika 26). Različiti omjeri intenziteta vibracijskih vrpce u spektrima snimljenim na apeksu, vratu i kruni zuba upućuju na razlike u relativnim udjelima organskih i anorganskih sastojaka između pojedinih tvrdih zubnih tkiva. Anorganskih sastojaka bilo je više u tvrdim zubnim tkivima koja su izrazito mineralizirana (caklina) nego u slabije mineraliziranim tkivima (dentin i cement). Stoga su intenziteti vrpce koje predstavljaju anorganski dio bili veći u spektrima snimljenim na kruni zuba u usporedbi sa spektrima snimljenim na vratu i apeksu. Obratno, relativni intenziteti vrpce koje predstavljaju organski dio sastava tvrdih zubnih tkiva bili su izraženiji u spektrima s apeksa i vrata nego u spektrima s krune zuba. Razlike u relativnim intenzitetima pojedinih vrpce potječu od činjenice da sva tvrda zubna tkiva sadržavaju iste strukturne elemente, čiji se odnosi međusobno razlikuju među pojedinim tkivima ovisno o stupnju njihove mineralizacije. Glavni mineralni sastojak svih tvrdih zubnih tkiva je kalcij-deficijentni hidroksiapatit, a organski dio se većinom sastoji od kolagena. Relativni omjeri organskih i anorganskih sastojaka u metabolički aktivnim tvrdim zubnim tkivima (dentin i cement) se starenjem mijenjaju u korist mineraliziranih sastojaka. Primjerice, stupanj mineralizacije dentina povećava se sa starenjem u skladu sa smanjenjem lumena dentinskih kanalića i taloženjem mineralnih sastojaka. Međutim, varijacije stupnja mineralizacije dentina ovisne o dobi znatno su manje od konstitucijskih razlika u stupnju mineralizacije između cakline i dentina. Naime, caklina je tkivo s najvišim mineralnim udjelom u ljudskom tijelu, s prosječnim mineralnim udjelom od 96 %, dok dentin u prosjeku sadržava znatno niži udio mineralnih sastojaka (65 %).

Kako bi se vizualizirale promjene Ramanovih spektara ovisnih o dobi, spektri su podijeljeni u

7 dobnih skupina po 10 godina (10–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69 i 70–79 godina) i izračunati su prosječni spektri za svaku dobnu skupinu. Primjer podjele spektara po dobnim skupinama snimljenih na apeksu muških donora prikazan je na Slici 27. Na spektrima normiranim na vrpce na 960 cm^{-1} vidljive su promjene intenziteta između pojedinih dobnih skupina donora. Dosljedne promjene spektralnih karakteristika koje se odvijaju s porastom dobi donora omogućavaju izradu PCR modela za forenzičko određivanje starosne dobi. Kad ne bi bilo sustavnih promjena u spektralnim karakteristikama ovisnih o dobi donora, PCR modele za određivanje dobi iz Ramanovih spektara ne bi bilo moguće izraditi.

Slika 28 prikazuje dijagrame opterećenja za spektre snimljene na apeksu korijena zuba. Referentni spektar na dnu slike prikazuje glavne vibracijske vrpce koje su bile opažene u spektru snimljenom na apeksu: C-H istezanje (2940 cm^{-1}), amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), amidi III (1242 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}), simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}), asimetrično savijanje PO_4 (590 cm^{-1}) i simetrično savijanje PO_4 (431 cm^{-1}). Za muške donore su prikazana opterećenja prvih triju glavnih komponenata, dok su za ženske donore prikazana opterećenja prvih sedam glavnih komponenata. Prikazane glavne komponente iskorištene su za izradu modela određivanja dobi. Sve prikazane glavne komponente sadržavale su spektralne informacije iz organskog i anorganskog dijela spektra tvrdih zubnih tkiva. Glavne komponente konstruirane su na način da je udio varijance najveći za prvu glavnu komponentu i smanjuje se sa svakom sljedećom. To se na slici opaža kao postupno smanjenje omjera signal/šum od prve prema ostalim glavnim komponentama. Primjerice, može se opaziti kako je kod ženskih donora najveći udio informacije o varijabilnosti sadržan u prvoj glavnoj komponenti, dok šesta i sedma glavna komponenta sadržavaju srazmjerno manju količinu korisnih informacija. Najveći udio korisnih spektralnih informacija kod oba spola potjecao je iz sljedećih vrpca: amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), amidi III (1242 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}) i simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}). Kod muških donora utjecaj je imala i vrpca koja odgovara C-H istezanju (2940 cm^{-1}). Kod ženskih donora spomenuta vrpca je imala relativno manje značajnu ulogu.

Slika 29 prikazuje dijagrame opterećenja za spektre snimljene na kruni zuba. Referentni spektar na dnu slike tipičan je za visoko mineralizirana tvrda zubna tkiva (caklina) s malim udjelom organskih komponenata. Vrpce koje odgovaraju anorganskom dijelu spektra su stoga značajno izraženije nego vrpce koje pripadaju organskom dijelu spektra. Na spektru cakline snimljenom na kruni zuba opažaju se sljedeće vibracijske vrpce: C-H istezanje (2940 cm^{-1}), amidi I (1665

cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}), simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}), asimetrično savijanje PO_4 (590 cm^{-1}) i simetrično savijanje PO_4 (431 cm^{-1}). Za razliku od spektra snimljenog na apeksu zuba (Slika 28), vrpca koja odgovara amidima III (1242 cm^{-1}) bila je vrlo slabo definirana na spektru cakline prikazanom na Slici 29. Opterećenja prvih triju glavnih komponenata za muške donore, odnosno prvih sedam glavnih komponenata za ženske donore pokazuju doprinose iz organskog i anorganskog dijela spektra. Udio varijabilnosti najveći je kod prve glavne komponente, a smanjuje se u ostalim glavnim komponentama. Najveći doprinos korisnim spektralnim informacijama dale su sljedeće vrpce: amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), amidi III (1242 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}) i simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}). Vrpca koja odgovara C-H istezanju (2940 cm^{-1}) imala je značajniji utjecaj kod muških nego kod ženskih donora.

Slika 30 prikazuje dijagrame opterećenja za spektre snimljene na kruni zuba. Referentni spektar na dnu slike prikazuje vibracijske vrpce organskih i anorganskih komponenata tvrdih zubnih tkiva. Spektar nalikuje spektru cementa s apeksa korijena prikazanom na Slici 28, a sadržava sljedeće vibracijske vrpce: C-H istezanje (2940 cm^{-1}), amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), amidi III (1242 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}), simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}), asimetrično savijanje PO_4 (590 cm^{-1}) i simetrično savijanje PO_4 (431 cm^{-1}). Zastupljenost organskih i anorganskih komponenata ukazuje na prisutnost dentina i cementa na području zubnog vrata. Opterećenja prvih sedam glavnih komponenata za muške donore, odnosno prvih šest glavnih komponenata za ženske donore pokazuju doprinose iz organskog i anorganskog dijela spektra. Najveći udio korisnih informacija kod spektara snimljenih na kruni zuba potjecao je iz sljedećih vrpca: amidi I (1665 cm^{-1}), C-H savijanje (1450 cm^{-1}), amidi III (1242 cm^{-1}), asimetrično istezanje PO_4 i simetrično istezanje CO_3 (1069 cm^{-1}) i simetrično istezanje PO_4 (960 cm^{-1}).

Na Slici 31 su prikazani dijagrami regresije i raspršenosti za prve dvije glavne komponente za model temeljen na apeksima muških donora. Crvene linije u dijagramima regresije predstavljaju stvarnu korelaciju između izmjerenih i predviđenih vrijednosti, dok zelene linije predstavljaju idealnu korelaciju. Regresijski model za apekse muških donora izrađen na temelju prvih triju glavnih komponenti pokazao je relativno visok koeficijent determinacije od 0,839. Koeficijent determinacije predstavlja udio varijance zavisne varijable koji se može objasniti nezavisnim varijablama. PCA dijagram raspršenosti za spektre s apeksa muških donora pokazuje dobro razdvajanje spektara nižih dobnih skupina (uz iznimku preklapanja

prvih dviju dobnih skupina) koje se smanjivalo prema starijim dobnim skupinama. Najviše preklapanja, tj. najslabija sposobnost razdvajanja opažena je za tri najstarije dobne skupine (50–59, 60–69, 70–79 godina), što upućuje na činjenicu da promjene u spektralnim karakteristikama postaju sve manje s porastom dobi donora. Ovakav nalaz je u skladu s općenitim usporavanjem metabolizma u starijoj životnoj dobi. Posljedica je slabija preciznost određivanja dobi kod starijih ispitanika.

Slika 32 prikazuje dijagrame regresije i raspršenosti za prve dvije glavne komponente za model temeljen na apeksima ženskih donora. Kao i na prethodnoj slici, crvene linije u dijagramima regresije predstavljaju stvarnu korelaciju između izmjerenih i predviđenih vrijednosti, dok zelene linije predstavljaju idealnu korelaciju. Regresijski model za apekse ženskih donora izrađen je primjenom prvih sedam glavnih komponenata i pokazao je manji koeficijent determinacije u usporedbi s onim dobivenim za muške apekse (0,713 naspram 0,839). PCA dijagram raspršenosti za spektre s apeksa ženskih donora pokazuje nešto slabiju sposobnost razdvajanja spektara nego kod PCA modela za apekse muških donora. Značajna preklapanja opažena su u svim dobnim skupinama, što je u skladu s nižim koeficijentom determinacije PCR modela za određivanje dobi. Preklapanja su opažena među mlađim i starijim dobnim skupinama. Porast preklapanja ovisan o dobi ispitanika koji je bio opažen za spektre s muških apeksa nije opažen za ženske apekse. Mogući uzrok ovakvom nalazu je varijabilnost u vremenu nastupa hormonalnih promjena između pojedinih donora ženskog spola. Može se pretpostaviti da se posljedično usporavanje metaboličkih promjena koje se odrazilo na varijabilnost spektara nije odvijalo dosljedno s dobi ispitanika, kao što je bio slučaj kod muških ispitanika. Spomenute razlike vjerojatan su uzrok manjeg koeficijenta determinacije PCR modela za određivanje dobi kao i izraženijeg preklapanja spektara u PCA modelu za spektre snimljene sa ženskih apeksa u usporedbi sa spektrima snimljenim s muških apeksa.

Na Slici 33 prikazani su dijagrami regresije i raspršenosti za prve dvije glavne komponente za model temeljen na krunama muških donora. Regresijski model za krune muških donora temeljen na prve tri glavne komponente pokazao je znatno niži koeficijent determinacije (0,420) u usporedbi s koeficijentima determinacije opaženim kod regresijskih modela temeljenih na spektrima apeksa korijena (0,713 za ženske donore, odnosno 0,839 za muške donore). U skladu s nižim koeficijentom determinacije, parametri pogreške RMSEC i RMSECV bili su veći nego kod regresijskog modela temeljenog na spektrima s apeksa. PCA dijagram raspršenosti za spektre s kruna muških donora pokazuje vrlo slabu sposobnost razdvajanja spektara neovisno o dobnj skupini donora. Značajna preklapanja pojedinih dobnih

skupina i slaba sposobnost razdvajanja posljedica su spektralnih promjena na caklini koje se ne odvijaju dosljedno s porastom dobi donora, već su pod izrazitijim utjecajem okolišnih čimbenika. Ovakvi nalazi upućuju na činjenicu da spektri prikupljeni s kruna muških ispitanika nisu pogodni za izradu modela određivanja dobi.

