



УНИВЕРЗИТЕТ „Св. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“  
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ



КАТЕДРА ЗА ОРАЛНА ХИРУРГИЈА

д-р Ванчо Спиров

Форензичка ДНК- анализа на забите

(докторска дисертација)

Ментор:

проф. д-р Борис Величковски

Скопје, 2015



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“  
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ



КАТЕДРА ЗА ОРАЛНА ХИРУРГИЈА

д-р Ванчо Спиров

Форензичка ДНК- анализа на забите

(докторска дисертација)

Ментор:

проф. д-р Борис Величковски

Скопје, 2015

**Ментор: проф д-р Борис Величковски**

**Членови на комисијата:**

**проф. д-р Оливер Димитровски**

*Стоматолошки факултет, Скопје*

**проф. д-р Алберто Бенедети**

*Стоматолошки факултет, Скопје*

**проф. д-р Алексеј Дума**

*Медицински факултет, Скопје*

**проф. д-р Даница Поповиќ Монеvsка**

*Стоматолошки факултет, Скопје*

**проф. д-р Борис Величковски**

*Стоматолошки факултет, Скопје*

*Кога знаеш каде се наоѓаш  
и знаеш каде сакаш да стигнеш,  
доаѓањето до целта станува лесно.*

**(Dawson)**

## **ИМ ИЗРАЗУВАМ ИСКРЕНА БЛАГОДАРНОСТ:**

на мојот ментор, **проф. д-р Борис Величковски**, кој со својата темелност и висок научен потенцијал ја овозможи реализацијата на оваа докторска дисертација;

на **проф. д-р Алексеј Дума**, за несебичната помош и што го овозможи изведувањето на ова научно истражување;

на **проф. д-р Мира Поповска**, раководител на третиот циклус докторски студии, за искажаната помош во практичната реализација на оваа теза;

на **колективот од Клиниката за орална хирургија**, за секојдневната поддршка и охрабрувањето во текот на изработката на оваа дисертација;

на моите **родители**, мојата **фамилија**, **сопругата Маја** и **синовите Лука и Калин**, за разбирањето и поддршката што ми ја даваа сите овие години.

## СОДРЖИНА

Индекс на зборови .....	8
Апстракт .....	10
Abstract .....	14
1. Вовед .....	18
1.1. Компаративна дентална идентификација .....	21
1.2. Дентално профилирање пост мортем.....	23
1.3. Основи на ДНК профилирање.....	24
1.4. Типови ДНК во форензичката стоматологија .....	28
1.5. Тестови за ДНК профилирање.....	29
1.6. Забот како ткиво за изолација на ДНК .....	33
1.7. Методи за земање мостри .....	34
1.8. Техники на деконтаминација .....	36
1.9. Методи на екстракција на ДНК .....	37
1.10. Фактори што влијаат врз квалитетот на екстрахираната ДНК .....	40
1.11. Други методи на употреба на оралните ткива во постапката на хумана идентификација .....	42
2. Литературен преглед .....	45
2.1. Различни дентални ткива во постапката на хумана идентификација .....	47

2.2. Анализа на техниките за изолација на ДНК од заб	49
2.3. Влијание на надворешните фактори врз степенот на изолација на ДНК	52
2.4. Млечните заби и изолацијата на ДНК	55
2.5. Забот како ткиво во постапката на хумана идентификација	56
3. Цели на дисертацијата	61
4. Материјал и метод	64
4.1. Изолација на ДНК молекулата	65
4.2. Квантификација на примероците	68
4.3. Третман на примероците	69
4.4. Протокол за изолација на ДНК од забите	72
4.5. Статистичка обработка	81
5. Резултати	82
6. Дискусија	144
6.1. Дистрибуцијата на ДНК во рамките на забот	145
6.2. Фактори што влијаат врз количината на изолирана ДНК	153
6.2.1. Тип на забот	153
6.2.2. Хронолошка (старосна) возраст	156
6.3. Посмртна деградација	157
6.4. Млечните заби и изолацијата на ДНК	165

7. Заклучоци .....	169
8. Литература .....	172



## Индекс на зборови

- DNA - (Deoxyribonucleic acid) – Деоксирибонуклеинска киселина (ДНК)
- HMW DNA – (High Molecular Weight DNA) – ДНК со голема молекуларна тежина
- aDNA – (ancient Deoxyribonucleic acid) - Деоксирибонуклеинска киселина од стари примероци
- mtDNA – (Mitochondrial Deoxyribonucleic acid) – Митохондријална ДНК
- nDNA – (Nuclear Deoxyribonucleic acid) – Јадрена ДНК
- ABFO – (American Board of Forensic Odontology) – Американски одбор на форензички стоматолози
- bp – (Base pair) – базни парови
- STRs – (Short Tandem Repeat sequences) – Кратки тандем повторувачки секвенци
- SNP - (single nucleotide polymorphism) -Единечен нуклеотиден полиморфизам
- Y-STR –(Short Tandem Repeats on Y chromosome) – Кратки тандем повторувања на Y хромозом
- NRY – (Non-recombining Region of the Y chromosome) – Нерекombинирачки региони на Y хромозомот
- X-STR (Short tandem repeats on X chromosome)- Кратки тандем повторувања на X хромозом
  
- PCR – (Polymerase chain reaction) – Полимеразна верижна реакција
- VNTR – (Variable number of tandem repeats) - Различен број повторувачки тандеми
- RFLP- (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Полиморфни фрагменти пресечени со ендонуклеази (метод на изолацијата и квантификацијата на ДНК со сечење на мали фрагменти на истата со помош на специјални ензими наречени рестриктивни ендонуклеази).

- ampf FLP – (Amplified fragment length polymorphism) - Амплифицирани полиморфни фрагменти
- CODIS – (Combined DNA Index System) - Комбиниран ДНК индекс-систем основан од страна на Федералното биро за истрага (FBI)
- NDNAD – (UK National DNA Data base) - Британската база на податоци за STR идентификација
- ICMP - (International Commission of Missing Persons) – Меѓународна комисија за исчезнати личности
- EDTA – (Ethylenediaminetetraacetic acid) – Етилендиаминотетраацетатна киселина
- SRY protein - (protein for sex-determining regions of Y) – Протеин одговорен за определување на полот кај мажите
- TCA - (tooth cementum annulations) – Наслаги на цементот од забот
- SPE – (solid phase extraction) – Цврсто фазна екстракција
- DTT – (Dithiothreitol) – Дитиотретиол
- DVI – (Disaster Victim Identification Guide) - Водич за идентификување на жртвите од катастрофи
- ISFG – (International Society of Forensic Genetics) – Меѓународно здружението за судска генетика

# АПСТРАКТ

## Форензичка ДНК- анализа на забите

### Апстракт

#### ВОВЕД

Форензичката одонтологија (стоматологија) е дефинирана како гранка од форензичката медицина која во интерес на правниот систем се занимава со соодветно ракување и испитување на денталниот доказ и со соодветна евалуација и презентација на денталните наоди. Најчестата улога на форензичкиот стоматолог е идентификација на починатите индивидуи. Во сите оние случаи каде што постои голем степен на деструкција и деградација на меките ткива, забите понекогаш претставуваат единствено ткиво што може да биде употребено во постапката на хуманата идентификација. Самата негова структура го прави најцврст орган во човечкото тело кој е отпорен на различни надворешни влијанија и кој, по долг временски период, може да даде информации за индивидуата.

Мекото ткиво (пулпата), дентинот и цементот на забот, периодонталните влакна и прикренените коскени фрагменти, претставуваат делови од забот и периодонтот кои можат да бидат употребени во постапката на идентификација, преку изолација на ДНК од нив. Некодирачките делови на ДНК содржат кратки тандем повторувачки секвенци (Short tandem repeats-STRs) кои се користат во постапката на идентификација.

Различните групи заби, како и различните забни ткива даваат различна количина на ДНК којашто би се употребила во постапката на хумана идентификација.

#### ЦЕЛ

Со откривањето на ДНК молекулата и нејзината примена во постапката за идентификација на индивидуите, се наметна потребата за одредување на

протоколи и параметри врз основа на кои ќе може на најлесен, најбрз и најсигурен начин да се утврди идентитетот на индивидуата употребувајќи го забното ткиво. Оттука произлегоа и целите на овој докторски труд: да се испита од која група заби се добива најголема количина на ДНК, т.е. да се одреди дали постои корелација помеѓу тежината на забот и количината на екстрахирана ДНК; да се испита од кое забно ткиво се добива квалитативна и квантитативна количина ДНК; да се утврди влијанието на надворешните услови на средината врз квалитетот и квантитетот на екстрахирана ДНК, односно да се утврди влијанието на овие фактори врз степенот на деградација на ДНК молекулата и да се испита дали е возможна изолација на ДНК од млечните заби.

#### МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

За реализација на поставените цели, се обработија вкупно 138 заба, без поголеми кариозни оштетувања (ин витро студија), кои се екстрахираа на Клиниката за орална хирургија при Универзитетскиот стоматолошки клинички центар – „Свети Пантелејмон“ во Скопје. Дел од испитувањата, и тоа 153 постапки на изведена изолација на ДНК молекулата и нејзина квантификација, се реализираа на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија - Скопје.

Изолацијата на ДНК молекулата од забниот материјал се изведе со Prepfile Kit од ABI™. Квантификацијата на примероците во студијата се изврши со помош на Quantifiler DNA Quantification Kit од Applied Biosystems, на 7500 Real Time PCR System.

#### РЕЗУЛТАТИ

Испитувањата покажаа дека изолираната ДНК е квантитативно најголема кај групата молари. Од различните видови забно ткиво што беа анализирани, се заклучи дека пулпата претставува најдобриот извор на ДНК во сите оние случаи каде што е присутна. Надворешните фактори во голема мера влијаат врз степенот на деградација на ДНК молекулата.

## ЗАКЛУЧОК

Забите претставуваат одличен извор на ДНК. Постои директна корелација помеѓу тежината на забот и количината на добиена ДНК, со што групата молари претставува група заби кои иницијално би биле вклучени во постапката на хумана идентификација. Исто така, и млечните заби со помал степен на физиолошка ресорпција на коренот и отсуство на кариозни лезии, даваат доволна количина на искористлива ДНК. Мекото ткиво (пулпата) содржи најголема количина на ДНК од сите забни ткива, меѓутоа и цементот на забот и дентинот даваат доволна количина на ДНК која со постапката на PCR може да се амплифицира и да биде употребена во постапката на хумана идентификација. Споредувајќи ги надворешните фактори, може да заклучиме дека земјата и водата доведуваат до најголем степен на деградација на ДНК молекулата.

Клучни зборови: форензичка стоматологија, заб, изолација на ДНК, квантификација на ДНК.

# **ABSTRACT**

## **Forensic DNA- analysis of teeth**

### **Abstract**

#### **Introduction**

Forensic odontology or Forensic dentistry is defined as the branch of forensic medicine that in the interest in the legal system deals with proper handling and examination of dental evidence and appropriate evaluation and presentation of dental findings. The most common role of forensic dentist is the identification of deceased individuals. In those cases where there is a high degree of destruction and degradation of the soft tissues, teeth sometimes represent a unique tissue that can be used in the process of human identification. His very structure makes the most solid organ in the human body which is resistant to various external influences, which after a long period of time can provide information about the individual.

Pulp tissue, cement and dentin of the tooth, periodontal fibers and attached bone fragments representing parts of the tooth and periodontal tissue that can be used in the process of identifying, through isolation of DNA from them. Non coding parts of DNA containing short tandem repeat sequences (STRs) used in the process of identification.

Different groups of teeth and various dental tissue gives different amount of DNA that could be used in the process of human identification.

#### **AIM**

With the discovery of the DNA molecule and its applied use in the procedure of identification of individuals, there is the need to determine the protocols and parameters based on which we can by easiest, fastest and most reliable way determine the identity of the individual using the dental tissue. From here came the goals of this doctoral thesis: to investigate from which group of teeth we can get the largest amount of DNA, i.e. to determine whether there is a correlation between the severity of the tooth and the



amount of extracted DNA; to examine which of the dental tissue gets qualitatively and quantitatively greater amount of DNA; to determine the impact of external environmental conditions on the quality and quantity of extracted DNA, i.e. to determine the impact of these factors on the degree of degradation of the DNA molecule and to examine whether is possible isolation of DNA from milk teeth.