Na Slici 34 prikazani su dijagrami regresije i raspršenosti za prve dvije glavne komponente za model temeljen na krunama ženskih donora. Regresijski model za krune ženskih donora temeljen na prvih sedam glavnih komponenata pokazao je nizak koeficijent determinacije (0,428). Spomenuti koeficijent determinacije sličan je onom dobivenom kod regresijskog modela za krune muških donora (0,420), odnosno značajno je niži od koeficijenata determinacije opaženih kod regresijskih modela temeljenih na spektrima apeksa (0,713 za ženske donore, odnosno 0,839 za muške donore). Parametri pogreške RMSEC i RMSECV za regresijski model temeljen na krunama ženskih donora također su veći nego kod regresijskog modela temeljenog na spektrima s apeksa, neovisno o spolu. PCA dijagram raspršenosti za spektre s kruna ženskih donora pokazuje vrlo slabu sposobnost razdvajanja spektara neovisno o dobnoj skupini donora. Srazmjerno slaba sposobnost razdvajanja uz izražena preklapanja pojedinih dobnih skupina opažena je i za spektre snimljene s krune muških donora. Veći utjecaj okolišnih čimbenika na spektre snimljene s pozicije krune zuba (neovisno o spolu) u odnosu na promjene koje se odvijaju dosljedno sa starenjem značajno umanjuje preciznost modela određivanja dobi.

Na Slici 35 prikazani su dijagrami regresije i raspršenosti za prve dvije glavne komponente za model temeljen na zubnim vratovima muških donora. Koeficijent korelacije regresijskog modela temeljenog na spektrima snimljenim s vratova muških donora (0,590) bio je niži u usporedbi s vrijednostima dobivenim za spektre s apeksa korijena (0,713 za ženske donore, odnosno 0,839 za muške donore), ali viši u usporedbi s vrijednostima regresijskog modela temeljenog na spektrima zubne krune (0,420–0,428). PCA dijagram raspršenosti za spektre sa zubnih vratova muških donora pokazuje slabiju sposobnost razdvajanja spektara na temelju dobnih skupina u usporedbi s modelima temeljenim na spektrima s apeksa. Međutim, opažena sposobnost razdvajanja spektara po dobnim skupinama bila je nešto bolja u usporedbi s PCA modelom temeljenim na spektrima s krune zuba. Ovakvi nalazi ukazuju na heterogenost promjena u tvrdim zubnim tkivima prisutnim na zubnim vratovima koje su djelomično pod utjecajem starenja, a djelomično pod utjecajem okolišnih čimbenika neovisnih o starenju. Varijabilnost uzrokovana djelovanjem okolišnih čimbenika umanjuje preciznost PCR modela za određivanje dobi, odnosno sposobnost PCA modela za odvajanje spektara prema dobnim

skupinama.

Slika 36 prikazuje dijagrame regresije i raspršenosti za prve dvije glavne komponente za model temeljen na zubnim vratovima ženskih donora. Koeficijent korelacije regresijskog modela temeljenog na spektrima snimljenim s vratova ženskih donora (0,167) bio je najniži od svih ostalih regresijskih modela. Sukladno niskoj preciznosti modela, parametri pogreške RMSEC i RMSECV bili su najviši u usporedbi sa svim drugim PCR modelima određivanja dobi. PCA dijagram raspršenosti za spektre sa zubnih vratova ženskih donora pokazao je slabu sposobnost razdvajanja spektara na temelju dobi skupina. Slično kao i kod spektara snimljenih na zubnim vratovima muških donora, opažene promjene u spektrima tvrdih zubnih tkiva na zubnim vratovima ženskih donora bile su pod izrazitim utjecajem okolišnih čimbenika, što je unijelo značajan udio nekontrolirane varijabilnosti i posljedično umanjilo preciznost PCR modela za određivanje dobi. Iz istog razloga je i PCA model za odvajanje spektara prema dobnim skupinama pokazao slabu sposobnost razdvajanja.

Iz rezultata prikazanih na Slikama 31–36 može se opaziti kako su prediktivne vrijednosti modela za određivanje dobi značajno ovisile o mjestu snimanja spektara. Pripadajući koeficijenti determinacije prikazani u Tablici 4 (0,71–0,84 za apeks korijena, 0,42–0,43 za krunu zuba te 0,17–0,59 za vrat zuba) odražavaju preciznost PCR modela određivanja dobi temeljenih na pojedinim mjestima snimanja. Zbog značajnog utjecaja spola ispitanika, za svako mjesto snimanja spektara izrađeni su zasebni modeli određivanja dobi. Uz takve odvojene modele, izrađeni su i zajednički modeli za svako mjesto snimanja, u kojima su uzeti u obzir spektri ispitanika obaju spolova. Dobiveni zajednički modeli pokazali su izrazito nisku prediktivnu vrijednost, uz koeficijente determinacije od 0,18–0,24 i pripadajuće visoke vrijednosti parametara pogreške RMSEC i RMSECV. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je za ostvarivanje dostatne prediktivne vrijednosti modela za određivanje dobi u uvjetima ovog istraživanja bilo nužno analizirati svaki spol zasebno.

Preciznost regresijskih modela za određivanje dobi ovisila je o omjeru varijance koja se može pripisati promjenama povezanim s dobi donora zuba, odnosno nekontrolirane varijance uzrokovane različitim izvanjskim čimbenicima i genetskim razlikama među donorima (164). Relativni odnosi ovih dvaju izvora varijance izrazito su se razlikovali između pojedinih pozicija snimanja spektara (kruna, vrat i apeks), što se odrazilo na prikladnost pojedine pozicije za izradu modela određivanja dobi. Visoke vrijednosti koeficijenta determinacije dobivene za PCR modele temeljene na spektrima s apeksa (0,71–0,84) pokazuju da ispravan odabir pozicije prikupljanja spektara može smanjiti udio nekontrolirane varijance. Niže vrijednosti

koeficijenta determinacije dobivene su za PCR modele temeljene na spektrima snimljenim na vratu i kruni zuba (0,17–0,52), što ukazuje na veći udio nekontrolirane varijance na tim pozicijama. Razlike u prikladnosti spektara snimljenih s različitim pozicija na površini zuba mogu se objasniti pomoću razlika u zastupljenosti pojedinih vrsta tvrdih zubnih tkiva na određenim dijelovima zuba. Tvrdi zubna tkiva (caklina, dentin i cement) razlikuju se prema svojim temeljnim fiziološkim procesima i sposobnostima reakcije na vanjske podražaje (165), što uvelike utječe na promjene strukture i sastava povezane s dobi (166).

Caklina je tkivo s najvišim mineralnim udjelom u ljudskom tijelu, s težinskim udjelom anorganskih sastojaka od 96 % (167). Caklina pokriva krunu zuba, a razlikuje se od ostalih tvrdih zubnih tkiva po tome što se formativne stanice cakline u potpunosti uništavaju prilikom erupcije zuba u usnu šupljinu (168). Stoga u slučaju cakline ne postoji stanični reparatorni odgovor na vanjske podražaje, tj. sve promjene cakline koje nastupaju sa starenjem su isključivo pod utjecajem okolišnih čimbenika i žvačne funkcije (169). Sloj cakline se starenjem postupno stanjuje uslijed kemo-mehaničke degradacije uzrokovane žvačnim opterećenjem i konzumacijom erozivnih namirnica (170). Dodatno, acidogene bakterije koje se nalaze u biofilmu na površini zuba uzrokuju demineralizaciju, tj. gubitak kalcijevih i fosfatnih iona (171). Procesu demineralizacije suprotstavlja se obrnuti proces remineralizacije pri kojem se struktura tvrdih zubnih tkiva obnavlja ugradnjom kalcijevih i fosfatnih iona porijeklom iz sline (172). Cikličko izmjenjivanje procesa demineralizacije i remineralizacije u fiziološkim uvjetima čini gubitak i ponovnu ugradnju kalcijevih i fosfatnih iona teoretski potpuno reverzibilnim procesom (173). Međutim, male razlike u korist demineralizacije mogu imati kumulativan učinak ukoliko gubitak kalcijevih i fosfatnih iona prevladava tijekom dužeg vremenskog razdoblja (174). Opisani proces predstavlja temelj patofiziologije zubnog karijesa u kojem tvrda zubna tkiva postupno gube mehanička svojstva, a naposljetku dolazi do gubitka integriteta i makroskopskog defekta na površini zuba (175). S obzirom na dinamiku izmjene iona u caklini, između zdrave cakline i karijesom zahvaćene cakline postoji širok raspon intermedijarnih stupnjeva demineralizacije (176). Stoga površinski sloj cakline u kliničkim uvjetima uglavnom karakteriziraju različiti stupnjevi hipomineralizacije koji su heterogeno raspodijeljeni po površini zuba, ovisno o mogućnostima nakupljanja acidogenih bakterija i stupnju samočišćenja pojedinih zubnih ploha (119). Heterogenost strukture i sastava cakline odrazila se na Ramanove spektre snimljene sa zubne krune (122,123). Budući da spomenuta strukturalna heterogenost cakline nije nužno povezana s dobi ispitanika, ona predstavlja nekontroliranu varijancu koja umanjuje preciznost PCR modela za određivanje dobi. Stoga se

niski koeficijenti determinacije dobiveni za PCR model temeljen na spektrima snimljenim na kruni zuba mogu objasniti činjenicom da su sastav i struktura zubne cakline bili pod izrazitim utjecajem individualnih razlika povezanih sa stilom života, prehranom i oralno-higijenskim navikama (177–180).

Cement je tvrdo zubno tkivo koje pokriva korijen zuba (181). Uz približne težinske udjele od 65% anorganskih sastojaka i 25 % organskih sastojaka, cement svojim kemijskim sastavom nalikuje kosti (182). Međutim, cement se svojom strukturom značajno razlikuje od kosti jer je avaskularan i nije podložan kontinuiranom remodeliranju (183). Umjesto remodeliranja, cement inkrementalno odlažu njegove formativne stanice (cementoblasti) tijekom cijelog života (184). U fiziološkim uvjetima se diferencijacija cementoblasta iz progenitorskih stanica i odlaganje cementa odvija razmjerno stabilnim tempom (185). Stoga su promjene Ramanovih spektara cementa bile dosljedne sa starenjem, na što upućuju visoke vrijednosti koeficijenata determinacije dobivenih za PCR model temeljen na spektrima s apeksa. Kao potencijalni izvor nekontrolirane varijance za spektre snimljene s apeksa u obzir treba uzeti parodontne upalne procese (186). Upala parodontnih tkiva (parodontitis), s prevalencijom koja doseže čak 50 % u općoj populaciji, jedna je od najučestalijih bolesti u razvijenim zemljama (187). Parodontitis je bio najčešći razlog za ekstrakciju zubi u ovom istraživanju, s obzirom da je 36 od ukupno 71 zuba (51 %) bilo izvađeno zbog uznapredovanog oblika parodontitisa. Patofiziologija parodontitisa uključuje upalno posredovanu destrukciju potpornih tkiva zuba koju uzrokuje prisutnost specifičnih bakterijskih vrsta (188). Budući da parodontitis često ostaje neprepoznat i neliječen, kronična upala niskog intenziteta može perzistirati godinama i utjecati na strukturu i sastav cementa (189). S druge strane, parodontna terapija koja uključuje mehaničko struganje inficirane površine korijena također oštećuje sloj cementa i mijenja metaboličke procese u cementoblastima (190). Stoga i liječeni i neliječeni parodontitis mogu utjecati na sastav i strukturu cementa (191). Budući da parodontitis započinje na razini zubnog vrata odakle postupno napreduje u apikalnom smjeru, tvrda zubna tkiva na zubnom vratu učestalije su i intenzivnije zahvaćena upalnim promjenama (192). Stoga apikalni cement, uz izuzetak najekstremnijih slučajeva, uglavnom nije zahvaćen upalom (193). Činjenica da je apikalni cement najčešće dobro zaštićen od vanjskih utjecaja i karakteriziran konstantnom brzinom strukturnih promjena (194–196) čini apeks zubnog korijena pogodnom pozicijom za snimanje spektara u svrhu izrade modela određivanja dobi. Dodatni čimbenik koji je potrebno razmotriti zbog mogućeg utjecaja na strukturu apikalnog cementa je parodontna upala endodontskog porijekla, koja započinje i najizraženija je upravo u apikalnom području (197–199). S obzirom

da je 39 % zubi u ovom istraživanju ekstrahirano uslijed neuspjeha endodontske terapije, spomenuta patološka promjena je bila razmjerno učestala u analiziranom uzorku zubi. Međutim, dobiveni rezultati pokazuju da parodontna upala endodontskog porijekla nije znatnije utjecala na prikladnost apikalnog cementa kao optimalnog tkiva za izradu PCR modela određivanja dobi.