#### MATERIAL AND METHOD

For the realization of the objectives we elaborated 138 teeth without great caries damage (in vitro study), which are extracted at the Clinic for Oral Surgery at the University Dental Clinical Center - St.Pantelejmon in Skopje. Some of the tests, i.e. 153 procedures of performed isolation of DNA molecule and its quantification was conducted at the Institute of Forensic Medicine, Forensic and medical deontology in Skopje. Isolation of DNA molecule of dental material was performed with Prepfil Kit from ABI™. Quantification of samples in the study were performed by the Quantifiler DNA Quantification Kit From Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System.

#### RESULTS

Studies show that the amount of isolated DNA is quantitatively the highest in the group of molars. From different types of analyzed dental tissues we conclude that pulp tissue represents the best source of DNA in all those cases where it is present. External factors greatly affect the degree of degradation of the DNA molecule.

#### CONCLUSION

Teeth represent an excellent source of DNA. There is a direct correlation between the severity of the tooth and the amount of obtained DNA, i.e. group of molars represents a group of teeth that initially would be involved in the process of human identification. Also milk teeth with less physiological resorption of the root and the absence of carious lesions, gives the right amount of usable DNA. Pulp tissue contains the highest amount of DNA of all dental tissues, but the cement and dentin of the tooth gives sufficient quantities of the DNA, which with the PCR procedure can be amplified and can be used

in the process of human identification. Comparing the external factors we can conclude that soil and water leads to the greatest degree of degradation of the DNA molecule.

Key words: forensic dentistry, tooth, DNA isolation, DNA quantification.

**1.**

**ВОВЕД**

## 1. Вовед

Хуманата дентиција има неколку основни обележја што го издвојуваат човечкиот вид од животинскиот и го прават единствен. Првата од тие особености е последица на мешање на гените и расните карактеристики, со што се менува природната рамнотежа помеѓу големината и обликот на забите и големината на човечките коски. Втора карактеристика се хемиската и структурната промена на забите, како резултат на патолошкиот процес и нивното лечење. Стоматолошкиот зафат е најголем причинител за единственоста на секое забало и заедно со развојните карактеристики го сочинува клучот за идентификација на телото со помош на забите. Во последните 40 години, денталната идентификација се појави како постапка на која можеме со сигурност да се потпреме, а воедно е и финансиски прифатлива процедура. Докторот стоматолог понекогаш е единствениот што може да ги идентификува настраданите, спалени, масакрирани, природно умрени, како и живи луѓе, со цел да се дознае правиот идентитет на непознатата личност, бидејќи забите, при идентификација, имаат вредност како отпечаток од прстите. Главна карактеристика на забите е дека тие се најотпорниот дел на човечкото тело, кои и по смртта остануваат скоро непроменети, без оглед на термичките промени и на тоа дали се наоѓале во земја повеќе од илјада години. Триесет и два заба и сто и шеесет забни површини, кои, секако, може да се реставрираат, ја сочинуваат уникатноста на секоја индивидуа (Brkic, 2000).

Форензичката одонтологија или Форензичката стоматологија е дефинирана како: „гранка од форензичката медицина која во интерес на правниот систем се занимава со соодветно ракување и испитување на денталниот доказ и со соодветна евалуација и презентација на денталните наоди“ (Keiser-Neilson, 1980). Оваа научна дисциплина опфаќа три полиња на интерес и тоа:

-испитување и евалуација на повреди на забите, вилиците и оралните ткива предизвикани од различни причини (медицинско-правни аспекти при трауми на оралните ткива);

-техники на идентификација на причинителот на загриз на база на загризните рани (позитивна идентификација или последователна елиминација);

-идентификација на тела и човечки остатоци со дентални техники.

Најчестата улога на форензичкиот стоматолог е идентификација на починати индивидуи (Jones D.G, 1998). Денталната идентификација опфаќа два начина на работа. Првиот, најчесто изведуван, е компаративната идентификација која се употребува за потврдување (со висок степен на сигурност) дека остатоците од починатиот и личноста претставена со денталните податоци добиени пред смртта (*ante mortem*) се една иста индивидуа. Информациите од пронајденото тело и околностите под кои настапила смртта, обично содржат индикации за тоа кој е починатиот. Вториот начин опфаќа случаи каде што податоците пред смртта (*ante mortem*) не постојат и немаме индикации за можна идентификација. Во тој случај, форензичкиот стоматолог ги комплетира посмртните (*post mortem*) податоци, добивајќи ги индивидуалните карактеристики на личноста, заради компарација со претсмртните податоци.

Денталната идентификација на починатите луѓе се изведува поради голем број различни причини. Најчести причини за идентификација на пронајдени човечки остатоци се (Weedn V.W, 1998):

- 1) криминални – вообичаено, испитувањето на насилната смрт не може да започне сè додека жртвата не биде позитивно идентификувана;
- 2) брачни - индивидуи од различни религии не може повторно да стапат во брак доколку не се потврди дека нивните партнери се починати;
- 3) економски - исплатата на пензии, животни осигурувања и други парични добивки се заснова на позитивна потврда на смрт на индивидуата;
- 4) социјални - општествената обврска за зачувување на човечките права и дигнитет се заснова со утврден идентитет;

- 5) друго - во многу религии е неопходна позитивна идентификација на личноста за да се изврши погреб на лицето и сл.

Телата на жртвите од пожар, насилни криминални активности, тешки сообраќајни несреќи и сл. можат да бидат изобличени до таа мера што идентификацијата од страна на најблиската фамилија не е возможна ниту пак е пријатна. Кај луѓето што се починати веќе подолг временски период, пред да бидат откриени, и оние пронајдени во вода, визуелната идентификација е невозможна. Исто така, денталната идентификација има пресудна улога и при природните непогоди и во случаи на авионски несреќи каде што има голем број жртви. Во овие ситуации поради недостигот на компаративна анализа на отпечаток од прстите, денталната идентификација останува да биде главна постапка за одредување на идентитетот на жртвите (Brannon R.B,1999; Alexander C.J,1998; Chapenoire S,1998; Clark D.H, 1994).

### 1.1. Компаративна дентална идентификација

Централната догма на овој тип идентификација е дека *post mortem* денталните остатоци може да се споредуваат со *ante mortem* дентални податоци, кои вклучуваат пишани белешки, дентални картони, клинички студио-модел, рендген-снимки и друго, со цел потврда на идентитетот. Јасно е дека индивидуите со многубројни и комплексни дентални интервенции се полесни за идентификација отколку оние индивидуи со малку или воопшто без дентален ресторативен третман. Забите не претставуваат само соодветно складиште на така уникатна карактеристика, тие, исто така, најчесто ги преживуваат настаните после смртта коишто може да ги нарушат и да ги променат другите делови од човечкото тело (Sweet D,1996). Вообичаено, кога ќе се пронајдат човечки остатоци, се информира Јавното обвинителство кое поттикнува потреба за дентална идентификација. Најчесто, можната идентификација е достапна (пр. новчаник или возачка дозвола може да се најдат со телото) и тоа ќе овозможи пронаоѓање на претсмртните податоци. Во други случаи, според географската локација каде што е пронајдено

телото или друга физичка карактеристика или доказ, можно е да се изврши пробна идентификација, најчесто употребувајќи ги податоците од базата на исчезнати. Претсмртните (*ante mortem*) податоци, потоа ги обезбедуваме од неговиот стоматолог.

Форензичките стоматолози ги обезбедуваат посмртните податоците со внимателно проследување и на пишаните белешки на денталните картони и на радиографските снимки. Доколку сме во можност да обезбедиме претсмртни податоци во тоа време, посмртните радиографски снимки треба да се направат така што ќе претставуваат верна копија на видот на снимката и аголот на снимање. Радиографските снимки треба да се нотираат со цел да се спречи замена на *ante mortem* податоците со *post mortem* податоците.

Откога ќе се комплетираат посмртните податоци, може да се изврши компарација помеѓу двата вида записи што ги имаме. Неопходна е методолошка и системска компарација на секој заб посебно и околните структури по ред. Додека се извршува анализа на секоја реставрација присутна во забалото, истовремено се анализираат и другите присутни околни структури, кои честопати играат пресудна улога кај оние индивидуи со минимално присутни или комплетно отсутни дентални реставрации (тие се т.н. нереставративни случаи) (Murray J, 1986).

Сличностите и разликите треба да се бележат за време на процесот на компарација (Silverstain H, 1995). Постојат два вида разлики, оние што можат да се објаснат и оние што не можат да се објаснат. Дискрепанциите што може да се објаснат, вообичаено се поврзани со поминатото време помеѓу претсмртните и посмртните податоци. Примери се заби кои се екстрахирани или реставрации кои се направени или проширени (МО пломба сега е МОД), како резултат на денталните третмани кои се изведени за време на овој период. Доколку разликите се необјасниви, на пр. ако забот го нема кај претсмртните, но е присутен кај посмртните податоци, тогаш треба да се исклучи од компаративните анализи.

Голем опсег на заклучоци може да се добијат при денталната идентификација. Американскиот одбор на форензички стоматолози тие заклучоци ги ограничи на следниве четири (ABFO, 1994):

-Позитивна идентификација – податоците анте мортем и пост мортем се совпаѓаат во доволен број детали, без необјасливи дискрепанции.

-Можна идентификација – податоците анте мортем и пост мортем имаат доста заеднички карактеристики, но од квалитетот било на посмртните остатоци или на претсмртните докази, не сме во можност да објавиме позитивна идентификација.

-Недоволно докази – информациите со кои располагаме се недоволни за формирање на мислење и донесување на заклучок.

-Исклучување – податоците анте мортем и пост мортем не се совпаѓаат.

Битно е да се напомене дека нема минимален број карактеристики коишто се неопходни за позитивна идентификација. Во одреден број случаи, доволно е само еден единствен заб да се употреби за идентификација доколку содржи доволно уникатни карактеристики. Исто така, има случаи каде што имаме снимки од комплетното забало, но не сме во можност да донесеме заклучок за позитивна идентификација. Стоматологот треба да биде дискретен при идентификацијата и мора да биде подготвен да сведочи за добиените сознанија на суд.

## 1.2. Дентално профилирање пост мортем

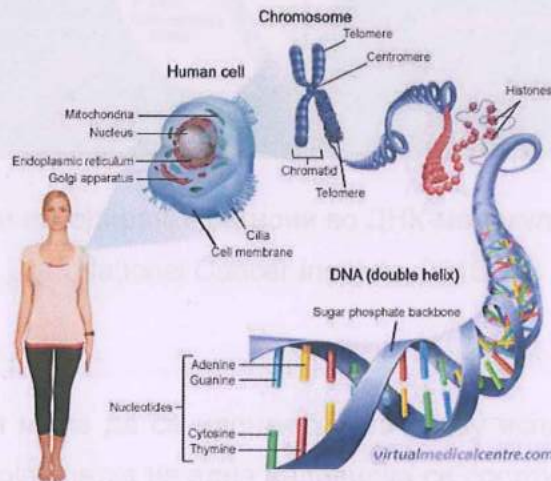
Кога претсмртните (*ante mortem*) дентални податоци се недостапни и не се можни други методи на идентификација, форензичкиот стоматолог може да помогне во ограничување на популациската група на којашто припаѓа починатиот и како резултат на тоа се зголемува веројатноста на локализирање на претсмртните дентални податоци (Sweet D, 1995). Овој процес се нарекува дентално профилирање *post mortem*. Информациите добиени со овој процес ќе овозможат повеќе фокусирано пребарување на податоците пред смрта. Со



денталното профилирање пост мортем, вообичаено се добиваат податоци за возраста на починатиот, неговото потекло, полот и социоекономскиот статус. Во некои случаи, може да се обезбедат дополнителни информации кои се однесуваат на неговото занимање, диететските навики, вообичаеното однесување и понекогаш присуството на одредени системски заболувања.

### 1.3. Основи на ДНК профилирање

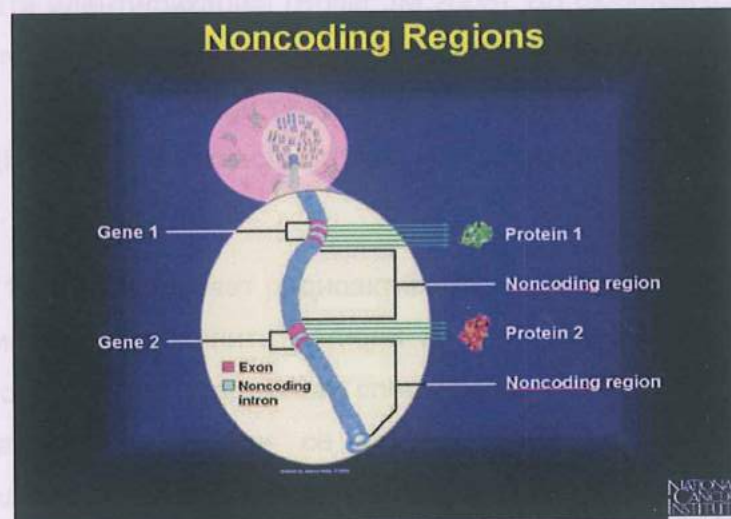
Најсовремена техника и денес најчесто изведувана со цел одредување на идентитет, пол и возраст е изолација на ДНК. Деоксирибонуклеинската киселина претставува хемиска супстанција којашто содржи информативен код за размножување на клетките и за изградба на потребните ензими. Во секоја клетка од човечкото тело, молекулата на ДНК обезбедува еден вид компјутерска програма која ги одредува фенотипските карактеристики и многу други особености кај човекот, кои постојано се откриваат (сл.1).



Сл.1 Шематски приказ на ДНК молекулата (преземено од Center for Genetic testing of Hereditary Disease, 2015)

Молекулата на ДНК во хромозомите содржи кодирачки и некодирачки региони. Кодирачките региони се наречени гени и содржат информации што се неопходни за да може клетката да синтетизира протеини. Овие кодирачки региони зафаќаат

вкупно 5% од молекулата на ДНК. Останатиот дел од молекулата на ДНК е некодирачки при што неговата функција е непозната, но е од значење за форензичката идентификација кај луѓето, затоа што во овој дел се огледува полиморфноста помеѓу луѓето (сл.2). Најчест извор на ДНК за анализа се меките ткива, влакната, коските и забите. Изолација на ДНК од коски и заби најчесто се изведува во случаи на идентификација на скелети, масовни гробници, авионски несреќи и настрадани жртви во воени конфликти.



Сл.2. Кодирачки и некодирачки региони во ДНК-молекулата (преземено од National Cancer Institute, 2015)

Човечкиот организам може да се идентификува преку испитување и анализа на ДНК секвенците. Секоја клетка на една индивидуа се состои од многубројни копии на ДНК. Секое човечко суштество се карактеризира со уникатна (единствена) ДНК секвенца, поради хиперваријабилните региони на ДНК, кои се специфични за секоја личност. ДНК молекулата е изградена од четири градежни блокови наречени бази. Тие бази се: цитозин (C), гванин (G), тимин (T) и аденин (A). Според редоследот (секвенцата) на овие блокови се одредуваат генетските

карактеристики на секој човек. Редоследот на базните парови (bp) во ДНК молекулата на секоја индивидуа е различен со исклучок на идентичните близнаци. Единственоста се должи на внатрешните сегменти (intron regions) на ДНК, кои се состојат од секвенци кои се од 20 до 100 bp во должина, и се повторуваат на различни локации (loci) по должината на хромозомот, како на пр. AGACTAGACATT-AGACTAGACATT, кој се нарекува секвенциски полиморфизам (Manjunath BC,2011). Должината на полиморфизмот како AATG-AATG (двојно повторување), или AATG-AATG-AATG (тројно повторување), е наречена *кратки тандем повторувачки секвенци (Short Tandem Repeats - STRs)*, кои се користат во форензичката идентификација (Butler JM,2005). Во форензичката ДНК анализа STR се прифатени, поради тоа што лесно се амплифицираат со методот PCR. Тие даваат високо дискриминирачки резултати, а за анализа е потребна многу мала количина на ДНК, како и можноста со овој метод да се анализира и деградирана ДНК молекула.

Jeffreys и др. (1985), изведуваат радиоактивни молекуларни проби кои може да ги препознаат високоваријабилните региони на ДНК (минисателити во човечкиот геном) и на тој начин се утврдуваат специфични модели за секоја индивидуа. Овие хиперваријабилни локуси се конституирани од тандем повторувачки олигонуклеотидни секвенци, од 2 до 80 bp. Во зависност од нивната големина, овие локуси се создадени од различен број тандем повторувања (VNTR-variable number of tandem repeats) или минисателити (9-80 bp), и STR (кратки тандем повторувања) или микросателити (2-7 bp) (Da Silva,2007).

Најчесто употребуван форензички метод за одредување на VNTRs, е употребата на *јужна хибридизација (Southern hybridization)*. Анализите на STR се изведуваат со екстракција на јадрената (нуклеарната) ДНК од клетките. За амплификација на ДНК се употребува *полимеразна верижна реакција (Polymerase chain reaction-PCR)* и тестот со гел-електрофореза или капиларна електрофореза (Daata,2012).

Овие повторувачки секвенци се наречени ДНК отпечатоци (DNA Fingerprints), а постапката за нивно одредување се нарекува ДНК типизирање, т.е. профилирање (DNA Profiling). ДНК профилирањето е стандардна процедура во форензичкиот

систем за хумана идентификација, криминалните случаи, како и во постапките на одредување на татковството (Bucleton, 2005).

Првично, форензичката заедница го употребуваше тестирањето VNTR, но се покажа дека овој метод бара поголема количина на материјал и резултатите се со низок квалитет, посебно кога се располага со многу мала количина на биолошки материјал. Во моментот, во повеќето форензички лаборатории, испитувањето на ДНК обично се изведува со анализа на STR. Највредните STRs за човечка идентификација се оние што имаат голем полиморфизам (поголем број на алели), помала големина (во базни парови), повисока фреквенција на хетерозиготите (повисока од 90%) и ниска фреквенција на мутации.

Процесот на екстракција на ДНК се состои од три различни фази и тоа: руптура на клетката (лиза на клетката), протеинска денатурација и инактивација, и конечно екстракција на ДНК (Vogel F, 2000). За успешна ДНК анализа, неопходни се соодветни методи за квантификација на примероците на ДНК. Најчесто употребувани техники за екстракција на ДНК во форензичката стоматологија се: 1. органските методи (со употреба на фенол-хлороформ), кој се користи за изолација на високомолекуларна ДНК, техника која е мошне тешка за изведување и одзема доста време, со висока веројатност за појава на грешка, и која може да се изведе кога имаме изобилство од примерокот; 2. метод со FTA хартија (се користи апсорпциска целулозна хартија со одредени хемиски супстанции кои ја забрзуваат целата постапка); 3. метод со изопропил алкохол (кој се состои од амониум и изопропанол, кои не се многу скапи и е алтернатива на органскиот метод) и 4. методот *хелекс 100* (Chelex-100), кој е најбрз метод, едноставен, со најмал ризик од контаминација, но сепак мошне скап. Со овој метод се овозможува екстракција на ДНК, нејзина амплификација и типизација кај спалени (изгорени) заби.

Комерцијалните сетови за ДНК екстракција овозможуваат олеснето реверзибилно врзување на ДНК со магнетни честички, резултирајќи со добивање на примероци на ДНК со висока вредност. Методите на база на силициум се погодни за екстракција на ДНК од стари коски и заби (aDNA- ancient DNA). Овој метод е подобар за јадрено STR типизирање од деградирани примероци отколку методот

со фенол-хлороформ. Методите на екстракција на ДНК со силициум кој користи размена на јоните, значително ја подобрува PCR амплификацијата и може да биде корисна во случаи на лошо сочувани примероци, примероци отпорни на PCR постапка и стари примероци.

#### 1.4. Типови ДНК во форензичката стоматологија

Човечкото тело просечно е изградено од околу 100 трилиони клетки кои потекнуваат од една клетка - зигот. Секоја клетка содржи иста генетска програма. Во хромозомите на јадрото во секоја клетка се наоѓа хемиска супстанција, деоксирибонуклеинска киселина – ДНК, која содржи информативен код за размножување на клетките и за изградба на протеини. Бидејќи ДНК молекулата се наоѓа во јадрото на клетката, таа често се нарекува јадрена (нуклеарна) ДНК- (nDNA). Но, исто така, постои и многу мала количина на ДНК која се наоѓа во митохондриите од клетката, кои ја снабдуваат клетката со енергија и таа се нарекува митохондријална ДНК (mtDNA). Техниките на изолација на ДНК вклучуваат детекција, квантификација и анализа на ДНК од јадрото и од митохондриите. Геномичната (јадрената) и митохондријалната ДНК се два типа ДНК кои се употребуваат во форензичката наука. Јадрената (нуклеарната) ДНК се наследува од обата родители, и од таткото и од мајката. Таа се наоѓа во јадрото на секоја клетка во човечкиот организам и претставува најдобар извор за испитување на ДНК во повеќето форензички случаи. Забите се извонреден извор на геномична ДНК. Митохондријалната ДНК (mtDNA) е друг тип материјал кој се наследува само од мајката и кој може да се употреби кога количината на екстрахираните примероци на ДНК се премногу мали или деградирани. Веројатноста за обезбедување на ДНК профил од mtDNA е повисока од кој било маркер пронајден во геномичната nDNA (Butler, 2005). Различни биолошки примероци кои немаат нуклеарен целуларен материјал може да бидат анализирани со mtDNA, и тоа со голема успешност. Главната предност на mtDNA е големиот број копии во клетката (од стотици до неколку илјади органели). MtDNA претставува 0,5% од тоталната ДНК од човечкиот организам и лесно се одвојува

од геномичната ДНК. MtDNA е составена од 16.568 нуклеотидни bp во должина и е многу поотпорна, т.е. преживува за подолг временски период во споредба со јадрената (нуклеарната) ДНК (Presecki Z,2000).

### 1.5. Тестови за ДНК профилирање

Моменталните тестови што се изведуваат за ДНК профилирање, се целосно сигурни и даваат детали за физичките карактеристики на поединецот, етничката припадност, местото на потекло и полот. Овие тестови, исто така, се прифатени како правни докази во судовите, за испитување на татковството и идентификација на индивидуи. Има голем број методи за изолација на ДНК, од кои најчесто употребувани во форензичката стоматологија се:

- **Методот RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).** Кај овој метод изолацијата и квантификацијата на ДНК се прави со нејзино сечење на мали фрагменти со помош на специјални ензими наречени рестриktivни ендонуклеази. Овие ензими функционираат како молекуларни ножици, кои ја сечат ДНК на специфично место кое се нарекува рестриktivно, ендонуклеазно место на препознавање. Овие молекуларни ножици специјално ја сечат ДНК на местото коешто не се наоѓа во склоп на секвенцата на тандем повторувањето, туку во помалку варијабилните региони. Пресечените фрагменти ќе содржат различен број тандем повторувања (VNTR), на тој начин создавајќи фрагменти со различни должини (Potch,1992). Тестирањето на овие повторувачки сегменти (VNTR), кои обично се со средна големина(од 15-65 bp), ретко се употребува во форензичките анализи поради лошиот квалитет на ДНК кој се обезбедува со овој метод.

- **Методот PCR (Polimerase Chain Reaction).** Се употребува за амплификација на количината на ДНК со која располагаме, со што можеме да ја изведеме анализата и во сите оние ситуации каде што имаме мала количина ДНК. За изведување на оваа интервенција неопходни се специјални ензими и ДНК прајмери. Овие прајмери се како сонди кои се дизајнирани да ги препознаат деловите од ДНК што се наоѓаат на крајот на варијабилниот регион, со цел негова амплификација.