Dentin je tvrdo zubno tkivo s približno 65 % anorganskog i 20 % organskog udjela (200). Dentin sačinjava najveći dio zuba i pokriven je slojem cakline na kruni, odnosno slojem cementa na korijenu zuba. Struktura i sastav dentina određeni su metaboličkom aktivnošću njegovih formativnih stanica (odontoblasta) tijekom života (201). Iako posjeduje acelularnu strukturu, dentin je prožet sustavom kanalića koji sadržavaju citoplazmatske produžetke odontoblasta smještenih unutar zubne pulpe (202). Tijekom života, ove stanice kontinuirano izlučuju minerale u stijenke dentinskih kanalića, dovodeći do njihovog sužavanja, smanjene propusnosti i sveukupnog porasta mineralnog udjela (203). U fiziološkim uvjetima, dentin je u potpunosti pokriven drugim mineraliziranim tkivima i na taj način zaštićen od izvanjskih utjecaja. Stoga promjene u sastavu i strukturi dentina dobro koreliraju s dobi donora, što predstavlja temelj dvaju prethodnih istraživanja određivanja dobi pomoću Ramanovih spektara snimljenih na dentinu (128,129). U tim je istraživanjima pristup intaktnom dentinu ostvaren uzdužnom sekcijom zuba. U skladu s nedestruktivnom pripremom uzoraka, u ovom radu nije korištena sekcija zuba, već su spektri snimani isključivo s vanjskih površina zuba. Međutim, manja područja dentina ipak su bila izložena snimanju zbog morfoloških varijabilnosti te stečenih defekata cakline i cementa koji se često javljaju na zubom vratu (204–207). Izloženost dentina na zubnom vratu uobičajeno nastaje uslijed opetovanih oštećenja cakline i cementa uzrokovanih žvačnim opterećenjem, izloženošću kiselinu i agresivnim četkanjem zubi (208,209). Pri snimanju spektara sa zubnog vrata, mala područja eksponiranog dentina bila su obuhvaćena unutar snimane površine promjera od 0,25 mm. Stoga su Ramanovi spektri zubnog vrata sadržavali doprinose svih triju vrsta mineraliziranih zubnih tkiva. Relativni doprinosi pojedinih tkiva razlikovali su se s obzirom na anatomske varijabilnosti i stečena oštećenja cakline i cementa (210–213). Povećana heterogenost sastava tvrdih zubnih tkiva na vratu zuba vjerojatni je uzrok niskoj prediktivnoj vrijednosti PCR modela temeljenog na spektrima prikupljenim sa zubnih vratova. Dodatno, na dijelu eksponiranog dentina na zubnom vratu se u sklopu protektivnog fiziološkog odgovora odvijalo pojačano odlaganje mineralnih sastojaka i smanjenje promjera dentinskih kanalića (214), što je unijelo dodatnu varijabilnost nepovezanu sa starenjem i na taj način umanjilo preciznost modela za određivanje dobi.

S obzirom da se apikalni cement pokazao kao najprikladnije tkivo za određivanje dobi u ovom istraživanju, zanimljivo se osvrnuti na činjenicu da su PCR modeli za određivanje dobi bili precizniji za muške nego za ženske donore. Takav rezultat može biti povezan s potencijalnim učinkom ženskih spolnih hormona na metabolizam cementoblasta, čime bi se hipotetski povećale inter-individualne razlike u strukturi i sastavu cementa (215). Iako učinak ženskih spolnih hormona na funkciju cementoblasta nije temeljito istražen, poznato je da cementoblasti reagiraju na estrogene (216). Stoga fluktuacije u razinama ženskih spolnih hormona tijekom menstrualnog ciklusa mogu biti uključene u regulaciju funkcije cementoblasta na sličan način kao što je slučaj u koštanom metabolizmu (217). Moguće je nagađati kako su individualne varijacije u izlučivanju ženskih spolnih hormona (218) i odgovarajući odgovor cementoblasta doprinijeli nižoj preciznosti modela za određivanje dobi u slučaju ženskih donora.

Promjene strukture i sastava tvrdih zubnih tkiva povezane s dobi koje su omogućile izradu modela za određivanje dobi identificirane su kako u organskom, tako i u anorganskom dijelu Ramanovih spektara (219). Spomenute promjene mogu se objasniti različitim procesima koji se sa starenjem odvijaju u tvrdim zubnim tkivima, uključujući kvalitativne promjene kalcijevog hidroksiapatita (220) i kolagena (221), kao i kvantitativne promjene relativnih udjela anorganskih i organskih sastojaka (222). Detaljnija ispitivanja ovih procesa bila su izvan opsega ovog rada, s obzirom da je istraživanje bilo usmjereno na praktičnu primjenjivost Raman spektroskopije za forenzičko određivanje dobi.

Rezultati PCA modela za određivanje spola ispitanika temeljeni na različitim mjestima snimanja spektara (apeks, kruna i vrat), zasebno za 7 dobnih skupina po 10 godina (10–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59 i 60–69 godina), prikazani su na Slikama 37–39. Slika 37 prikazuje razdvajanje spektara snimljenih na apeksu korijena prema spolu ispitanika. Dobne skupine od 10–19, 20–29 i 30–39 godina pokazuju dobro razdvajanje prema spolovima, u dobnoj skupini od 40–49 godina pojavljuju se djelomična preklapanja, a kod najstarijih dobnih skupina (50–59 i 60–69 godina) uočljiva su značajna preklapanja. Ovakvi rezultati ukazuju na činjenicu da se učinkovitost PCA modela određivanja spola pomoću spektara snimljenih na apeksu korijena smanjuje s porastom dobi ispitanika. Prema dobivenim rezultatima može se pretpostaviti da su spolno specifične razlike u spektrima apeksa korijena najizraženije kod mlađih ispitanika, a postupno se gube sa starenjem. To utječe na preciznost i primjenjivost modela za određivanje spola. Slika 38 prikazuje razdvajanje spektara snimljenih na kruni zuba prema spolu ispitanika. Izrazito dobro razdvajanje na temelju spola opaženo je u dvije najmlađe dobne skupine (10–19 i 20–29 godina) dok se u dobnoj skupini od 30–39 godina pojavljuju preklapanja između

spektara različitih spolova. Preklapanja postaju izraženija s daljnjim porastom dobi, tj. u dobnim skupinama od 40–49, 50–59 i 60–69 godina. Iz ovakvih se podataka mogu izvući zaključci slični onima koji su prethodno opisani za spektre snimljene na apeksu korijena. Spolno specifične razlike bile su najizraženije kod mlađih ispitanika i smanjivale su se s porastom dobi. Rezultat toga je manja preciznost razdvajanja spektara s porastom dobi. U ovom kontekstu zanimljivo je naglasiti da je obrazac smanjivanja spolno specifičnih razlika u spektrima snimljenim s krune zuba, tj. sa cakline, bio sličan obrascu opaženom na apeksu. Spomenuto opažanje ukazuje na činjenicu da smanjenje spolno specifičnih razlika s dobi nastupa neovisno o metaboličkoj aktivnosti tkiva. Naime, cement na apeksu korijena metabolički je aktivan tijekom cijelog života, dok je caklina metabolički potpuno inertna i pod isključivim utjecajem okolišnih čimbenika. Stoga se može zaključiti kako je smanjenje spolno specifičnih razlika kao posljedica starije dobi bilo pod utjecajem fizioloških promjena u tvrdim zubnim tkivima (što se očitovalo na spektrima snimljenim na apeksu korijena), ali i degenerativnih promjena uzrokovanih okolišnim čimbenicima prisutnim u usnoj šupljini (što se očitovalo na spektrima snimljenim na zubnoj kruni). Slika 39 prikazuje razdvajanje spektara snimljenih na zubnom vratu prema spolu ispitanika. Vrlo dobro razdvajanje spolova opaženo je u svim dobnim skupinama (10–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59 i 60–69 godina). Nalaz vrlo dobrog razdvajanja prema spolovima za spektre snimljene na vratu zuba bio je neočekivan s obzirom da su spektri snimljeni na ovoj poziciji pokazali vrlo nisku prediktivnu vrijednost u PCR modelima određivanja dobi. Može se zaključiti da su spolno specifične razlike u spektrima snimljenim na vratu zuba bile dobro očuvane kroz sve dobne skupine, bez obzira na razmjerno slabu povezanost spektara s dobi donora. Ovakav nalaz osobito je zanimljiv s obzirom da su na vratu zuba prisutne različite kombinacije svih triju tvrdih zubnih tkiva (cakline, dentina i cementa) te da su se udjeli spomenutih tkiva vjerojatno razlikovali između pojedinih snimanja. U svakom slučaju, spektri snimljeni na vratu zuba pokazali su najbolje razdvajanje spolova u PCA modelu u kojem su ispitanici bili grupirani u dobne skupine po 10 godina.

Rezultati PCA modela za određivanje spola ispitanika temeljeni na različitim mjestima snimanja spektara (apeks, kruna i vrat), zasebno za različite skupine zubi (sjekutići, očnjaci, pretkutnjaci, kutnjaci), prikazani su na Slikama 40–42. Na Slici 40 koja prikazuje razdvajanje spolova na temelju PCA modela spektara s apeksa korijena vidljivo je vrlo dobro razdvajanje spektara sjekutića i očnjaka, uz nešto slabije razdvajanje u slučaju pretkutnjaka i kutnjaka. PCA model za razdvajanje spolova u kojem su uzeti u obzir spektri svih skupina zubi pokazao je

izražena preklapanja. Ovakvi rezultati pokazuju da je za pouzdano određivanje dobi donora potrebno poznavati vrstu analiziranog zuba, pri čemu je pouzdanost modela razmjerno veća u slučaju sjekutića i očnjaka, odnosno manja u slučaju prekutnjaka i kutnjaka. Na Slici 41 koja prikazuje razdvajanje spolova na temelju PCA modela spektara s krune zuba općenito se opaža slabije razdvajanje prema spolovima u odnosu na razdvajanje postignuto PCA modelima temeljenim na spektrima s apeksa korijena. Za razliku spektara s apeksa korijena, kod spektara s krune zuba preklapanja se pojavljuju i kod sjekutića i očnjaka, a postaju jače izražena kod prekutnjaka i kutnjaka. Stoga su spektri snimljeni na kruni manje prikladni za određivanje spola ispitanika. Osobito neprikladan je bio model temeljen na svim skupinama zubi kod kojeg su postojala znatna preklapanja. Razdvajanje spektara snimljenih na vratu zuba (Slika 42) bilo je slično onom opaženom za spektre snimljene na apeksu korijena. Spektri sa sjekutića i očnjaka bili su dobro razdvojeni prema spolovima, dok je razdvajanje bilo slabije kod prekutnjaka i kutnjaka. U zajedničkom modelu temeljenom na svim skupinama zubi zajedno, opaženo je značajno preklapanje. Nalaz značajnog preklapanja u zajedničkim PCA modelima temeljenim na svim skupinama zubi, neovisno o mjestu snimanja spektara (kruna, vrat i apeks) ukazuje kako je spektre moguće razlikovati temeljem spolno specifičnih razlika samo ukoliko se usporedba izvodi unutar iste skupine zubi. U slučaju nepoznate pripadnosti ispitivanog zuba pojedinoj skupini, mogućnost odvajanja spolova na temelju PCA analize vrlo je niska.