Принципот на PCR е дека самата ДНК може да се дуплира. Ова се прави со одвиткување на нишките од ДНК и секоја нишка дејствува како шаблон за синтеза на нова нишка. Со техниката на PCR може да се амплифицираат одредени сегменти на ДНК во зависност од прајмерот што се користи. Стандардната PCR поминува низ 30 циклуси, за временски период од неколку часа кој резултира со амплификација на оригиналната ДНК преку 109 пати (Brannon R.B,1999). Оваа техника е извонредно моќна и овозможува да се користи минимална количина на ДНК (1  $\mu$ g), што пак овозможува да се испитуваат гени од материјал кој одамна не е веќе жив (парафинско ткиво, ткива од мумии, од кадаверични коски и сл.)(Alakos J.D,2009).

- **Анализи STR (Short Tandem Repeats).** Во форензичката стоматологија, испитувањето на ДНК вообичаено се изведува со оваа анализа, која може да се дефинира како анализа на хиперваријабилните региони од ДНК кои се состојат од последователни повторувања на фрагменти кои имаат од 2 до 7 bp (Da Silva,2007). Овие STR фрагменти, се опишуваат како краток отсечок од ДНК којшто се повторува на различни локации низ човечкиот геном и оваа технологија се употребува за одредување на специфичните региони во ДНК. Секоја индивидуа има некои STRs кои се наследуваат од таткото, и некои од мајката, така што ниту една личност нема STRs кои се идентични со оние на едниот родител. Единственоста на STRs на секој поединец му обезбедува научен маркер за идентитетот и како резултат на тоа се користи за случаите на форензичка идентификација за одредување на татковство (Zehner R,1998). Висок процент на успех за човечка идентификација со употреба на анализите STR, е забележана во примероците на ДНК добиени од густата кортикална коска на долгите ножни коски (фемур-86,9%) и кај интактните заби (82,7%) (Ricaud F.X,2005) .

Врз основа на анализите STR е создаден *комбиниран ДНК индекс систем* (CODIS), кој е основан од страна на Федералното биро за истрага (FBI). Тој е создаден специјално за да им овозможи на јавните форензички лаборатории на ДНК да создадат пребарувачка ДНК база на податоци на овластени ДНК профили. Во Федералното биро за истраги (FBI) има одбрано 13 специфични STR региони

(loci) кои служат како стандард за анализа на ДНК индекс системот (Milos A,2007). Неверојатни се шансите две исти индивидуи да имаат исти 13 региони (loci) од ДНК профилот, и веројатноста е еден на една милјарда население. САД ја има најголемата ДНК база на податоци во светот. Британската база на податоци за STR идентификација се нарекува *UK National DNA Data base (NDNAD)*. Британскиот систем користи 10 региони (loci) за идентификација, за разлика од Американскиот кој користи 13.

- **Анализи на mtDNA (анализи на митохондријалната ДНК).** Оваа ДНК се разликува од јадрената (нуклеарната/nDNA) во однос на нејзината локација, нејзиниот квантитет во клетката и нејзиниот начин на наследување. Анализите на mtDNA може да се изведуваат за испитување на ДНК од примероци што не може да се анализираат со методите на STR и RFLP. Анализите на mtDNA ја користат ДНК добиена од целуларни органели наречени митохондрии. Во истрагата на случаите кои се нерешени за подолг временски период, mtDNA е исклучително важна. Таа е подобра од јадрената (нуклеарната) ДНК бидејќи се наследува чисто по мајчина линија и има од 100 до 1000 копии на mtDNA во клетката (Holand MM,1993). Овие анализи може да се изведат од забот, посебно од дентинот и цементот кои содржат доволна количина ДНК што ќе овозможи амплификација на mtDNA, која ќе може да се употреби за идентификација (Malaver P.C,2003). Silva и др. (2007) укажуваат дека анализите на mtDNA за форензички цели се индицирани само кај стари, древни ткивни остатоци, како што се коската, косата и забите, во случаи каде што јадрената (нуклеарната) ДНК не може да се анализира.

-**Анализа на Y хромозомот.** Y хромозомот се пренесува директно од татко на син, па анализата на генетските маркери на Y хромозомот е особено корисно за следење на односите помеѓу машката популација и за анализа на биолошки докази кои вклучуваат повеќе машки соработници. Од почетокот на 90-тите години, полето на форензичката анализа на Y-хромозомот се усоврши, така што денес оваа анализа зазема главно место во лабораториите кои се занимаваат со разрешување на криминалните случаи. При анализите на Y-STR, специфични региони на ДНК од Y-хромозомот се маркираат и се копираат повеќепати.



Системот на ДНК профилирање на Y-STR исклучително точно ја селектира машката ДНК во присуство на голема количина женска ДНК. Со оваа анализа, одредувањето на полот на сите свежи примероци добиени во рок од 24 часа, како и оние добиени по еден месец, е со 100% точност (Gajendra V,2010). Испитувањето на Y-STR полиморфизмот се користи за докажување на татковството, во случаите на физички напад, убиства, сексуален напад и злоупотреба на деца, каде што често на нивната кожа се наоѓаат загризи. Y-хромозомските STR-и (Y-STR), исто така претставуваат моќна техника во студиите за еволуција на човекот, како и во секојдневните анализи од форензичката практика, одредувањето на роднинското поврзување и вештачењето на татковството, особено кога можниот биолошки татко е починат. Y-хромозомот се наследува по татковата линија на машките деца во семејството, што значи дека сите машки поколенија во едно семејство имаат ист генотип на Y-хромозомот. Причината е тоа што 95% од Y-хромозомот содржи нерекombинирачки региони (NRY). Y-STR маркерите, кои се користат при анализите на Y-хромозомот се дизајнирани врз основа на NRY. Y-хромозом STR имаат многу голем степен на дискриминација >99% во сите популациски студии во Европа. Локусите што се наоѓаат во NRY, генетски се поврзани и се наследуваат од таткото на синот. Секако, и кај некој од наследниците може да се појават мутации на Y-хромозомот и тие се движат во сразмер од 0,21% до 0,32%.

- **Анализа на хромозомот X-STR (X chromosome short tandem repeat).** Оваа анализа се користи за постапка на идентификација и геномични студии на различни етнички групи во светот (Krausz C,2004). Бидејќи големината на X хромозомот STR алелите е мал, генерално вклучува од 100 до 350 нуклеотиди, релативно лесно се амплифицира и се открива со висока сензитивност (Kang L,2006). X хромозом STR маркерите формираат моќен комплементарен систем особено при потешкотии во одредување на татковството.

- **Анализа на амплифицирани полиморфни фрагменти или ampF FLP (amplified fragment length polymorphism).** Оваа постапка започнала да се изведува во деведесеттите години (Hochmeister,1991). Анализата е многу побрза

од методот RFLP и користи PCR за амплификација на ДНК примероците. AmpF FLP може да се изведува со високо автоматизирана процедура и овозможува лесно креирање на филогенетското стебло базирано врз основа на споредување на поединечните примероци на ДНК. Благодарение на релативно ниската цена на чинење и едноставноста за изведување на постапката, оваа анализа е мошне популарна во земјите со помал приход. (Comey C.T, 1994)

- **Анализа на SNP (single nucleotide polymorphism), анализа на единечен нуклеотиден полиморфизам.** Овие единечни полиморфизми се секвенци на ДНК варијации кои се јавуваат кога еден нуклеотид (A, T, C, G) во секвенцата од геномот се менува. На пример еден SNP може да ја промени ДНК секвенцата на следниов начин AAGGCTAA во ATGGCTAA (Gu S, 2006). Единечните нуклеотидни полиморфизми се појавија како маркери од интерес во судската медицина поради нивната мала големина, што е корисно при анализа на деградирани примероци. Позитивни карактеристики на овие полиморфизми се и пониската стапка на мутација во споредба со STRs; истите се доста стабилни во текот на анализата; ги има во изобилство во човечкиот геном; лесно може да обезбедат точни информации за потеклото, идентитетот или фенотипот и полот. Ограничувањето на анализата на SNP вклучуваат, неможност на широко воспоставени основни региони за анализа и барање на големи мултикомплексни анализи. Но сепак, се смета дека SNP методите на анализа на ДНК се технологија на иднината (Pankaj D, 2012).

#### **1.6. Забот како ткиво за изолација на ДНК**

Покрај изолацијата на ДНК од влакното, коските, исушеното меко ткиво, забите даваат најдобро искористлива ДНК за идентификација, поради тврдото дентално ткиво, кое физички ја заштитува пулпата. Најчесто ткиво кое се користи за изолација на ДНК е мекото ткиво (пулпата), кое, всушност, е сврзано ткиво составено од клетки (одонтобласти, фибробласти, ендотелијални клетки, периферни нерви, недефинирани мезенхимални клетки, макрофаги и лимфоцити).

Пулпата е најлесна за подготовка и анализа. Меѓутоа, во случаи на ендодонтски третиран заб, каде што е отстранета пулпата, екстракција на ДНК се прави од калцифицираните ткива и тоа чисто од дентинот или од дентинот и цементот заедно преку процедура на мелење со што се добива прашеста материја. Потоа се прави изолација и од периодонталните влакна и прикрените коскени фрагменти. Целуларниот цемент го покрива најапикалниот дел од коренот на забот и во него има многубројни лакуларни простори (цементни корпускули) исполнети со цементацити, кои поради анатомската позиција се најмалку изложени на надворешни влијанија, особено на хемиските процеси - оксидација и бактериска деградација (Smith B.C,1993). Дентинот се состои од целуларни продолжетоци (Томасови влакна) коишто се богати со митохондрии. Поради тоа, прашината добиена од дентинот е богат извор на mtDNA. Оваа ДНК е повеќе употреблива од јадрената (нуклеарната) ДНК. mtDNA има само 13 гени, додека јадрената ДНК има 100.000 гени. Во клетката се содржани висок број на mtDNA копии кои имаат особина на преживување за подолг временски период, во споредба со pDNA. Таа се наследува чисто по мајчина линија и поради тоа е најдобра за идентификација на роднинските врски, со случаи кои датираат преку илјада години (Silva L.A.F,2002).

### 1.7. Методи за земање мостри

Постојат голем број техники за изолација на ДНК од забите кои се опишани во литературата. Некои се стремат кон пулпата и/или дентинот како извор на ДНК и вклучуваат хоризонтално (Alvares Garsia A,1996; Azlina A,2011) или вертикално разделување (Malaver P.C,2003; Sweet D.J,1995), како и стандарден (Pinchi V,2011; Tillota F,2010) или апикален (Cobb J.C,2002) ендодонтски пристап, со следствено стружење или дупчење (Smith B.C,1993) на внатрешноста на забот. Други методи едноставно вклучуваат мелење на целиот или само на дел од забот преку постапка на дробење помеѓу две челични плочи (Alonso A,2001; Smith B.C,1993) или брусење во толчник (Azlina A,2001), мелница за коска, блендер (Marjanovic D,2007), мелница за ткивото (Presecki Z,2000) или употреба на мелница при ниски

температури (криогени блендери) (Rubio L,2009;Rubio L,2012; Sweet,1998). Сечењето и дробењето на ткивата го зголемува ризикот од загадување, а воедно се генерира и топлина. Топлината понатаму може да ја деградира ендогената ДНК, доведувајќи до намалување на количината и квалитетот на добиениот материјал (Adler C.J,2011). Adler и др. (2011) докажаа дека борерите кои развиваат големи брзини, имаат негативно влијание на изолацијата на ДНК од забите и посочуваат дека сечењето треба да се врши со помали брзини за да се минимизира создавањето на топлина, а со тоа да се намалат ризици од натамошно деградирање на ДНК. Tilotta и др. (2010) ја споредуваа количината на јадрената (нуклеарната) ДНК изолирана од забите кои се комплетно сомелени со оние кај кои се зема мостри од пулпата преку ендодонтски пристап (преку кавитет избушен на коронката) и е забележано значително повисок принос на ДНК од оние примероци на забите кај кои е употребен ендодонтскиот третман. Приносот од насоченото земање мостри покажа значително зголемување на количината на јадрената (нуклеарната) ДНК.

Недеструктивните екстракциски методи вклучуваат употреба и постава на интактните заби во EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) и протеиназата K, и тие методи даваат мошне добар успех (Bolnick D.A,2012). Забележана е 90% и 70% стапка на успех при пронаоѓањето на mtDNA и јадрената ДНК на заби коишто датираат од 300 год. пр.н.е. до 1600 год. Овој вид недеструктивни методи овозможува задржување на забите за употреба во традиционалната стоматолошка постапка на идентификација и за враќање на семејствата на забите, што е особено важно во случаи каде што се пронајдени мали количини остатоци од жртвата (Shiroma C.Y,2004).

Малку внимание е посветено на подобрување на методите за земање примероци бидејќи честопати мелењето на целиот заб дава позитивни резултати. Се препорачува земање мостри од забите, целејќи ја пулпата или цементот, и со тоа се зголемува можноста за поголем успех, а воедно се овозможува зачувување на структурата на забот. Со овие методи, исто така, се избегнува додавање на

големи количини на разредувачи во постапката на изолација, што значително може да влијае на количината на изолирана ДНК.

### 1.8. Техники на деконтаминација

Важно е да се напомене дека при работа со човечка ДНК, од скелетните остатоци и заби постои можност за контаминација на материјалот. Забите, поради структурата и малата порозност (Alakos Y.D,2009), се многу поотпорни на контаминација отколку коските (Gilbert M.T,2005). Микроорганизмите и загадувачите на животната средина може да имаат негативно влијание врз екстракцијата на ДНК, амплификацијата и нејзината понатамошна анализа. Контаминација со егзогена ДНК е пријавена во форензички ДНК анализи во текот на масовни елементарни непогоди (Western A.A,2008) и е добро познат проблем при анализата на стари скелетни остатоци (Deguilloux M.F,2011; Sampietro M.L,2006). Егзогената ДНК често е помалку оштетена и е во поголеми количини од ендогената ДНК, и на тој начин може да се употреби во генетската анализа, резултирајќи со давање погрешни ДНК профили (Woodward S.R,1994). Постојат бројни методи за деконтаминација на заби кои се употребуваат во постапката на идентификација и тие вклучуваат, физичко отстранување на надворешната површина на забот (Rubio L,2009; Burger J,1999), експозицијата на УВ светлина (Alonso A,2001) или потопување во натриум хипохлорит (белило) (Kemp B.M,2005). Овие методи се користат под претпоставка загадувањето да е ограничено на надворешни површини (Gilbert M.T,2005; Gilbert M.T,2006). Најчесто документиран метод за деконтаминација на заби е употребата на натриум хипохлорид (белило) (Kemp B.M,2005). Генерално се смета дека белилото ја уништува егзогената ДНК додека ендогената ја ДНК остава непроменета. Сепак, треба внимателно ракување со средствата за белење на забите во постапките на деконтаминација, поради негативниот ефект на белилото на ендогената ДНК. Во постарите студии се претпоставува дека ендогената ДНК е сврзана на минерали во коските и на тој начин е заштитени од ефектот на белилото (Salamon M,2005; Kemp B.M,2005). Сепак, ниедна студија не објаснува за кој временски интервал од посмртната

фаза настанува врзување на ДНК со минералите или пак да ја презентира длабочината на пенетрација на белилото во самиот заб. Неврзана ендогена ДНК може да биде присутна во ткивата во близина на површината на забот, на пример, во цементот, и белилото може да влијае на оваа ДНК, деградирајќи ја.

Вистинското влијание на техниките на деконтаминација на забите допрва треба да се утврдува, па поради тоа е подобро да се избегнува употребата на средства за белење и други хемикалии што можат да ја уништат ДНК. Забите што се употребуваат за анализа, вообичаено се отстранети од вилицата под идеално стерилни услови и се исклучително чисти и мала е веројатноста да бидат контаминирани со другата човечка ДНК, па заради тоа се препорачува едноставно чистење на забите пред постапката на земање примерок. Едноставни техники вклучуваат чистење на забите со четка и вода и лесно гребенење на површината заради отстранување на непотребните остатоци кои може да ја контаминираат ендогената ДНК.

### 1.9. Методи на екстракција на ДНК

За форензичките цели, идеалниот метод за екстракција на ДНК треба да придонесе до зголемување на количината на екстрахираната ДНК, да биде економичен и временски ефикасен (да не трае долг временски период), да има помалку постапки за работа и да биде соодветен за автоматизација (Loreille O.M, 2007). Помалку чекори во процесот на екстракција, како и заштедата на време и материјали, ќе ја намалат веројатноста за појава на контаминација на материјалот. Кога се работи со деградирани скелетни остатоци и заби, трагите од ДНК треба да се обноват преку отстранување на потенцијалните инхибитори и минимизирање на потенцијалната егзогена контаминација на ДНК (Yang D.Y, 1998). Забите пронајдени во природната средина, најчесто се загадени со бактерии, габички и загадувачи на животната средина, како што се хумичната киселина, фулвичната киселина и разни метали. Ако овие загадувачи на животната средина се екстрахираат заедно со ендогената ДНК, тие може да

влијаат врз постапката на изолација на ДНК, т.е. може да ја инхибираат постапката на PCR амплификација (Rohland N,2012). PCR инхибицијата, исто така, може да биде предизвикана од страна на калциум и колаген, кои се наоѓаат природно во забите, и од страна на некои производи при процесите на екстракција како што се етилендиаминтетраацетатна киселина (EDTA), фенол, хлороформ, натриум хлорид (NaCl) и некои детергенти. При обработката на скелетните остатоци, обично настанува деградација на ДНК поради премногу агресивните третмани, како што се високите температури и употреба на јаки детергенти, и тие треба да се избегнуваат за да се намали уште повеќе степенот на деградација.

Постојат голем број техники за екстракција на ДНК од минерализирани ткива со различни протоколи на работа и тоа: органскиот метод (фенол-хлороформ), хелекс (chelex), силициум диоксид и техниката на изолација со употреба на магнетни честички. Пред започнување на екстракцијата, се започнува со декалцификација на минерализираните ткива со потопување на забите во EDTA за време од 8 минути во период од неколку дена. Постапката на деминерализација се базира на податокот дека ДНК е цврсто врзана во густите кристални агрегати и без деминерализација таа нема да биде ослободена во растворот (Huel R,2012). Некои студии објавуваат намалување на количината на ДНК по изведената декалцификација (Huel R,2012; Fisher D,1993), додека други пријавиле зголемување на приносот (Loreille O.M,2007). При внимателно разгледување на овие студии може да се забележи дека се употребени различни протоколи на работа. Обично, целта е да се раствори минералниот матрикс (со постапка на хелирање на јоните на калциум со EDTA), за да се овозможи ензимска дигестија (со протеиназа K) на органската матрица (Schwarz C,2009). Понекогаш тоа се изведува во два чекора и EDTA се отфрла или, алтернативно, постапката се изведува во еден чекор со задржување на EDTA (Desmyter S,2008). Постои општа усогласеност дека декалцификацијата на коските со задржување на EDTA го зголемува приносот на ДНК (Loreille O.M,2007; Jakubowsja J,2012).

Како што количината на EDTA зависи од обемот на минералите во примерокот, помали примероци може да се третираат со помал волумен на EDTA. Треба да се

спомене дека постапката на декалцификација бара дополнителни постапки во ракување и пипетирање, со што се зголемува можноста за контаминација, се зголемува времето на работа и постапката е помалку подложна на автоматизација. Потребата за деминерализација се избегнува во случаи на употреба на пулпата за изолација на ДНК. Доколку не постои пулпа и присутни се само цврсто ткивни остатоци, тогаш постапката на декалцификација може да биде корисна. Сепак, некои студии покажуваат дека соодветна ДНК може да се извлече без претходна декалцификација (Parsons T.J,2007; Pfeiffer H,1999; Fisher D,1993), но претпоставката е дека ова веројатно настанува под влијание на напреднат степен на распаѓање на забот.

Органската екстракција, вклучувајќи фенол/хлороформ и силикатниот метод на екстракција, се преферираниот начин на екстракција на ДНК од човечки заби и коски. Силика-врзувачките методи се потпираат на употреба на гванидин врз хаотропните соли со цел раскинување на протеините и непосредно врзување на ДНК честички за силициумовата сол преку јонските мостови (Davoren J,2007). Врзувањето на ДНК во овој процес е многу специфично и употребата на гванидин изотиоцијанат (GuSCN) го спречува коекстрахирањето на потенцијалните инхибиторни соединенија присутни во примерокот (Rohland N,2012). Врзувањето на ДНК со силициум е силно зависна од рН вредноста бидејќи рН вредностите поголеми од 7,5, драстично го намалуваат врзувањето на ДНК (Dukes M.J,2012). Значи употребата на соединенија, како што се EDTA, SDS и DTT, коишто влијаат врз рН вредноста, треба да се направат на начин за да се минимизираат штетните ефекти. При органската постапка на ДНК екстракција се користи фенол/хлороформ за одделување на ДНК од протеините и од другите клеточни остатоци. ДНК е повеќе растворлива во водената фаза, која е одвоена од органската фаза со центрифугирање. Иако органските методи функционираат добро и се помалку скапи, силика методите користат помалку опасни материјали и повеќе се подложни на автоматизација (Pagan F,2011).

При постапката на дробење на целиот заб во процесот на екстракција, неопходна е употреба на обемна деминерализација. Оваа постапка е тешко да се



автоматизира, а воедно е зголемена и можноста за контаминација на материјалот. Внимателната селекција на забите, како и одбрани постапки на земање мостри, можат да доведат до обновување на пулпата, што не бара претходни чекори на автоматизација. Покрај тоа, ако цементот и дентинот се присутни во добра состојба на презервација, потенцијално, не се бара деминерализација, но ако е изведена, таа може да се направи во помали количини со што ќе се добие поедноставување на процесот и намалување на бројот на чекори на ракување.

### **1.10 Фактори што влијаат врз квалитетот на екстрахираната ДНК**

По смртта, клетките и органелите на организмот се распаѓаат, а со тоа се ослободуваат лизозомални ендонуклеази кои влијаат на дезинтеграцијата на ДНК молекулата. Исто така, деградацијата може да биде предизвикана и од егзогени нуклеази од микроорганизмите (коишто може да се размножат на ослободените хранливи материи по клеточната смрт) и инсектите од животната средина. По овие ензимски реакции следуваат неензимски или спонтани процеси на деградација на ДНК, кои, генерално, се многу побавни. Тие вклучуваат хидролитички реакции (на ниво на врската гликозидна база - шеќер, која може да резултира со појава на абазични делови, расцеп на ДНК или деаминација на базите на ДНК со секундарни аминокрупи), оксидативна реакции (индуцирана од O<sub>2</sub> или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, резултирајќи со модификации, како што се формирање на хидантоини кои може да го блокираат процесот на PCR) и раскинување на врските во ДНК молекулата (Paabo S, 2004; Al.aeddini R, 2010).

Степенот и начинот на деградација на ДНК молекулата е под директно влијание на факторите на животната средина и времетраењето на изложеност на овие фактори. Во овие фактори на надворешната средина се вбројуваат речната или морска вода, топлиот влажен воздух, оганот, нуклеарното зрачење, ултравиолетовото зрачење, високо киселата почва и хемиските агенци кои се користат во намерните обиди да се деградира ДНК кај воените жртви (Western

A.A,2003; Andelinovic S,2005; Mimura N,2012; Kubo S.I,2012; Holland M.M,2003; Budimlija Z.M,2003)

Квалитетот и квантитетот на добиената ДНК од забите зависи од неколку надворешни и индивидуални фактори. Од индивидуалните фактори посебно внимание се посветува на волуменот на пулпната комора, која е различна од типот на забот. Кај возрасни лица средниот волумен на пулпната комора изнесува околу 0,020 cc, при што најголема вредност е измерена кај третите молари 0,023 cc на максилата и 0,031 cc за мандибуларните молари (Yokoi T,1989). Сè уште не е испитувана корелацијата за тоа дали тежината на забите влијае врз количината на изолирана ДНК, па затоа би требало да се анализираат повеќе заби од иста индивидуа (Kaye N,2010). Како и кај другите ткива така и кај забите, квалитетот на изолирана ДНК зависи од надворешните влијанија - температурата, времето на смртта, степенот на влажност, бактериската и габична контаминација (O'Rourke D.H,2000; De Leo D,2000). Кај пулпата во посмртниот период, доколку се наоѓа во идеално сува средина, може да настане мумификација и со тоа телото да опстои подолг временски период, со што ќе се сочува и самата ДНК (Manjunath B.C,2011). Доколку пак истата пулпа се најде во влажна средина, многу брзо доаѓа до нејзина путрефакција, т.е. комплетно распаѓање и многу побрзо губење на генетската информација (Alonso A,2005; Higgins D,2013). Патолошките процеси на забите и претходните интервенции врз нив, влијаат и врз квалитетот на изолираната ДНК, поради тоа што на пример, кариесот овозможува контаминација на ДНК молекулата во пулпата. Затоа би требало да се анализираат здрави заби (Raabo S,2004; Yokoi T,1989).