Budući da su u istraživanje uključeni zubi zahvaćeni različitim patološkim procesima, za snimanje Ramanovih spektara su vizualnom inspekcijom odabrane makroskopski intaktne površine. Takav pristup omogućio je da se izbjegne snimanje dijelova zuba koji su bili znatnije zahvaćeni patološkim promjenama ili pokriveni većom količinom mineraliziranih naslaga. Međutim, manje nepravilnosti zubne površine mogle su pri makroskopskoj vizualnoj inspekciji proći neopaženo. Bolju kontrolu kvalitete snimanih dijelova zubnih tkiva zasigurno bi osigurala preciznija inspekcija, primjerice pomoću svjetlosnog mikroskopa. Međutim, odabir dijela zuba za snimanje spektra u ovom je istraživanju namjerno bio ograničen na makroskopsku inspekciju bez optičkih pomagala, kako bi se ispitala primjenjivost maksimalno pojednostavljene i nedestruktivne pripreme uzoraka. Dodatni razlog za izostavljanje strogih kriterija selekcije tvrdih zubnih tkiva na kojima je provedeno snimanje spektara je dizajn istraživanja kojim se nastojalo što vjernije simulirati realistični forenzički scenarij, prvenstveno s obzirom na ograničenja količine materijala dostupnog za analizu.

Glavno ograničenje ovog istraživanja je činjenica da je model određivanja dobi izveden na temelju uzorka zubi isključivo od donora bijele rase, čime se isključuju međurasne razlike

(223). Može se očekivati da će modeli određivanja dobi uspostavljeni na uzorku ograničenom na određenu populaciju biti manje precizni ako se pokušaju generalizirati na širu populaciju (7). Dodatno ograničenje predstavljenog modela određivanja dobi opaženo je znatno smanjenje prediktivne vrijednosti u slučaju nepoznatog spola ispitanika. Stoga je za optimalnu preciznost modela određivanja dobi opisanih u ovom radu nužno rasu i spol ispitanika odrediti primjenom drugih forenzičkih metoda (69).

Ovo istraživanje pokazalo je da se cijeli spektri snimljeni s površine zuba primjenom makro-Raman mjerenja mogu upotrijebiti za određivanje dobi. Kvaliteta informacija povezanih s dobi razlikovala se ovisno o pozicijama snimanja spektara, pri čemu je model temeljen na apikalnom cementu pokazao najveću prediktivnu vrijednosti. Iako su dobiveni koeficijenti determinacije bili razmjerno skromni čak i u slučaju apikalnog cementa, izuzimanjem 10 % netipičnih ekstremnih vrijednosti iz podatkovnog seta bilo je moguće poboljšati koeficijente determinacije za vrijednosti veće od 0,05. Ovakvo opažanje ukazuje na činjenicu da preciznije određivanje uvjeta snimanja spektara zajedno s preciznim kriterijima za uklanjanje ekstremnih vrijednosti može poboljšati preciznost modela. Takvo prilagođavanje modela bit će učinjeno u nastavku istraživanja.

Budući da na Ramanove spektre hidroksiapatita može utjecati polarizacija svjetlosti (224,225), potrebno je napomenuti da su u ovom istraživanju upadna i raspršena svjetlost bile nepolarizirane. Stoga su potencijalni učinci polarizacije bili jednaki kod svih spektara, unoseći u svim slučajevima istu vrstu pogreške. Budući da se algoritmi primijenjeni u ovom istraživanju temelje na detekciji relativnih razlika između spektara, pogrešku koja se dosljedno pojavljuje u svim spektrima moguće je zanemariti. U usporedbi s prethodno objavljenim radovima temeljenim na ekstrakciji konkretnih parametara pojedinačnih Ramanovih vrpca (128,129), upotreba cijelih spektara znatno pojednostavljuje postupak, kako pri izradi PCR modela, tako i pri potencijalnoj forenzičkoj primjeni. Dodatno, makro-Raman mjerenja provedena u ovom istraživanju simuliraju snimanje spektara na terenu uporabom prijenosnih spektrometara, čime se metoda približava forenzičkoj stvarnosti. Modeli za određivanje dobi temeljeni na spektrima zubi zahvaćenih različitim patološkim procesima imaju veći praktični značaj nego modeli temeljeni isključivo na zdravim zubima koji su opisani u prethodnim istraživanjima (128,129). Dodatna prednost je mogućnost snimanja spektara s površine zubi bez potrebe za prethodnom obradom, s obzirom da analizirani supstrat ostaje sačuvan za buduće forenzičke analize. Naime, u forenzičkim se znanostima općenito preferira ne-destruktivno rukovanje uzorcima (226).

Kako bi se simulirao forenzički scenarij u kojem je potrebno analizirati zube nakon različitih postekstrakcijskih razdoblja, Ramanovi spektri snimljeni su 0,1–5,5 godina nakon ekstrakcije. Tijekom razdoblja između ekstrakcije i snimanja spektara, zubi su bili pohranjeni u suhim uvjetima pri sobnoj temperaturi. U takvim uvjetima, tvrda zubna tkiva ostala su dobro sačuvana, dok se opsežnija degradacija može očekivati pri višim temperaturama i pri izloženosti kiselim medijima (227,228). U ovoj fazi istraživanja nije moguće procijeniti primjenjivost predstavljenog modela određivanja dobi na zube koji su bili izloženi starenju u ekstremnim uvjetima. Međutim, poznato je da su tvrda zubna tkiva razmjerno otporna na različite okolišne učinke umjerenog intenziteta (229), što ukazuje na potencijalnu primjenjivost predstavljenog modela za primjenu u suvremenoj forenzičkoj dentalnoj medicini.

Prilikom izrade i interpretacije PCR modela za određivanje starosne dobi ustanovljena je značajna uloga spola ispitanika. Modeli u kojima su spolovi analizirani zasebno pokazali su značajno veću prediktivnu vrijednost od modela koji su se temeljili na oba spola zajedno. S obzirom na opažene razlike među spolovima, istražena je mogućnost iskorištavanja spektralnih informacija u svrhu forenzičkog određivanja spola (230,231). Metodom PCA izračunate su vrijednosti prvih dviju glavnih komponenta koje su poslužile za razdvajanje spektara s obzirom na spol ispitanika. Analiza je provedena zasebno za pojedine pozicije snimanja spektara (kruna, vrati i korijen), dobne skupine ispitanika te vrste zuba (sjekutići, očnjaci, pretkutnjaci i kutnjaci). Opažena je mogućnost razdvajanja spektara prema spolu, što otvara dodatne mogućnosti primjene Ramanove spektroskopije u forenzičkim istraživanjima. Međutim, razdvajanje spektara na temelju spola ispitanika nije se pokazalo jednako uspješnim za sve dobne skupine i vrste zubi; općenito je bolje razdvajanje opaženo za mlađe ispitanike u usporedbi sa starijima, te za prednje zube (sjekutići i očnjaci) u usporedbi sa stražnjima (pretkutnjaci i kutnjaci). Modeli koji su obuhvaćali sve skupine zubi pokazali su najslabije rezultate za razdvajanje spektara na temelju spola ispitanika. Unatoč ovom ograničenju koje onemogućava izradu jedinstvenog univerzalnog modela primjenjivog za sve vrste zubi i dobne skupine, dobiveni rezultati ukazuju kako je iz Ramanovih spektara uz određivanje dobi moguće i određivanje spola ispitanika. Razvoj PCA modela za određivanje spola na temelju Ramanovih spektara planira se u budućem istraživanju.

Moguća kontaminacija uzoraka predstavlja jedan od čimbenika koje treba uzeti u obzir kod razvoja forenzičkih metoda (232–234). Naime, uzorci tkiva koji se koriste za forenzičke analize često su u određenoj mjeri kontaminirani stranim tvarima. Primjerice, uzorci prikupljeni iz ekshumiranih tijela žrtava bit će značajnije kontaminirani u usporedbi s uzorcima prikupljeni

iz nedavno stradalih žrtava. U slučajevima kada su tkiva za analizu dobro otporna na mehaničko čišćenje, poput tvrdih zubnih tkiva u ovom istraživanju (235), dekontaminacija ne predstavlja velike poteškoće. S druge strane, dekontaminacija kemijskim sredstvima je manje poželjna jer može dovesti do promjena u uzorku koje će se odraziti na Ramanove spektre. U ovom istraživanju uzorci tvrdih zubnih tkiva nisu bili značajnije kontaminirani jer su svi zubi prikupljeni od živih ispitanika i ekstrahirani od prema pravilima struke. Međutim, određena količina kontaminacije bila je prisutna u obliku ostataka tvrdih zubnih naslaga, osobito na kruni i vratu zuba. Na apeksu zubnog korijena su kontaminacije bile manje zastupljene s obzirom da su se pojavljivale samo u slučajevima izrazito uznapredovalog oblika parodontne bolesti (236). Međutim, vizualna inspekcija uzoraka pokazala je da je kontaminacija tvrdim zubnim naslagama bila prisutna i na poziciji apeksa, iako u značajno manjoj mjeri nego na kruni i vratu zuba. Razlike u preciznosti modela temeljenih na različitim pozicijama snimanja spektara (apeks je pokazao značajno bolju preciznost od krune i vrata zuba) mogu se barem djelomično pripisati razlikama u stupnju kontaminacije, tj. relativno manjem stupnju kontaminacije analiziranog tkiva na poziciji apeksa u usporedbi s krunom i vratom zuba. Budući da je prisutnost kontaminacija u ovom istraživanju bila razmjerno ograničena, nije moguće predvidjeti učinke većih stupnjeva kontaminacija na prediktivnu vrijednost dobivenih modela određivanja dobi. Načelno se mogu očekivati određena odstupanja u preciznosti, ovisno o vrsti i količini kontaminacije te metodi i učinkovitosti metode korištene za dekontaminaciju. U budućim istraživanjima bilo bi poželjno istražiti utjecaj najčešćih kontaminacija i pristupa za dekontaminaciju na preciznost modela određivanja dobi. Svakako bi bilo poželjno izraditi robusnije modele koji bi bili sposobni razlučiti osnovne spektralne karakteristike tvrdih zubnih tkiva od sporadičnih pojavljivanja spektralnih karakteristika porijeklom iz kontaminacija. Takvi robusni modeli mogli bi izolirati varijabilne dijelove spektra porijeklom iz kontaminacija i procjenu dobi temeljiti isključivo na korisnom dijelu spektra koji odražava stvarni sastav tvrdih zubnih tkiva.

Značajne prednosti metode određivanja starosne dobi predstavljene u ovom radu su nedestruktivnost i jednostavnost primjene. Nedestruktivne analize općenito su poželjnije u forenzici iz jednostavnog razloga što se čuvanjem uzorka u nepromijenjenom obliku mogu provoditi ponavljana mjerenja (istom ili drugim metodama), a uzorak se može pohraniti za eventualne buduće analize (237–241). Budući da se cijeli proces snimanja uzorka, analize spektra i izračuna dobi iz dobivenog spektra i prethodno pripremljenih regresijskih formula može automatizirati, praktična primjena metode se može maksimalno pojednostaviti i učiniti

dostupnom operaterima bez dodatne specijalizirane edukacije.

Jedan od nedostataka metode određivanja dobi predstavljene u ovom radu je dugo vrijeme snimanja potrebno za prikupljanje spektara. Konkretno, za snimanje jednog spektra bilo je potrebno 20 minuta (100 skenova x 12 sekundi po skenu (242)). Budući da je sa svake pozicije snimanja prikupljeno 10 spektara, sveukupno snimanje u uvjetima primijenjenim u ovom istraživanju trajalo je preko tri sata. Vrijeme potrebno za snimanje spektra dostatne kvalitete ovisi o karakteristikama instrumenta i uvjetima snimanja. Optimizacijom uvjeta snimanja spektara bilo bi moguće skratiti potrebno vrijeme za dobivanje spektra odgovarajuće kvalitete. Nadalje, ukoliko se konstruira uređaj za praktičnu forenzičku primjenu koji bi operateru omogućavao fleksibilno određivanje vremena snimanja, kratka vremena mogla bi se koristiti za brze i okvirne procjene dobi, dok bi se dugotrajnijim snimanjima mogli dobiti precizniji i pouzdaniji rezultati.