Schwartz T.R. (1991) доаѓа до заклучок дека просечна количина високомолекуларна ДНК (HMW DNA) која се добива од забот изнесува 15-20 µg, и факторите што може да влијаат врз квалитетот и квантитетот на изолираната ДНК ги класифицира на следниов начин: 1. видот на забот (инцизив, канин, премолар, молар), 2. состојбата на забот пред екстракцијата (степенот на кариес и други патогени агенси), 3. начинот на екстракција на самиот заб (анатомска траума), 4. временскиот период што е поминат од екстракцијата на забот до моментот на

изолација, 5. возраста на донорот и 6. количината на пулпа присутна кај различни заби. Комбинацијата од овие фактори може да влијае во значителна мера врз количината на изолирана ДНК.

#### 1.11. Други методи на употреба на оралните ткива во постапката на хумана идентификација

Анализата на *rugae palatinae*, бразди што се наоѓаат до палатиналната страна на мекоткивата, исто така можат да бидат употребени во постапката на хумана идентификација, меѓутоа во оние случаи каде што не постои комплетно распаѓање на мекоткивните структури. Постапката се нарекува *ругоскопија* и таа претставува специфична техника на идентификација поради уникатноста на палатиналниот релјеф кај секој индивидуа.

Ругоскопијата е идентификациска техника врз основа на проучување и анализа на релјефот, формата, должината, насоката и спојувањето на моделот на палатиналните сртови или *rugae*. Класификацијата на *rugae palatinae* е предложена од Lysell L. (1995), а понатаму надоградена од страна на Thomas C.J. и Clarke T.J. (1983).

Палатиналните сртови се анатомските брчки или набори што се наоѓаат на горниот дел на непцето, веднаш зад горните предни заби и инцизивната папила, на двете страни на средината на палатумот (Shukla D, 2011). Фактот дека сртовите се присутни во текот на целот живот, почнувајќи од третиот месец од интратериниот развој, укажува на фактот дека тие се уникатни за секој поединец (вклучувајќи ги и близнаците) и се релативно добро заштитени од страна на мекоткивите заби, *bichat*-ово масно перниче и максиларните коски. Тоа би значело дека тие се помалку погодени од процесите на согорување и распаѓање. Како резултат на тоа, анализата на *rugae palatinae*, по својата вредност се споредува со постапката на идентификација од палецот (Nayak P, 2007). Сепак, една студија од Clarke T.J. (1989) тврди дека овие палатинални бразди се подложни на промени во количината, со значително зголемување на бројот на гребени по 35-годишна

возраст. Спротивно на тоа, друга студија (Lysell L, 1995) известува за намалување на бројот на браздите по 23-годишна возраст.

Според Ohtani и др. (2008), три ситуации ја комплицираат идентификацијата врз основа на палатиналните бразди: промени во висината на овие бразди, присуство на рамни или лошо акцентирани гребени, како и нивно отсуство кај одредени случаи. Сепак, други, дополнителни елементи може да бидат употребени при оваа анализа, како што е анализата на инцизивната папила, формата на шарата од средината на палатумот, како и анализа на *torus palatinus*, доколку е присутен. Авторот завршува укажувајќи дека точноста на идентификацијата врз основа на анализата на *rugae palatinae* изнесува 94%. Сепак, поради сето горекажано, овој метод треба да се употреби како постапка на идентификација во оние случаи каде што се исцрпени другите идентификациски постапки.

Хеилоскопијата претставува уште еден метод што се употребува во хуманата идентификација. Таа вклучува анализа на издигнувања и депресиите на усниците, кои формираат карактеристична шара позната како отпечаток од усните (Siva B, 2001). Исто како отпечатоците од прстите и отпечатоците на усните се постојани и затоа се уникатни за секој поединец (освен монозиготните близнаци) (Caldas I.M, 2007). Анализата на Tsutsikachi Y и Suzuki (1974) која е извршена врз 200 индивидуи и кај кои е направена анализа на шарата на усните, укажува на уникатност кај сите 200 испитаници. Со тоа се потврдува тезата дека отпечатокот од усните може да биде употребен со голема сигурност во постапката на хумана идентификација. Направена е класификација врз основа на голем број отпечатоци на усните од страна на Caldas I.M (2007), кој опишува 10 видови отпечатоци од усните, означени со букви од А до Ј, при што со големи букви се означуваат отпечатоците од горната усна, а со мали букви отпечатоците од долната усна.

Хеилоскопијата, исто така, прави анализа и на усната анатомија, со оглед на нивната дебелина и позиција. Усните може да биде хоризонтални, издигнати или спуштени, а според нивната дебелина, тие можат да се класифицираат во една од следните четири групи: тенки усни (карактеристични за европската популација), средни усни (од 8 до 10 mm, и тие се најчест тип), дебели или многу дебели усни

(обично има и инверзија на самата усна и е најчесто присутна кај црнечката популација), и со мешан тип усни (обично присутни кај ориенталната популација). И двете техники, хеилоскопијата и палатоскопијата се корисни техники во постапката на хумана идентификација: едноставни се за изведување не бараат комплексен инструментариум (Sharma P. et al., 2009). Истиот автор завршува тврдејќи дека хеилоскопијата е корисна за идентификација на живите индивидуи, додека палатоскопијата е успешно користена техника за идентификација на починати индивидуи.

## 2. Литературен преглед

## 2. Литературен преглед

Идентификацијата на човекот е едно од главните полиња на проучување и истражување во форензичката наука затоа што се занимава со човечкото тело и се стреми кон одредување на човечкиот идентитет. Револуцијата на ова поле започнува во 1953 година од страна на Вотсон и Крик (Watson & Crick, 1953), кои ја откриваат двојната спирална структура на ДНК, одговорна за генетското наследство на човечките суштества, и која доведе до значајни промени во речиси сите области на науката. Ова откритие претставува основа за развој на техники што ќе овозможат карактеризирање на индивидуалноста на секој човек врз основа на ДНК секвенците.

Три децении подоцна, Jeffreys и др. (1985) создаваат радиоактивни молекуларни сонди кои можат да ги препознаат високоваријабилните региони на ДНК. На тој начин се утврдуваат одредени модели на секоја индивидуа кои се именувани како ДНК отпечатоци (DNA fingerprints). Моменталните тестови што се изведуваат за одредување на ДНК профилот се сосема сигурни, се прифаќаат како легални докази во судовите, како во постапките за одредување на татковството така и во постапката на идентификација на човек.

Извлекувањето на ДНК од човечкото тело претставува тешка задача и зависи од бројни фактори на животната средина, како и од постапката на изолација. Испитувањата покажаа дека изолираната ДНК од тврдите ткива, како коската и забите, е најстабилна дури и по распаѓање на ткивата (Boles T.C, 1995). Во форензичките случаи на идентификација, каде што човечките остатоци се екстремно оштетени или деградирани, забите и коските се честопати единствените извори на ДНК. Протоколите што се користат за земање примероци и вадење на забни ткива се претежно слични со оние што се користат за коските и покрај фактот дека овие две ткива се морфолошки и биохемиски различни (Dobberstein R.C, 2008). На пример, протоколите за заби користени од страна на Меѓународната комисија за исчезнати личности (ICMP-International Commission of Missing Persons), се идентични со оние што се користени за коските, со исклучок

на тоа дека надворешната површина е отстранета при подготовката на коската, но не и при подготовката на забот (Parsons et al. 2007).

### 2.1. Различни дентални ткива во постапката на хумана идентификација

Со цел да се оценат различни дентални ткива како извор на ДНК во форензичките анализи, Malaver и Yunis, (2003) спроведуваат студија во која 20 заби се обезбедени од неидентификувани тела закопани во 1995 год. а ексхумирани во 2000 год. со што се анализираа 45 примероци на ДНК (5 од пулпа, 20 од дентин и 20 од цемент). Пулпата се обезбеди преку сечење на забите по надолжната оска и со внимателна изолација со посебни стерилни кирети. По изведената декалцификација со EDTA, заради ослободување на врзаната ДНК за хидроксиапатитот, беше екстрахирана ДНК од минералното ткиво (дентин и цемент). Резултатите покажаа дека примероците на ДНК обезбедени од пулпата создаваат најсилни сигнали за PCR амплификација, додека оние примероци на ДНК од дентинот и цементот покажуваат послаби сигнали на амплификација и меѓусебно се многу слични едни на други.

Higgins и др. (2011) вршат изолација на ДНК од цементот на забот, односно од ткивото коешто се смета дека од сите цврсти забни ткива дава најголема количина на амплификабилна ДНК. При оваа анализа авторот врши комплетно отстранување на емајлот на забот бидејќи, според него, тоа минерализирано ткиво придонесува за инхибиција на PCR постапката, поради високиот процент на неоргански материји (96%). Количината на јадрената (нуклеарна) ДНК којашто ја добива од цементот на забот изнесува 0,28 - 173,57 ng/mg. Притоа, се забележува дека не постои статистичка значајност помеѓу хронолошката возраст и количината на изолирана ДНК, иако се забележа благ тренд на намалување на количината на ДНК со зголемување на возраста. Половата селекција, исто така немаше статистичка сигнификантност врз количината изолирана ДНК. Покрај тоа, авторот ги анализира и техниките на деконтаминација на коренот на забот, користејќи



белило во концентрации 2-4%, за временски период 1-5 мин. Притоа, кај корените третирани со белило во поголема концентрација и за подолг временски период, се забележа редукција во присуството на цементобластите на коренската површина, а на цементот не се забележаа никакви структурни промени. Количината на изолирана ДНК кај корените на заби третирани со белило, покажа помали вредности во споредба со добиената количина кај забите коишто не беа третирани со средство за деконтаминација.

Corte-Real и др. (2008) прават анализа за можноста за изолација на ДНК од заби кои се ендодонтски третирани и нивна употреба во постапката на хумана идентификација. Тој ги испитува забите што се ендодонтски третирани, т.е. забите кај кои е отстранета пулпата на забот и внатрешниот слој од дентинот, односно материјалот кој е најголем извор на јадрена ДНК. Деловите од одонтбластичните продолжетоци што остануваат заробени во дентинот, се добар извор на mtDNA. Авторот заклучува дека токму тој дел од коренот на забот дава доволна количина ДНК и кај заби кои се ендодонтски третирани, со што е возможно успешно STR профилирање и добивање на можност за индивидуална генетска идентификација.

Напаока и др. (1995) испитуваат ДНК екстрахирана од 50 заби (и од пулпа и од цврсти забни ткива). Тие доаѓаат до заклучок дека количината на ДНК добиена од пулпата варира од 3 до 40  $\mu\text{g}$ , и дека не постои корелација помеѓу периодот на складирање и количината на добиената ДНК. Тие ја испитуваат количината на добиена ДНК од цврстите забни ткива при употреба на различни концентрации на раствори за декалцификација. ДНК обезбедена од денталната пулпа е со висока молекуларна тежина, со што се овозможи анализа со мултилокусни проби или PCR техники. Од друга страна, материјалот обезбеден од цврстите забни ткива покажа задоволителни резултати добиени само со PCR техника.