Sastav tvrdih zubnih tkiva razlikuje se među ispitanicima, vrstama zuba i poziciji odabranoj za snimanja Ramanovog spektra. Kako bi se umanjio utjecaj varijabilnosti koje potječu iz heterogenosti sastava na pojedinim pozicijama snimanja, mjerenje je na svakoj od pozicija ponovljeno 10 puta uz pomicanje ekscitacijskog snopa, kako bi se uzorkovanjem veće površine dobio prosječni spektar reprezentativan za konkretnu poziciju snimanja. U ovom radu, takav postupak zahtijevao je intervenciju operatera koji je svako od 10 ponavljanja trebao pomaknuti uzorak i pokrenuti novo snimanje. U automatiziranom sustavu, potreba za fizičkim radom operatera bi se mogla racionalizirati tako da se unaprijed definira „skenirajuće“ pomicanje uzorka u odnosu na ekscitacijski snop tijekom snimanja. Nakon snimanja spektra sa zadanog područja, bilo bi omogućeno automatsko pomicanje uzorka i pokretanje snimanja idućeg spektra na drugom mjestu. Moguća alternativa opisanom postupku je kontinuirano pomicanje uzorka tijekom snimanja, što bi omogućilo prikupljanje prosječnog spektra neovisnog o lokalnim razlikama u sastavu tvrdih zubnih tkiva (243). Kontinuirano pomicanje uzorka također je poželjno za smanjenje zagrijavanja ekscitiranog područja, a time i manjeg rizika od termičke degradacije uzorka na zagrijanom mjestu (244,245). Kontinuirano pomicanje uzorka eventualno bi omogućile i primjenu većih snage lasera, što bi omogućilo skraćivanje vremena potrebnog za prikupljanje spektara.

Jedno od ograničenja ovog istraživanja predstavlja razmjerno mali uzorak zubi. Povećanje broja ispitanih zubi u budućem istraživanju omogućilo bi uspješniju eliminaciju varijabilnosti između ispitanika koja nije povezana s dobi i preciznije definiranje regresijske formule za predikciju dobi. Sljedeći nedostatak je uporaba zubi koji su zahvaćeni patološkim procesima,

što je učinjeno namjerno kako bi se ispitala mogućnost primjene uzoraka sub-optimalne kvalitete za forenzičko određivanje dobi. Iako ne predstavlja realistični scenarij, primjena intaktnih zubi bi mogla omogućiti izradu preciznijeg modela određivanja dobi. U tom slučaju bi trebalo ispitati primjenjivost modela temeljenog na intaktnim zubima u realističnim uvjetima u kojima uzorci tkiva za analizu gotovo nikad nisu intaktni.

6. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje pokazalo je da se temeljem Ramanovih spektara snimljenih s površine zubi zahvaćenih uobičajenim patološkim promjenama može izraditi model za određivanje dobi. Optimalna prediktivna sposobnost modela ostvarena je primjenom spektara snimljenih s apeksa korijena, dok su spektri snimljeni s vrata i krune zuba bili manje prikladni za određivanje dobi. Za optimalno određivanje dobi pomoću modela temeljenog na spektrima s apeksa bilo je potrebno zasebno analizirati muške i ženske donore zubi. Spajanjem oba spola u zajednički model znatno se smanjila prediktivna sposobnost modela.

Ostvareni su sljedeći specifični ciljevi rada:

1. Potvrđeno je kako se promjene u Ramanovim spektrima uzrokovane razlikama u dobi ispitanika mogu iskoristiti za izradu PCA modela za određivanje starosne dobi;
2. Ispitana je mogućnost metode PCA za razdvajanje spektara na temelju dobi donora i utvrđeno je da dobno specifične razlike omogućavaju razdvajanje spektara prema dobnim skupinama;
3. Izrađeni su PCR modeli za određivanje dobi ispitanika temeljeni na Ramanovim spektrima različitih zubnih tkiva;
4. Ispitan je utjecaj različitih tipova tvrdih zubnih tkiva na točnost PCR modela za određivanje dobi;
5. Ispitan je utjecaj spola donora na točnost PCR modela za određivanje dobi;
6. Ispitana je mogućnost primjene metode PCA za određivanje spola ispitanika temeljem Ramanovih spektara različitih tvrdih zubnih tkiva.

Potvrđene su sljedeće hipoteze:

1. Utvrđena je korelacija Ramanovih spektara tvrdih zubnih tkiva sa starosnom dobi donora;
2. Različite pozicije snimanja spektara (kruna, vrat i apeks), odnosno različite vrste tvrdih zubnih tkiva prisutne na spomenutim pozicijama utjecale su na preciznost modela za određivanje dobi;
3. Na temelju Ramanovih spektara bilo je moguće izraditi modele za određivanje spola donora.

7. LITERATURA

1. O'Shaughnessy PE. Introduction to forensic science. *Dent Clin North Am.* 2001;45(2):217–27, vii.
2. Stein TJ, Corcoran JF. Pararadicular cementum deposition as a criterion for age estimation in human beings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;77(3):266–70.
3. Rötzscher K. *Forensic and legal dentistry.* New York: Springer; 2013.
4. Stein TJ, Corcoran JF. Anatomy of the root apex and its histologic changes with age. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69(2):238–42.
5. Levine ME. Modeling the Rate of Senescence: Can Estimated Biological Age Predict Mortality More Accurately Than Chronological Age? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013;68(6):667–74.
6. Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A new system of dental age assessment. *Hum Biol.* 1973;45(2):211–27.
7. Senn DR, Stimson PG, editors. *Forensic dentistry.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2010. 437 p.
8. Senn DR, Weems RA, editors. *Manual of forensic odontology.* 5th ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis; 2013. 445 p.
9. Galić I, Lauc T, Brkić H, Vodanović M, Galić E, Biazevic MGH, et al. Cameriere's third molar maturity index in assessing age of majority. *Forensic Sci Int.* 2015;252:191.e1-191.e5.
10. Willems G. A review of the most commonly used dental age estimation techniques. *J Forensic Odontostomatol.* 2001;19(1):9–17.
11. Pittayapat P, Jacobs R, De Valck E, Vandermeulen D, Willems G. Forensic odontology in the disaster victim identification process. *J Forensic Odontostomatol.* 2012;30(1):1–12.
12. Solheim T, Vonen A. Dental age estimation, quality assurance and age estimation of asylum seekers in Norway. *Forensic Sci Int.* 2006;159:S56–60.

13. Forrest D, Knight B, Hinshelwood G, Anand J, Tonge V. A guide to writing medical reports on survivors of torture. *Forensic Sci Int.* 1995;76(1):69–75.
14. Schmitt A, Murail P, Cunha E, Rougé D. Variability of the Pattern of Aging on the Human Skeleton: Evidence from Bone Indicators and Implications on Age at Death Estimation. *J Forensic Sci.* 2002;47(6):1555-1J.
15. Cohn S, Vaswani A, Zanzi I, Ellis K. Effect of aging on bone mass in adult women. *Am J Physiol-Leg Content.* 1976;230(1):143–8.
16. Dobberstein RC, Huppertz J, von Wurmb-Schwark N, Ritz-Timme S. Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: Implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Sci Int.* 2008;179(2–3):181–91.
17. Gatliff BP. Facial sculpture on the skull for identification. *Am J Forensic Med Pathol.* 1984;5(4):327–32.
18. Nolla C. The development of permanent teeth. *J Dent Child.* 1960;27:254–72.
19. Veera S, Kannabiran J, Suratkal N, Chidananada D, Gujjar K, Goli S. Coronal pulp biomarker: A lesser known age estimation modality. *J Indian Acad Oral Med Radiol.* 2014;26(4):398.
20. Brkić H, Keros J, Kaić Z, Cadez J. Hereditary and environmental dental findings in identification of human remains. *Coll Antropol.* 2000;24 Suppl 1:79–83.
21. Willems G, Van Olmen A, Spiessens B, Carels C. Dental age estimation in Belgian children: Demirjian's technique revisited. *J Forensic Sci.* 2001;46(4):893–5.
22. Keiser-Nielsen S. Person identification by mean of teeth. Bristol: John Wright; 1980.
23. Kvaal S, Solheim T. Fluorescence from dentin and cementum in human mandibular second premolars and its relation to age. *Eur J Oral Sci.* 1989;97(2):131–8.
24. Miles AEW. Dentition in the Estimation of Age. *J Dent Res.* 1963;42(1):255–63.
25. Saunders E. THE TEETH A TEST OF AGE. *The Lancet.* 1838;30(774):492–6.

26. Wedl C. Pathology of the teeth: with special reference to their anatomy and physiology (classic reprint). Philadelphia: Lindsay & Blakiston; 1872.
27. Cameriere R, Ferrante L, Liversidge HM, Prieto JL, Brkic H. Accuracy of age estimation in children using radiograph of developing teeth. *Forensic Sci Int.* 2008;176(2–3):173–7.
28. Čuković Bagić I, Sever N, Brkić H, Kern J. Dental Age Estimation in Children Using Orthopantomograms. *Acta Stomatol Croat.* 2008;42(1):11–8.
29. Gustafson G, Malmö DO. Age Determinations on Teeth. *J Am Dent Assoc.* 1950;41(1):45–54.
30. Prince DA, Ubelaker DH. Application of Lamendin's adult dental aging technique to a diverse skeletal sample. *J Forensic Sci.* 2002;47(1):107–16.
31. Foti B, Lalys L, Adalian P, Giustiniani J, Maczel M, Signoli M, et al. New forensic approach to age determination in children based on tooth eruption. *Forensic Sci Int.* 2003;132(1):49–56.
32. Manjunatha BS, Soni NishitK. Estimation of age from development and eruption of teeth. *J Forensic Dent Sci.* 2014;6(2):73.
33. Kumar ChL, Sridhar MS. Estimation of the age of an individual based on times of eruption of permanent teeth. *Forensic Sci Int.* 1990;48(1):1–7.
34. Garn SM, Lewis AB, Polacheck DL. Variability of Tooth Formation. *J Dent Res.* 1959;38(1):135–48.
35. Uysal T, Yagci A, Ramoglu SI. Dental maturation in patients with unilateral posterior crossbite. *World J Orthod.* 2009;10(4):383–8.
36. Sousa EMD, Stott GG, Alves JB. Determination of Age from Cemental Incremental Lines for Forensic Dentistry. *Biotech Histochem.* 1999;74(4):185–93.
37. Adserias-Garriga J, Thomas C, Ubelaker DH, C. Zapico S. When forensic odontology met biochemistry: Multidisciplinary approach in forensic human identification. *Arch Oral Biol.* 2018;87:7–14.

38. Panchbhai A. Dental radiographic indicators, a key to age estimation. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2011;40(4):199–212.
39. Santoro V, De Donno A, Marrone M, Campobasso CP, Introna F. Forensic age estimation of living individuals: A retrospective analysis. *Forensic Sci Int.* 2009;193(1–3):129.e1-129.e4.
40. Eckert WG, Garland N. The history of the forensic application in radiology: *Am J Forensic Med Pathol.* 1984;5(1):53–6.
41. Wood RE. Forensic aspects of maxillofacial radiology. *Forensic Sci Int.* 2006 May;159:S47–55.
42. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2002;93(4):474–82.
43. Clark DH, editor. *Practical forensic odontology.* Oxford ; Boston: Wright; 1992. 258 p.
44. Dedouit F, Saint-Martin P, Mokrane F-Z, Savall F, Rousseau H, Crubézy E, et al. Virtual anthropology: useful radiological tools for age assessment in clinical forensic medicine and thanatology. *Radiol Med (Torino).* 2015;120(9):874–86.
45. Ghafari R, Ghodousi A, Poordavar E. Comparison of the accuracy of the London atlas and Smith method in dental age estimation in 5–15.99-year-old Iranians using the panoramic view. *Int J Legal Med.* 2019;133(1):189–95.
46. Sweet D. Why a dentist for identification? *Dent Clin North Am.* 2001;45(2):237–51.
47. Christensen LR, Kjaer I, Graem N. Comparison of human dental and craniofacial maturation on prenatal profile radiographs. *Eur J Orthod.* 1993;15(2):149–54.
48. Rai B, Kaur J. *Evidence-based forensic dentistry.* 1st ed. New York: Springer; 2012.
49. Kraus BS. Calcification of the human deciduous teeth. *J Am Dent Assoc.* 1959 Dec;59(6):1128–36.