Во студијата на Potech и др. (1992) тоталната количина на геномична ДНК обезбедена од денталните примероци варира од 6 до 50  $\mu\text{g}$  ДНК. Резултатите се добиени од ДНК, екстрахирана од денталната пулпа и не покажуваат никаква разлика во споредба со моделите на добиена ДНК изолирана од примероци на

крв или бели дробови. Во своите испитувања, Potech изведува јадрена *dot-blot* хибридизација за определување на полот со биотинилатни репетитивни ДНК проби рНУ 2.1. Притоа, авторот правилно го одредува полот во сите случаи при што беше употребена количина од 50 до 100 ng на екстрахирана ДНК од пулпата.

Помеѓу повеќето случаи опишани во литературата за изолација на ДНК од забите, еден од поважните претставува извештајот објавен од Sweet и др. (1995). Во овој случај се врши испитување на човечки остатоци кога жртвата на убиството е целосно согорена и телото е комплетно карбонизирано, намалено за околу 25% од неговата оригинална големина, и не постои можност за изолација на ДНК со вообичаените методи. Сепак, преку сочуваниот нееруптиран трет молар се изврши екстракција на ДНК преку денталната пулпа, (добиената количина е 1,35 µg), што беше одличен извор на високо молекуларна геномична ДНК. Rothwell, (2001) заклучува дека забите се најотпорниот дел од човечкото тело што може да биде изложен на температура од 1600°C без притоа да дојде до значајно губење на неговата микроструктура.

Ginther и др. (1992) ја испитуваат митохондријалната ДНК која е екстрахирана од заби кои се чуваат за време од 3 месеци до 20 години. Од донорите на забите и/или нивните мајчини роднини обезбедиле клетки од букалната слузница или крвни клетки, од кои е екстрахирана mtDNA. Со ензимска амплификација и директно секвенционирање на околу 650 нуклеотиди од два високополиморфни региони на mtDNA, обезбедиле идентични секвенци за меѓусебна компарација на изолираната ДНК од забот и свежа ДНК. Добиените резултати покажале дека забите претставуваат извонреден извор на mtDNA со висока молекуларна тежина која може да биде извонреден материјал за идентификација и при распаднати човечки остатоци.

## **2.2.   Анализа на техниките за изолација на ДНК од заб**

Smith и др. (1993) прават испитување и компарирање на различните техники што се употребуваат за добивање на доволна количина ДНК што ќе биде употребена

во постапката на хумана идентификација. Тој прави анализа на различните дентални ткива како што се дентинот, цементот и пулпата, како материјал од кој се добива доволна количина јадрена (нуклеарна) и митохондријална ДНК и материјал за изведување на радиографските, биохемиските и ултраструктурни форензички студии. Авторот ги анализира техниките на изолација на ДНК од заб, задржувајќи се претежно на компарација помеѓу техниката на дробење на целиот заб со техниката на хоризонтално раздвојување на забот. Притоа се споредувани квантитетот и квалитетот на човечката ДНК обезбедена од секој заб посебно, како и едноставноста на изведената техника. Дробењето на забот е едноставна техника што се изведува само за неколку минути и дава поголема количина ДНК со поголем степен на деградација. За разлика од неа, постапката на хоризонтално раздвојување е подолга, временски трае од 15 до 30 мин за секој заб и дава помала количина ДНК, меѓутоа е со помал степен на деградација отколку техниката со целосно дробење на забот. Исто така, и Nigam и др. (2014) прават анализа на различните техники што се користат за изолација на ДНК од забот. Авторот ги споредува техниките на хоризонталното и вертикалното раздвојување на забот, ендодонтскиот третман, и доаѓа до заклучок дека постапката на дробење на забот по претходно негово ладење (cryogen grinding), претставува супериорна техника за добивање на доволна количина ДНК која ќе биде употребена во понатамошните анализи. При постапката се користи течен азот за ладење на забот, а потоа со употреба на сила, негово дробење на многу ситни парчиња, со што се добива забна прашина. Количината на добиена ДНК изнесува 30,9  $\mu\text{g}$  по заб, што е повеќе од доволно за изведување на понатамошните постапки на амплификација и квантификација. Оваа техника има предност во однос на другите техники поради тоа што обезбедува изолација на примероци во затворен систем и во стерилни услови, и, исто така, спречува вкрстена контаминација бидејќи компонентите на уредот може лесно да се чистат и да се стерилизираат помеѓу анализите. Ова е спротивно од заклучокот дека техниката на хоризонтално сечење на забот дава најдобри резултати (Shiroma et al. 2004). Техниката е едноставна, брза и релативно конзервативна, овозможувајќи зачувување на најголемиот дел од надворешната површина за забот. Hervella и

др. (2014) исто така се сложуваат со овој наод тврдејќи дека хоризонталното раздвојување на забот во пределот на вратот, поточно под делот на емајлово-цементната граница и влез во пулпната комора со ендодонтските инструменти претставува оптимален, недеструктивен метод за обезбедување на ДНК од забот.

Tsuchimochi и др. (2002) ја тестираат Chelex-100 хелатната смола за изолација на ДНК од денталната пулпа. За анализа на овој метод, екстрахираните заби се согорувани за временски период од 2 мин. на температура од 100°C, 200°C, 300°C, 400°C и 500°C. Кај сите примероци што беа спалени на температура до 300°C, екстрахираната ДНК можеше да биде типизирана и амплифицирана, додека кај оние примероци што беа спалени на температура над 400°C, немаше можност за добивање на ДНК. Авторот заклучува дека екстракцијата на ДНК од денталната пулпа со користење на хелатната смола, обезбедува висококвалитетни примероци на ДНК за PCR амплификација.

Во својата студија Tilotta и др. (2010) ги споредуваат двата метода на екстракција на ДНК од забот и тоа со кршење на забот (криоген метод) и со трепанација на забот и екстракција на пулпата со класични ендодонтски инструменти. Притоа, беше мерена количината на добиена ДНК и нејзиниот квалитет. Кај методот на дробење на забот, кај 78% од случаите немаше доволно материјал за амплификација, а само кај 9% од испитаните заби можеше да се обезбеди комплетен профил на изолираната ДНК. Спротивно на тоа, кај забите што беа подготвени со трепанација, комплетен профил на ДНК беше успешно направен кај 75%, а само кај 3% од случаите беше неуспешна екстракцијата и изолацијата на ДНК. Испитувањето покажа дека методот на трепанација дава супериорни резултати во однос на количината на ДНК и квалитетот на генетските профили. Покрај тоа, овој метод е конзервативен, со што се сочувува морфологијата на забот за понатамошни анатомски, радиолошки и биохемиски анализи.

### 2.3. Влијание на надворешните фактори врз степенот на изолација на ДНК

Schwartz и др. (1991) го испитуваат влијанието на надворешната средина врз квалитетот, интегритетот и обновата на ДНК екстрахирана од денталната пулпа. Авторот ги анализира условите што може да влијаат врз квалитетот на добиената ДНК, и тоа температурата (4°C, 25°C, 37°C и согорен заб), варијации на рН (3,7 и 10,0), влажноста (20%, 66% и 98%), видот на почва во кои забите беа закопани (песок, влажна почва, потопување во вода, закопување на отворено) и периодот на инхумација (од една недела до шест месеци). Schwartz доаѓа до заклучок дека условите на надворешната средина што се испитуваат, не влијаат врз способноста да се добие високомолекуларна човечка ДНК од денталната пулпа. На температура од 4°C може да се добие квалитетна ДНК дури и по 6 недели. На 25°C може да се изолира ДНК дури и по 19 години, а на температура од 37°C може да се добие високомолекуларна ДНК до 6 месеци. Количината на ДНК што може да се добие од заб со просечна големина изнесува 15-20µg. Слично испитување за влијанието на факторите на средината врз презервацијата на ДНК молекулата прават и Burger и др. и се доаѓа до заклучок дека сувата средина, ниската температура, неутралната и слабоалкалната средина и отсуството на микроорганизми ја фаворизираат презервацијата на ДНК молекулата. Чувањето на забите на собна температура за краток временски период не влијае врз количината на ДНК, додека нивниот престој во надворешната средина за подолг временски период, значително ја намалува количината на амплификабилна ДНК. Pfeiffer H. и др. (1999) го проучуваат влијанието на условите на надворешната средина врз процесот на деградација на ДНК молекулата, поточно испитувањето се спроведува кај заби што се закопани во земја, и тоа кај заби кои се здрави и заби кај кои има комуникација со пулпната комора. Авторот забележува дека забите кај кои постоеше комуникација со пулпната комора, т.е. забите што беа изложени на влијанието на надворешните агенси, покажаа сигнификантна деградација за временски период од 18 недели, додека 20 здрави заби што беа закопани за временски период од една година, покажаа исклучителна

презервација на генетскиот материјал, односно беше возможна амплификација на mtDNA кај сите испитувани примероци.

TC Boles (1995) успева успешно да екстрахира ДНК од заби кои се закопани за време од 80 години. Тој потврдува дека е можно да се утврди идентитетот на една индивидуа со голема сигурност доколку располагаме со многу мали вредности на ДНК, дури и со минимална количина од 1 ng. Во своето испитување тој доаѓа до заклучок дека количината на ДНК што може да се добие од моларите со големина на пулпната комора од 0,023-0,031 cc е скоро 15-20 µg.

Alvarez и др. (1996) вршат анализа на пулпата што е екстрахирана од заби кои се изложени на различни услови на околината. Притоа, авторот заклучува дека забите потопени во вода даваат најмала количина на ДНК за понатамошна анализа. Забите изложени на надворешните влијанија обезбедуваат подобри резултати отколку забите закопани во песок и земја, но дури и во овие ситуации се обезбедуваат добри резултати. Температура до 4 °C има минимално влијание врз добиените резултати. Позитивни резултати се обезбедуваат во повеќето случаи каде што има висока температура (400°C за време од 2 мин), т.е. изложеноста на повисоки температури за подолг временски период негативно се одразува на добиената количина ДНК. Позитивни резултати за типизирање за XY хомологниот ген амилогенин и STRs се обезбедија кај половина од забите по временски период од 10 до 30 год.

Се прави и анализа на пулпата заради одредување на полот кај индивидуата (Nirmal et al. 2004). Нирмал прави испитување за да го одреди посмртниот временски период кога пулпата сè уште би можела да се употреби во постапката за одредување на полот, притоа нотирајќи ги влијанието на температурата и влажноста на средината. По спроведеното испитување, авторот доаѓа до заклучок дека одредувањето на полот од пулпата е возможно до периодот на четвртата недела по смртта. Се забележува значителен пад на половиот хроматин во клетките од пулпата во периодот од 6 до 24 часа по смртта. Авторот завршува со податокот дека деградацијата на пулпата се одвива право пропорционално со зголемувањето на температурата и зголемувањето на влажноста на средината.

Vemuri и др. (et al. 2012) спроведуваат анализа за влијанието на надворешните услови и количината на изолирана ДНК што ќе биде употребена во постапката за хумана идентификација. Тој во своето испитување за одредување на полот со користење на методот PCR, употребува заби кои се поставени во различни услови на околината и тоа заби изложени на различна температура 100°C, 200°C, 300°C и 400°C, потоа заби потопени во солена вода за временски период од 20 до 36 дена и заби закопани во земја на длабочина од 30 см. Од 15 примероци што беа употребени за испитувањето, кај 13 беше изолирана ДНК. Воопшто не можеше да биде изолирана ДНК само кај примероците што беа изложени на температура од 300°C и 400°C. Авторот заклучува дека забите се сигурен извор за определување на полот дури и кога се изложени на различни еколошки услови, освен за време на екстремно високи температури. Оттука, определувањето на полот со PCR претставува најсигурен метод во сите оние случаи каде што има значително оштетени и распаднати тела.

Remualdo и др. (2004) ја оценуваат PCR амплификацијата на ДНК од извадени заби изложени на топлина (200°C, 400°C, 500°C и 600°C) за време од 60 мин. при што се тестираат три различни методи на екстракција (органиска, амониум ацетат/изопропанол и силикатниот метод). При употреба на органискиот метод за екстракција на геномична ДНК, кај 50% од примероците беше возможна амплификација и тоа кај оние примероци што беа изложени на пониски температури (200°C и 400°C). Кај оние изложени на повисоки температури (500°C и 600°C), изопропанол/амониум ацетат методот на екстракција даде подобри резултати, главно за екстракција на митохондријална ДНК.