50. Massler M. DEVELOPMENTAL PATTERN OF THE CHILD AS REFLECTED IN THE CALCIFICATION PATTERN OF THE TEETH. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1941 Jul 1;62(1):33.
51. Busuttill A, Keeling J. *Paediatric forensic medicine and pathology.* London: Hodder Arnold; 2009. 504 p.
52. Moorrees CFA, Fanning EA, Hunt EE. Age Variation of Formation Stages for Ten Permanent Teeth. *J Dent Res.* 1963;42(6):1490–502.
53. AlQahtani SJ, Hector MP, Liversidge HM. Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. *Am J Phys Anthropol.* 2010;142(3):481–90.
54. Galić I, Vodanović M, Cameriere R, Nakaš E, Galić E, Selimović E, et al. Accuracy of Cameriere, Haavikko, and Willems radiographic methods on age estimation on Bosnian–Herzegovian children age groups 6–13. *Int J Legal Med.* 2011;125(2):315–21.
55. Haavikko K. The formation and the alveolar and clinical eruption of the permanent teeth. An orthopantomographic study. *Suom Hammaslaak Toim.* 1970;66(3):103–70.
56. Nur B, Kusgoz A, Bayram M, Celikoglu M, Nur M, Kayipmaz S, et al. Validity of Demirjian and nolla methods for dental age estimation for Northeastern Turkish children aged 5-16 years old. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal.* 2012;e871–7.
57. Demirjian A, Goldstein H. New systems for dental maturity based on seven and four teeth. *Ann Hum Biol.* 1976;3(5):411–21.
58. Nik-Hussein NN, Kee KM, Gan P. Validity of Demirjian and Willems methods for dental age estimation for Malaysian children aged 5–15 years old. *Forensic Sci Int.* 2011;204(1–3):208.e1-208.e6.
59. Bagherian A, Sadeghi M. Assessment of dental maturity of children aged 3.5 to 13.5 years using the Demirjian method in an Iranian population. *J Oral Sci.* 2011;53(1):37–42.

60. Cruz-Landeira A, Linares-Argote J, Martínez-Rodríguez M, Rodríguez-Calvo MS, Otero XL, Concheiro L. Dental age estimation in Spanish and Venezuelan children. Comparison of Demirjian and Chaillet's scores. *Int J Legal Med.* 2010;124(2):105–12.
61. Ambarkova V, Galić I, Vodanović M, Biočina-Lukenda D, Brkić H. Dental age estimation using Demirjian and Willems methods: Cross sectional study on children from the Former Yugoslav Republic of Macedonia. *Forensic Sci Int.* 2014;234:187.e1-187.e7.
62. Chaillet N, Nyström M, Demirjian A. Comparison of dental maturity in children of different ethnic origins: international maturity curves for clinicians. *J Forensic Sci.* 2005;50(5):1164–74.
63. El-Bakary AA, Hammad SM, Mohammed F. Dental age estimation in Egyptian children, comparison between two methods. *J Forensic Leg Med.* 2010;17(7):363–7.
64. Cameriere R, Ferrante L, Cingolani M. Age estimation in children by measurement of open apices in teeth. *Int J Legal Med.* 2006;120(1):49–52.
65. Cameriere R, De Angelis D, Ferrante L, Scarpino F, Cingolani M. Age estimation in children by measurement of open apices in teeth: a European formula. *Int J Legal Med.* 2007 Oct 10;121(6):449–53.
66. Prapanpoch S, Dove SB, Cottone JA. Morphometric Analysis of the Dental Pulp Chamber as a Method of Age Determination in Humans: *Am J Forensic Med Pathol.* 1992;13(1):50–5.
67. Caldas IM, Júlio P, Simões RJ, Matos E, Afonso A, Magalhães T. Chronological age estimation based on third molar development in a Portuguese population. *Int J Legal Med.* 2011;125(2):235–43.
68. Kvaal SI, Kolltveit KM, Thomsen IO, Solheim T. Age estimation of adults from dental radiographs. *Forensic Sci Int.* 1995;74(3):175–85.
69. Stimson PG, Mertz CA, editors. *Forensic dentistry.* 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1997. 301 p.

70. Harris MJ, Nortjé CJ. The mesial root of the third mandibular molar. A possible indicator of age. *J Forensic Odontostomatol.* 1984;2(2):39–43.
71. Thevissen PW, Galiti D, Willems G. Human dental age estimation combining third molar(s) development and tooth morphological age predictors. *Int J Legal Med.* 2012;126(6):883–7.
72. Dalitz GD. Age Determination of Adult Human Remains by Teeth Examination. *J Forensic Sci Soc.* 1962;3(1):11–21.
73. Bang G, Ramm E. Determination of Age in Humans from Root Dentin Transparency. *Acta Odontol Scand.* 1970;28(1):3–35.
74. Johanson G. Age determination in human teeth. *Odontol Revy.* 1971;22(21):40–126.
75. Maples WR. An improved technique using dental histology for estimation of adult age. *J Forensic Sci.* 1978;23(4):764–70.
76. Kvaal S, Solheim T. A non-destructive dental method for age estimation. *J Forensic Odontostomatol.* 1994;12(1):6–11.
77. Balin AK, Allen RG. Molecular bases of biologic aging. *Clin Geriatr Med.* 1989;5(1):1–21.
78. Mörnstad H, Pfeiffer H, Teivens A. Estimation of Dental Age Using HPLC-Technique to Determine the Degree of Aspartic Acid Racemization. *J Forensic Sci.* 1994;39(6):13729J.
79. Alkass K, Buchholz BA, Ohtani S, Yamamoto T, Druid H, Spalding KL. Age Estimation in Forensic Sciences: APPLICATION OF COMBINED ASPARTIC ACID RACEMIZATION AND RADIOCARBON ANALYSIS. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9(5):1022–30.
80. Ohtani S, Yamamoto T. Age Estimation by Amino Acid Racemization in Human Teeth: CASES OF AGE ESTIMATION FROM HUMAN TEETH. *J Forensic Sci.* 2010;55(6):1630–3.

81. Yekkala R, Meers C, Van Schepdael A, Hoogmartens J, Lambrichts I, Willems G. Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age. *Forensic Sci Int.* 2006;159:S89–94.
82. Ritz S, Stock R, Schütz HW, Kaatsch H-J. Age estimation in biopsy specimens of dentin. *Int J Legal Med.* 1995;108(3):135–9.
83. Meglen RR. Examining large databases: a chemometric approach using principal component analysis. *Mar Chem.* 1992;39(1–3):217–37.
84. Krafft C, Knetschke T, Siegner A, Funk RHW, Salzer R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vib Spectrosc.* 2003;32(1):75–83.
85. Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis: Principal component analysis. *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat.* 2010 Jul;2(4):433–59.
86. Shinzawa H, Awa K, Kanematsu W, Ozaki Y. Multivariate data analysis for Raman spectroscopic imaging. *J Raman Spectrosc.* 2009;40(12):1720–5.
87. Navas N, Romero-Pastor J, Manzano E, Cardell C. Raman spectroscopic discrimination of pigments and tempera paint model samples by principal component analysis on first-derivative spectra. *J Raman Spectrosc.* 2010;41(11):1486–93.
88. Gautam R, Vanga S, Ariese F, Umapathy S. Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy. *EPJ Tech Instrum* [Internet]. 2015 [cited 2020 Mar 19];2(1). Available from: <http://www.epjtechniquesandinstrumentation.com/content/2/1/8>
89. Mishra S, Vanli OA. Remaining Useful Life Estimation with Lamb-Wave Sensors Based on Wiener Process and Principal Components Regression. *J Nondestruct Eval* [Internet]. 2016 [cited 2020 Mar 17];35(1). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10921-015-0328-2>
90. Geladi P, Esbensen K. Regression on multivariate images: Principal component regression for modeling, prediction and visual diagnostic tools. *J Chemom.* 1991;5(2):97–111.
91. Kudelski A. Analytical applications of Raman spectroscopy. *Talanta.* 2008;76(1):1–8.

92. Das RS, Agrawal YK. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vib Spectrosc*. 2011;57(2):163–76.
93. Day JS, Edwards HGM, Dobrowski SA, Voice AM. The detection of drugs of abuse in fingerprints using Raman spectroscopy I: latent fingerprints. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2004;60(3):563–8.
94. Keresztury G. Raman Spectroscopy: Theory. In: Chalmers JM, Griffiths PR, editors. *Handbook of Vibrational Spectroscopy* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006 [cited 2020 Mar 19]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0470027320.s0109>
95. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev*. 2007;42(5):493–541.
96. Naumann D. FT-INFRARED AND FT-RAMAN SPECTROSCOPY IN BIOMEDICAL RESEARCH. *Appl Spectrosc Rev*. 2001;36(2–3):239–98.
97. Kong K, Kendall C, Stone N, Notingher I. Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;89:121–34.
98. Diem M. *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-Spectroscopy: Theory, Instrumentation and Biomedical Applications* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [cited 2020 Mar 19]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118824924>
99. Ljahnicky I. *Vibracijska spektroskopija u mikrobiologiji*. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2013.
100. Nafie LA. INFRARED AND RAMAN VIBRATIONAL OPTICAL ACTIVITY: Theoretical and Experimental Aspects. *Annu Rev Phys Chem*. 1997;48(1):357–86.
101. Ćirić-Marjanović G, Trchová M, Stejskal J. The chemical oxidative polymerization of aniline in water: Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc*. 2008;39(10):1375–87.
102. Talari ACS, Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I ur. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev*. 2015;50(1):46–111.

103. Choo-Smith L-P, Edwards HGM, Endtz HP, Kros JM, Heule F, Barr H, et al. Medical applications of Raman spectroscopy: From proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers*. 2002;67(1):1–9.
104. Morris MD, Matousek P, editors. *Emerging Raman applications and techniques in biomedical and pharmaceutical fields*. Heidelberg ; New York: Springer; 2010. 477 p. (Biological and medical physics, biomedical engineering).
105. Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman Spectral Study of the PO 4 and CO 3 Vibrational Modes in Synthetic and Biological Apatites. *Calcif Tissue Int*. 1998;63(6):475–81.
106. Krafft C, Sergo V. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy*. 2006;20(5–6):195–218.
107. Torres CP, Miranda Gomes-Silva J, Menezes-Oliveira MAH, Silva Soares LE, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. FT-Raman spectroscopy, μ -EDXRF spectrometry, and microhardness analysis of the dentin of primary and permanent teeth. *Microsc Res Tech*. 2018;81(5):509–14.
108. Tramini P, Pélissier B, Valcarcel J, Bonnet B, Maury L. A Raman Spectroscopic Investigation of Dentin and Enamel Structures Modified by Lactic Acid. *Caries Res*. 2000;34(3):233–40.
109. Leroy G, Penel G, Leroy N, Brès E. Human Tooth Enamel: A Raman Polarized Approach. *Appl Spectrosc*. 2002;56(8):1030–4.
110. Jiang T, Ma X, Wang Y, Tong H, Shen X, Hu Y, et al. Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. *J Biomed Opt*. 2008;13(1):014019.
111. Fattibene P, Carosi A, Coste VD, Sacchetti A, Nucara A, Postorino P, et al. A comparative EPR, infrared and Raman study of natural and deproteinated tooth enamel and dentin. *Phys Med Biol*. 2005;50(6):1095–108.

112. Zheng S, Tu AT, Renugopalakrishnan V, Strawich E, Glimcher MJ. A mixed beta-turn and beta-sheet structure for bovine tooth enamel amelogenin: Raman spectroscopic evidence. *Biopolymers*. 1987;26(10):1809–13.
113. Santini A, Pulham CR, Rajab A, Ibbetson R. The effect of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on the phosphate concentration of tooth enamel assessed by Raman spectroscopy. *Dent Traumatol*. 2008;24(2):220–3.
114. Par M, Gamulin O, Marovic D, Klaric E, Tarle Z. Raman spectroscopic assessment of degree of conversion of bulk-fill resin composites – changes at 24 hours post cure. *Oper Dent*. 2015;40(3):E92–101.
115. Miletic V, Pongprueksa P, De Munck J, Brooks NR, Van Meerbeek B. Curing characteristics of flowable and sculptable bulk-fill composites. *Clin Oral Investig*. 2017;21(4):1201–12.
116. Miyazaki M, Onose H, Moore BK. Analysis of the dentin–resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater*. 2002;18(8):576–80.
117. Durand J-C, Jacquot B, Salehi H, Fages M, Margerit J, Cuisinier FJG. Confocal Raman microscopic analysis of the zirconia/feldspathic ceramic interface. *Dent Mater*. 2012;28(6):661–71.
118. Jestel NL, Morris MD, O'Brien WJ. Depth-resolved Raman microprobe examination of a commercial dental porcelain exposed to a simulated oral environment. *Dent Mater*. 1998;14(5):375–82.
119. Akkus A, Akkus A, Roperto R, Akkus O, Porto T, Teich S, et al. Evaluation of mineral content in healthy permanent human enamel by Raman spectroscopy. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(5):e549-9.
120. Fraser SJ, Natarajan AK, Clark ASS, Drummond BK, Gordon KC. A Raman spectroscopic study of teeth affected with molar-incisor hypomineralisation. *J Raman Spectrosc*. 2015;46(2):202–10.

121. Bērziņš K, Sutton JJ, Loch C, Beckett D, Wheeler BJ, Drummond BK, et al. Application of low-wavenumber Raman spectroscopy to the analysis of human teeth. *J Raman Spectrosc.* 2019;In press.
122. Buchwald T, Okulus Z, Szybowicz M. Raman spectroscopy as a tool of early dental caries detection-new insights. *J Raman Spectrosc.* 2017;48(8):1094–102.
123. Ko AC-T, Choo-Smith L-P, Hewko M, Leonardi L, Sowa MG, Dong CCS, et al. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2005;10(3):031118.
124. Hill W, Petrou V. Detection of Caries and Composite Resin Restorations by Near-Infrared Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 1997;51(9):1265–8.
125. Wentrup-Byrne E, Armstrong CA, Armstrong RS, Collins BM. Fourier Transform Raman Microscopic Mapping of the Molecular Components in a Human Tooth. *J Raman Spectrosc.* 1997;28(2–3):151–8.
126. Tarle Z, Par M. Degree of Conversion. In: Miletic V, editor. *Dental Composite Materials for Direct Restorations* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2019 May 26]. p. 63–85. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-60961-4_5
127. Tauböck TT, Zehnder M, Schweizer T, Stark WJ, Attin T, Mohn D. Functionalizing a dentin bonding resin to become bioactive. *Dent Mater.* 2014;30(8):868–75.
128. Tramini P, Bonnet B, Sabatier R, Maury L. A method of age estimation using Raman microspectrometry imaging of the human dentin. *Forensic Sci Int.* 2001;118(1):1–9.
129. Kumari K, Rao RS, Sarode SC, Sarode GS, Patil S. Raman Microspectrometry: An Alternative Method of Age Estimation from Dentin and Cementum. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(10):11–6.
130. Martens H, Høy M, Wise BM, Bro R, Brockhoff PB. Pre-whitening of data by covariance-weighted pre-processing: Pre-whitening of spectra. *J Chemom.* 2003;17(3):153–65.

131. Acharya UK, Walsh KB, Subedi PP. Robustness of Partial Least-Squares Models to Change in Sample Temperature: I. A Comparison of Methods for Sucrose in Aqueous Solution. *J Infrared Spectrosc.* 2014;22(4):279–86.
132. Silva CS, Pimentel MF, Amigo JM, García-Ruiz C, Ortega-Ojeda F. Chemometric approaches for document dating: Handling paper variability. *Anal Chim Acta.* 2018;1031:28–37.
133. Nespeca MG, Piassalonga GB, de Oliveira JE. Infrared spectroscopy and multivariate methods as a tool for identification and quantification of fuels and lubricant oils in soil. *Environ Monit Assess* [Internet]. 2018 [cited 2019 Dec 24];190(2). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10661-017-6454-9>
134. Ramakrishnaiah R, Rehman Gur, Basavarajappa S, Al Khuraif AA, Durgesh BH, Khan AS, et al. Applications of Raman Spectroscopy in Dentistry: Analysis of Tooth Structure. *Appl Spectrosc Rev.* 2015;50(4):332–50.
135. Arnold WH, Gaengler P. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. *Ann Anat - Anat Anz.* 2007;189(2):183–90.
136. Dai X-F, Cate ART, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Arch Oral Biol.* 1991;36(10):775–8.
137. Meindl RS, Lovejoy CO, Mensforth RP, Walker RA. A revised method of age determination using the os pubis, with a review and tests of accuracy of other current methods of pubic symphyseal aging. *Am J Phys Anthropol.* 1985;68(1):29–45.
138. Albert AM, Maples WR. Stages of Epiphyseal Union for Thoracic and Lumbar Vertebral Centra as a Method of Age Determination for Teenage and Young Adult Skeletons. *J Forensic Sci.* 1995;40(4):1383-8J.
139. Katz D, Suchey JM. Age determination of the male Os pubis. *Am J Phys Anthropol.* 1986;69(4):427–35.
140. Kósa F, Castellana C. New forensic anthropological approachment for the age determination of human fetal skeletons on the base of morphometry of vertebral column. *Forensic Sci Int.* 2005;147:S69–74.

141. Lamendin H, Baccino E, Humbert JF, Tavernier JC, Nossintchouk RM, Zerilli A. A Simple Technique for Age Estimation in Adult Corpses: The Two Criteria Dental Method. *J Forensic Sci.* 1992;37(5):1332-7J.
142. Schmeling A, Olze A, Reisinger W, Geserick G. Forensic age diagnostics of living people undergoing criminal proceedings. *Forensic Sci Int.* 2004;144(2-3):243-5.
143. Schmeling A, Olze A, Reisinger W, König M, Geserick G. Statistical analysis and verification of forensic age estimation of living persons in the Institute of Legal Medicine of the Berlin University Hospital Charité. *Leg Med.* 2003;5:S367-71.
144. Schmeling A, Geserick G, Reisinger W, Olze A. Age estimation. *Forensic Sci Int.* 2007;165(2-3):178-81.
145. Schmidt S, Nitz I, Ribbecke S, Schulz R, Pfeiffer H, Schmeling A. Skeletal age determination of the hand: a comparison of methods. *Int J Legal Med.* 2013;127(3):691-8.
146. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics.* 2015;10(10):922-30.
147. Takasaki T, Tsuji A, Ikeda N, Ohishi M. Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *Int J Legal Med.* 2003;117(4):232-4.
148. Baccino E, Schmitt A. Determination of Adult Age at Death in the Forensic Context. In: Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J, editors. *Forensic Anthropology and Medicine* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2006 [cited 2020 May 6]. p. 259-80. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-099-7_11
149. Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch H-J, et al. Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *Int J Legal Med.* 2000;113(3):129-36.
150. Rissech C, García M, Malgosa A. Sex and age diagnosis by ischium morphometric analysis. *Forensic Sci Int.* 2003;135(3):188-96.

151. Ajmal M, Mody B, Kumar G. Age estimation using three established methods. *Forensic Sci Int.* 2001;122(2–3):150–4.
152. Dorandeu A, Coulibaly B, Piercecchi-Marti M-D, Bartoli C, Gaudart J, Baccino E, et al. Age-at-death estimation based on the study of frontosphenoidal sutures. *Forensic Sci Int.* 2008;177(1):47–51.
153. Lynnerup N, Kjeldsen H, Zweihoff R, Heegaard S, Jacobsen C, Heinemeier J. Ascertaining year of birth/age at death in forensic cases: A review of conventional methods and methods allowing for absolute chronology. *Forensic Sci Int.* 2010;201(1–3):74–8.
154. Scheuer L. Application of osteology to forensic medicine. *Clin Anat.* 2002;15(4):297–312.
155. Meindl RS, Russell KF, Lovejoy CO. Reliability of age at death in the hamann-todd collection: Validity of subselection procedures used in blind tests of the summary age technique. *Am J Phys Anthropol.* 1990;83(3):349–57.
156. Lynnerup N, Thomsen I, Frohlich B. A Non-Invasive Technique for Age at Death Determination. *Med Sci Law.* 1990;30(4):317–20.
157. Rösing FW, Graw M, Marré B, Ritz-Timme S, Rothschild MA, Röttscher K, et al. Recommendations for the forensic diagnosis of sex and age from skeletons. *HOMO.* 2007;58(1):75–89.
158. Lewis JM, Senn DR. Forensic Dental Age Estimation: An Overview. *J Calif Dent Assoc.* 2015;43(6):315–9.
159. Doty KC, Muro CK, Bueno J, Halámková L, Lednev IK. What can Raman spectroscopy do for criminalistics? *J Raman Spectrosc.* 2016;47(1):39–50.
160. Muro CK, Doty KC, Bueno J, Halámková L, Lednev IK. Vibrational Spectroscopy: Recent Developments to Revolutionize Forensic Science. *Anal Chem.* 2015;87(1):306–27.

161. Shlens J. A Tutorial on Principal Component Analysis. ArXiv1404.1100 Cs Stat [Internet]. 2014 Apr 3 [cited 2020 May 6]; Available from: <http://arxiv.org/abs/1404.1100>
162. Kirchner MT, Edwards HGM, Lucy D, Pollard AM. Ancient and Modern Specimens of Human Teeth: a Fourier Transform Raman Spectroscopic Study. *J Raman Spectrosc.* 1997;28(2–3):171–8.
163. Riquieri H. *Dental anatomy and morphology.* Berlin ; Chicago: Quintessence Publishing; 2018. 321 p.
164. Tompkins RL. Human population variability in relative dental development. *Am J Phys Anthropol.* 1996;99(1):79–102.
165. Berkovitz B k. B, Moxham BJ. *Oral anatomy, histology and embryology.* London: Mosby-Wolfe; 1994.
166. Morse DR, Esposito JV, Schoor RS, Williams FL, Furst ML. A review of aging of dental components and a retrospective radiographic study of aging of the dental pulp and dentin in normal teeth. *Quintessence Int.* 1991;22(9):711–20.
167. Hilton TJ, Ferracane JL, Broome JC. *Summitt's fundamentals of operative dentistry a contemporary approach.* Chicago; Berlin; Paris ... [etc: Quintessence Pub.]; 2013.
168. Smith CE. Cellular and Chemical Events During Enamel Maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):128–61.
169. Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC, Tansley GD. Wear of Human Enamel: A Quantitative in vitro Assessment. *J Dent Res.* 1998;77(12):1983–90.
170. Huysmans MCDNJM, Chew HP, Ellwood RP. Clinical Studies of Dental Erosion and Erosive Wear. *Caries Res.* 2011;45(s1):60–8.
171. Sansone C, Van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. The Association of Mutans Streptococci and Non-Mutans Streptococci Capable of Acidogenesis at a Low pH with Dental Caries on Enamel and Root Surfaces. *J Dent Res.* 1993;72(2):508–16.

172. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *J Dent Res.* 2010;89(11):1187–97.
173. Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *J Colloid Interface Sci.* 2004;280(2):442–8.
174. Abou Neel E, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young A, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine.* 2016;Volume 11:4743–63.
175. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management.* Third edition. Chichester, West Sussex, UK ; Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc; 2015.
176. Featherstone JDB. The Continuum of Dental Caries—Evidence for a Dynamic Disease Process. *J Dent Res.* 2004;83(1_suppl):39–42.
177. Kunin AA, Evdokimova AY, Moiseeva NS. Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries. *EPMA J.* 2015;6(3):1–11.
178. Pérez-Pérez A, Lalueza C, Turbón D. Intraindividual and intragroup variability of buccal tooth striation pattern. *Am J Phys Anthropol.* 1994;94(2):175–87.
179. Molnar S. Human tooth wear, tooth function and cultural variability. *Am J Phys Anthropol.* 1971;34(2):175–89.
180. Lucas P, Constantino P, Wood B, Lawn B. Dental enamel as a dietary indicator in mammals. *BioEssays.* 2008;30(4):374–85.
181. Scheid RC, Woelfel JB. *Woelfel’s dental anatomy.* 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2012. 504 p.
182. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000.* 1997;13(1):41–75.

183. Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Jpn Dent Sci Rev.* 2016;52(3):63–74.
184. Gupta P. Human Age Estimation From Tooth Cementum and Dentin. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(4):7–10.
185. Gonçalves PF, Sallum EA, Sallum AW, Casati MZ, de Toledo S, Junior FHN. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci.* 2005;4(12):651–8.
186. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006;39(4):249–81.
187. Hugoson A, Norderyd O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol.* 2008;35:338–45.
188. Nascimento GG, Leite FRM, Scheutz F, López R. Periodontitis: from Infection to Inflammation. *Curr Oral Health Rep.* 2017;4(4):301–8.
189. Li X, Hu L, Ma L, Chang S, Wang W, Feng Y, et al. Severe periodontitis may influence cementum and dental pulp through inflammation, oxidative stress, and apoptosis. *J Periodontol.* 2019;90(11):1297–306.
190. Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS, Gruwell SF, Powell CA. Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol 2000.* 2016;71(1):128–39.
191. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):474–84.
192. Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Radiographic alveolar bone morphology and progressive periodontitis: Short running title: Periodontal bone morphology. *J Periodontol.* 2018;89(4):424–30.
193. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primer [Internet].* 2017 [cited 2020 Mar 21];3(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201738>

194. Kato S, Nakagaki H, Kunisaki H, Sugihara N, Noguchi T, Ito F, et al. The thickness of the sound and periodontally diseased human cementum. *Arch Oral Biol.* 1992;37(8):675–6.
195. Bosshardt DD, Schroeder HE. Initial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing human teeth: A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 1992;267(2):321–35.
196. Malek S, Darendeliler MA, Swain MV. Physical properties of root cementum: Part I. A new method for 3-dimensional evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120(2):198–208.
197. Laux M, Abbott PV, Pajarola G, Nair PNR. Apical inflammatory root resorption: a correlative radiographic and histological assessment. *Int Endod J.* 2000;33(6):483–93.
198. Tsesis I, Nemcovsky CE, Nissan J, Rosen E, editors. *Endodontic-Periodontal Lesions: Evidence-Based Multidisciplinary Clinical Management* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2020 May 7]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-10725-3>
199. Al-Fouzan KS. A New Classification of Endodontic-Periodontal Lesions. *Int J Dent.* 2014;2014:1–5.
200. Lopes FC, Roperto R, Akkus A, Akkus O, Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD. Effects of different lasers on organic/inorganic ratio of radicular dentin. *Lasers Med Sci.* 2016;31(3):415–20.
201. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1367–73.
202. Lainović T, Margueritat J, Martinet Q, Dagany X, Blažić L, Pantelić D, et al. Micromechanical imaging of dentin with Brillouin microscopy. *Acta Biomater.* 2020;105:214–22.
203. Goldberg M. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci.* 2011;E3(2):711–35.

204. Araveti S kumar, Hiraishi N, Kominami N, Otsuki M, Sumi Y, Yiu CKY, et al. Swept-source optical coherence tomographic observation on prevalence and variations of cemento-enamel junction morphology. *Lasers Med Sci.* 2020;35(1):213–9.
205. Sangnes G. Traumatization of teeth and gingiva related to habitual tooth cleaning procedures. *J Clin Periodontol.* 1976;3(2):94–103.
206. Sangnes G, Gjermo P. Prevalence of oral soft and hard tissue lesions related to mechanical toothcleansing procedures. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1976;4(2):77–83.
207. Toffenetti F, Vanini L, Tammaro S. Gingival Recessions and Noncarious Cervical Lesions: A Soft and Hard Tissue Challenge. *J Esthet Restor Dent.* 1998;10(4):208–20.
208. Bartlett DW, Shah P. A Critical Review of Non-carious Cervical (Wear) Lesions and the Role of Abfraction, Erosion, and Abrasion. *J Dent Res.* 2006;85(4):306–12.
209. Wiegand A, Credé A, Tschammler C, Attin T, Tauböck TT. Enamel wear by antagonistic restorative materials under erosive conditions. *Clin Oral Investig.* 2017 Dec;21(9):2689–93.
210. Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for Assessment of Dental Erosion. In: Lussi A, Ganss C, editors. *Monographs in Oral Science* [Internet]. Basel: S. KARGER AG; 2014 [cited 2020 May 7]. p. 123–42. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/360355>
211. Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids--a review. *Occup Med.* 2007;57(3):169–76.
212. Nunn J, Shaw L, Smith A. Tooth wear--dental erosion. *Br Dent J.* 1996;180(9):349–52.
213. Attin T, Zirkel C, Hellwig E. Brushing Abrasion of Eroded Dentin after Application of Sodium Fluoride Solutions. *Caries Res.* 1998;32(5):344–50.
214. Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological characterization of the interface between resin and sclerotic dentine. *J Dent.* 1994;22(3):141–6.

215. Liao J, Zhou Z, Huang L, Li Y, Li J, Zou S. 17β -estradiol regulates the differentiation of cementoblasts via Notch signaling cascade. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477(1):109–14.
216. Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Caffesse RG, Sanz M, et al. 17β -estradiol promotes cementoblast proliferation and cementum formation in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81(7):1064–74.
217. Väänänen HK, Härkönen PL. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas*. 1996;23(Suppl):S65-9.
218. Ukkola O, Gagnon J, Rankinen T, Thompson P, Hong Y, Leon A, et al. Age, body mass index, race and other determinants of steroid hormone variability: the HERITAGE Family Study. *Eur J Endocrinol*. 2001;1–9.
219. Edwards HGM, Williams AC, Farwell DW. Palaeodental studies using FT-Raman spectroscopy. *Biospectroscopy*. 1995;1(1):29–36.
220. Leventouri Th, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age. *Int J Biomater*. 2009;2009:1–6.
221. Nazari A, Bajaj D, Zhang D, Romberg E, Arola D. Aging and the reduction in fracture toughness of human dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009;2(5):550–9.
222. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod*. 1984;10(8):359–63.
223. Rawlani S, Rawlani S, Bhowate R, Chandak R, Khubchandani M. Racial characteristics of human teeth. *Int J Forensic Odontol*. 2017;2(1):38.
224. Ko AC-T, Choo-Smith L-P, Hewko M, Sowa MG, Dong CCS, Cleghorn B. Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy. *Opt Express*. 2006;14(1):203.
225. Tsuda H, Arends J. Orientational Micro-Raman Spectroscopy on Hydroxyapatite Single Crystals and Human Enamel Crystallites. *J Dent Res*. 1994;73(11):1703–10.

226. Houck MM, Siegel JA. Fundamentals of forensic science. Third edition. Amsterdam: Boston : Elsevier, Academic Press, Academic Press is an imprint of Elsevier; 2015. 703 p.
227. Ferreira JL, Ferreira AE de, Ortega AI. Methods for the analysis of hard dental tissues exposed to high temperatures. *Forensic Sci Int.* 2008;178(2–3):119–24.
228. Manolescu I, Ion A, Ioan BG. Post-mortem changes in teeth-forensic issues. *Int J Med Dent.* 2015;5(4):5.
229. Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry — Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *Br Dent J.* 2001;190(7):359–66.
230. Muro CK, de Souza Fernandes L, Lednev IK. Sex Determination Based on Raman Spectroscopy of Saliva Traces for Forensic Purposes. *Anal Chem.* 2016;88(24):12489–93.
231. Sikirzhyskaya A, Sikirzhyski V, Lednev IK. Determining Gender by Raman Spectroscopy of a Bloodstain. *Anal Chem.* 2017;89(3):1486–92.
232. Ruddy GN, Watson S, Davison J. DNA contamination of mortuary instruments and work surfaces: a significant problem in forensic practice? *Int J Legal Med.* 2000;114(1–2):56–60.
233. Broemeling D, Pel J, Gunn D, Mai L, Thompson J, Poon H, et al. An Instrument for Automated Purification of Nucleic Acids from Contaminated Forensic Samples. *J Assoc Lab Autom.* 2008;13(1):40–8.
234. von Wurmb-Schwark N, Heinrich A, Freudenberg M, Gebühr M, Schwark T. The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research. *Leg Med.* 2008;10(3):125–30.
235. Higgins D, Kaidonis J, Townsend G, Hughes T, Austin JJ. Targeted sampling of cementum for recovery of nuclear DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures. *Investig Genet.* 2013;4(1):18.
236. Zehnder M, Gold SI, Hasselgren G. Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 2002;29(8):663–71.

237. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int.* 2009;188(1–3):1–17.
238. Wilson AS, Edwards HGM, Farwell DW, Janaway RC. Fourier transform Raman spectroscopy: evaluation as a non-destructive technique for studying the degradation of human hair from archaeological and forensic environments. *J Raman Spectrosc.* 1999;30(5):367–73.
239. Leich M, Kiltz S, Dittmann J, Vielhauer C. Non-destructive forensic latent fingerprint acquisition with chromatic white light sensors. In: Memon ND, Dittmann J, Alattar AM, Delp III EJ, editors. San Francisco Airport, California, USA; 2011 [cited 2020 May 6]. p. 78800S. Available from: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.872331>
240. Edwards HGM. Forensic applications of Raman spectroscopy to the non-destructive analysis of biomaterials and their degradation. *Geol Soc Lond Spec Publ.* 2004;232(1):159–70.
241. Virkler K, Lednev IK. Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids. *Forensic Sci Int.* 2008;181(1–3):e1–5.
242. Par M, Gamulin O, Spanovic N, Bjelovucic R, Tarle Z. The effect of excitation laser power in Raman spectroscopic measurements of the degree of conversion of resin composites. *Dent Mater.* 2019;35(9):1227–37.
243. Salzer R, Roland U, Born R, Sawatzki J. New Technique Allowing FT-Raman Measurements of Rotating Samples. *Appl Spectrosc.* 1997;51(10):1471–5.
244. Bumbrah GS, Sharma RM. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egypt J Forensic Sci.* 2016;6(3):209–15.
245. Varadwaj KSK, Panigrahi MK, Ghose J. Effect of capping and particle size on Raman laser-induced degradation of γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *J Solid State Chem.* 2004;177(11):4286–92.

8. ŽIVOTOPIS

Životopis

Aziz Osmani rođen je 11. prosinca 1959. godine u Gostivaru, u Republici Sjevernoj Makedoniji. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Gostivaru 1978./1979. godine. Godine 1980. upisuje Medicinski fakultet, odsjek za stomatologiju u Novom Sadu, a diplomirao je 1985. godine. Godine 1986. zapošljava se u Domu zdravlja u Gostivaru te 1987. upisuje magisterij na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. Dore Najžar-Fleger. Godine 1993. magistrirao je s temom „Epidemiološka studija o stanju zdravlja prvih trajnih kutnjaka školske djece općine Gostivar“. Od 2003. do 2006. godine specijalizirao je oralnu kirurgiju na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2008. do 2009. godine radio je u Domu zdravlja Sisak, te od 2009. godine radi u Domu zdravlja Kutina – ispostava Novska. Godine 2014. aktivno sudjeluje na 16. međunarodnom simpoziju dentalne morfologije te na 1. međunarodnom kongresu za paleodontologiju. Godine 2015. aktivno sudjeluje na 1. međunarodnom kongresu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U braku je 30 godina i ponosni otac jednog sina, koji ide u 2. razred Klasične gimnazije u Zagrebu (Križanićeva), i tri kćeri od kojih je jedna specijalizantica ortodoncije, druga specijalizantica interne medicine, nefrologija u KB Dubravi, a treća studentica pete godine opće medicine.

Radovi *in extenso*:

Osmani A, Par M, Škrabić M, Vodanović M, Gamulin O. **Principal Component Regression for Forensic Age Determination Using Raman Spectra of Teeth**. Appl Spectrosc. 2020 7:3702820905903. [Epub ahead of print]

Sažeci sa skupova:

Osmani A, Gamulin O, Vodanović M. **Raman spectrometry and dental age estimation**. Acta Stomatol Croat. 2015;49(2):180-1.

Osmani A, Gamulin O, Vodanović M. **Age estimation of teeth with Raman spectrometry – preliminary study**. Bull Int Assoc Paleodont. 2014; 8(1):137.