Sowmya и др. (2013) прават анализа на морфолошките промени на забите кои се јавуваат по потопување во различни киселини и притоа одредуваат од која група заби се добива најголема количина ДНК. Тој ги потопува забите во хипохлорна киселина, сулфурна киселина и нитритна киселина, односно во киселини што вршат силна декалцификација на забот. Екстракцијата на ДНК се изврши со фенол хлороформ методот и притоа резултатите покажаа дека хипохлорната киселина има најдеструктивен потенцијал врз цврстите морфолошки структури на

забот. Доволна количина ДНК се обезбеди само во првите два часа од потопувањето во киселините и авторот заклучува дека постои обратно пропорционален однос помеѓу времето поминато во растворот на киселина и количината екстрахирана ДНК.

#### 2.4. Млечните заби и изолацијата на ДНК

Karkhanis и др. (2009) вршат анализа на млечните заби, поточно ја анализираат појавата на макроскопските и микроскопските промени што се јавуваат кај млечните заби кога се изложени на многу високи температури. Во студијата, исто така, се анализираат промените на бојата на млечните заби со нивната состојба (фрагилноста) по изложувањето на високите температури, заради одредување на правилна постапка за нивно испитување и можност за одредување на степенот на температурната експозиција врз основа на состојбата на забот. При оваа анализа се употребени 90 заби изложени на температура од 100°C до 1100°C, во временски период од 30 мин. Испитувањето на морфолошките промени е вршено со SEM микроскопија, додека посебни колориметриски испитувања се изведоа за да се одредат промените на бојата од термалниот стрес. Заклучокот е дека термалните промени кај млечните заби се појавуваат на пониски температури отколку промените кај перманентните заби. Исто така се забележа дека млечните заби што се изложени на повисоки температури се повеќе кршливи и покажуваат тенденција на фрагментација по минимална изложеност на термален стрес.

Анализа на млечните заби и нивна употреба во постапката за одредување на полот прават Batteredati и др. (2013). Во својата студија Batteredati ги изложува забите на различни услови на надворешната средина и го следи нивното влијание врз презервацијата на пулпата кај млечните заби која ќе претставува извор на ДНК и ќе биде употребена во постапката за одредување на полот преку изведување на PCR. За своето испитување тој користи 120 примероци на заби поделени во 4 групи, од кои во првата група забите се поставени во вода, а во другите три групи примероците се закопани во различни типови почва (сува средина), во временски



период од 2 месеци. По изведената изолација на пулпата од сите примероци и изведената PCR амплификација со цел одредување на полот, се доаѓа до сознание дека кај забите во првата група, кои беа изложени во вода, има 86% на успешност во постапката на одредување на полот, за разлика од другите три групи каде што има 100% успешност. Авторот заклучува дека забите чувани во сува средина може да послужат како подобар извор на ДНК за разлика од забите чувани во влажна средина.

## **2.5. Забот како ткиво во постапката на хумана идентификација**

Одредување на полот преку анализа на забите спроведуваат Otag и др. (2009) при што авторот во своето испитување врши одонтометрична анализа на канините како во горната, така и во долната вилица. Студијата е изведена врз 220 возрасни индивидуи од двата пола, и притоа е анализиран мезиодисталниот дијаметар на канинот, лабиолингвалниот дијаметар на коронката и мерено е интерканиното растојание во двете вилици. Резултатите за одредување на полот преку изведување на одонтометриски анализи на канинот, покажале точност од 82,73% за горната вилица, и 81,82% точност за одредување на полот во долната вилица. Авторот заклучува дека овие анализи претставуваат само насока врз основа на која со понатамошни молекуларни испитувања би можело со 100% сигурност да се утврди полот кај починатите индивидуи. Gajendra и др. (2010) прават испитување за одредување на полот преку анализа на пулпата и тоа преку идентификација на флуоресцентното Y-тело. Таа анализира 60 заби поделени во три групи, од кои во првата група пулпата е анализирана непосредно по вадење на забот, а кај другите две групи во временски период од еден и пет месеци. Авторот заклучува дека постапката за одредување на полот преку анализа и идентификација на Y флуоресцентното тело претставува едноставна, сигурна постапка со 100% точност во временски интервал непосредно по смртта, односно во првиот месец пост мортем. Одредување на полот преку анализа на пулпата изведуваат и Galmades и др. (2010). Тој врши одредување на полот преку анализа на половиот хроматин или т.н. Барово тело, што во суштина претставува

кондензација на хроматин присутен во јадрото на клетките на женските индивидуи. Ова анализа ја спроведува преку испитување на пулпата од 40 екстрахирани заби и тој утврдува дека овој тест има 100% точност во постапката на одредување на полот. Авторот доаѓа до заклучок дека анализата на Баровото тело, т.е. анализата на половиот хроматин претставува златен стандард во постапката за одредување на полот во случаите на високо деградирани примероци. Слично вакво испитување прави истиот автор (Galmades I.S, 2011) меѓутоа сега тој го анализира влијанието на температурата на пулпата и можноста за одредување на полот преку половиот хроматин. За испитувањето тој користи 50 заби поделени во 5 групи, изложени на температура од 200°C, 400°C, 600°C, 800°C и 1000°C за време од 5 мин. Авторот пронаоѓа дека само кај забите изложени на температура од 200°C и 400°C постои можност за изолација на Барово тело, со цел одредување на полот. Кај сите други примероци не можело да се пронајде оваа кондензација на хроматин, со што се доаѓа до заклучок дека температурата повисока од 400°C директно влијае на уништувањето на половиот хроматин, а со тоа се намалува можноста за одредување на полот преку анализа на пулпата.

Треба да се спомене дека многу важен протеин кој има битна улога во постапката за одредување на полот е протеинот амилогенин, кој спаѓа во групата екстрацелуларни матрикс-протеини и кој има битна улога во развојот на емајлот на забот. Емајлот што е во развој има 30% протеини, од кои 90% е амилогенинот. Други значајни протеини во емајлот на забот се амелобластините, енамелините и туфтелини (Wikipedia,http). Кодирачките гени за протеинот амилогенин се присутни како на X така и на Y-хромозомот. AMEL гените се хромозомски специфични, имајќи 106 bp за X и 112 bp за Y-хромозомот. Ова претставува базата за одредување на полот при анализа на ДНК молекулата. Поради тоа, при поставата на продуктите на амплификација на агарозен гел, машките примероци ќе дадат два столба на агарозниот гел, еден на фрагментот на 106bp, а другиот на 112 bp (фрагмент), додека женските индивидуи ќе покажат само еден столб (Muruganandhan, 2011). На овој начин амилогенинот се користи во постапката за одредување на полот кај непознати индивидуи. Понекогаш мутации на Y

добиените фрагменти од гените (делиции и други варијации) може да резултира со неуспех во постапката на амплификација на Y алелите, резултирајќи со погрешна идентификација на биолошките примероци, т.е. машките примероци се презентираат како женски. Фреквенцијата на појава на овие грешки во постапката на одредување на полот е доста ниска и тоа 0,006% кај мажите и 0,015% кај жените (Muruganandhan, 2011). Може да се заклучи дека златен стандард во постапката на одредување на полот претставува Y-STR и SRY (sex-determining regions of Y) тестовите, меѓутоа овие тестови за одредување на полот треба да се изведуваат заедно со AMEL тестовите (Steinlechner M, 2002).

Во постапката на хумана идентификација многу битен податок е одредување на возраста на починатиот. Забот како ткиво што се користи во оваа постапка може во голема мера да го олесни одредувањето на возраста. Dias и др. (2010) ги испитуваат инкрементните линии што се наоѓаат во цементот на забот и преку анализа на овие линии со голема точност вршат одредување на возраста. Авторот укажува дека одредувањето на возраста кај помладите индивидуи до 12-годишна возраст и не е така тешко, врз основа на анализа на коренот и коронката на забот, бидејќи во различен временски период различен е степенот на развојот на забот (Panchbhai 2011). Меѓутоа, во понатамошниот тек од животот, кога е завршен комплетно развојот на забот, одредувањето на возраста не е така едноставна постапка. За одредување на хронолошката возраст авторот прави анализа на цементот на забот, минерално ткиво кое во текот на целиот живот е во фаза на постојана апозиција и ремоделирање, и токму мерењето на неговата дебелина може да помогне во одредување на возраста. Хистолошката анализа на квалитетот и квантитетот на инкрементните линии на цементот, т.е. депозити на цемент по должината на коренот на забот, во голема мера може да помогнат во одредување на хронолошката возраст. Авторот заклучува дека употребата на инкрементните линии за одредување на возраста кај индивидуите е постапка на која со сигурност можеме да се потпреме, меѓутоа правејќи ваква анализа само кај здрави заби, а не со присутни пародонтални оштетувања, и тоа анализирајќи ги депозитите на ацелуларниот цемент присутни во цервикалната или апикалната третина од коренот на забот. Avadhani и др. (2009) тврдат дека методот на

одредување на возраста преку анализа на инкрементните линии претставува сигурен метод со точност од 94,73%, односно грешката при одредување на возраста изнесува од 2 до 3 години. Meini и др. (2008) вршат компарација на трите методи за одредување на возраста и тоа: 1. методот на Lamendin (испитување на транспарентност на коренот и пародонталното воспаление), 2. методот на Bang и Rahm (одредување на транслуценција на коренскиот дентин) и 3. методот на TCA (tooth cementum annulations) или анализа на депозитите на цементот на забот. Методот на Lamendin обезбедува најпрецизни резултати кај младата и старата популациска група, додека анализата на депозитите на цемент даваат најдобри резултати кај групата испитаници од средната возраст.

Анализа за одредување на возраста преку испитување на забите врши и Manas B. (2011). Тој изведува студија анализирајќи ги физиолошките промени што настануваат со текот на времето кај забите користејќи ги критериумите на Gustafson (1947), како што се: атрицијата на забите, периодонталниот губиток на коска, коренската ресорпција, транслуценцијата на коренот, апозицијата на цемент и апозицијата на секундарен дентин. Авторот доаѓа до заклучок дека помеѓу вредностите на вистинската (хронолошката) возраст и добиената возраст постои статистички сигнификантна разлика, со исклучок на групата на заби од 40 до 50-годишна возраст. Foti и др. (2001) пак од друга страна го користат методот на Ламендин (Lamendin 1992; Vaccino 1999) којшто за одредување на возраста ги користи следниве критериуми: гингивалната регресија и транспарентноста на коренот на забот. Тој забележува дека и овој начин на одредување на возраста како и претходниот не е сигурен, а посебно за пациенти во поодминати години (по петтата деценија) кај кои изразеноста на гингивалната рецесија е зголемена.

Одредувањето на времето на смртта е многу важен елемент во постапката на форензичката идентификација. Vavpotic и др. (2009) прават токму таква анализа на одредување на времето на смртта преку броење и анализа на одонтобластите во пулпната комора. Бидејќи клетките на пулпата, во која спаѓаат и самите одонтобласти, се исклучително зависни од кислород, непосредно по смртта присутната хипоксија доведува до нивна лиза и разградување. Клетките на пулпата по смртта се заштитени во временски период од 96 до 336 часа, или од 4

до 14 дена, во зависност од временските услови. Авторот заклучува дека доаѓа до изумирање на 130 одонтобласти на  $\text{mm}^2$  за временски интервал за секој нареден час кај групата заби поставени на собна температура (температура од  $23^\circ\text{C}$ ), односно 120 одонтобласти на  $\text{mm}^2$  со секој нареден час кај групата заби поставени во фрижидер (температура од  $4^\circ\text{C}$ ). Процентото време за преживување на одонтобластите со 95% интервал е  $110,03 \pm 14,12$  h или  $4,58 \pm 0,59$  дена на собна температура, а  $111,53 \pm 9,35$  h или  $4,64 \pm 0,38$  дена на температура од  $4^\circ\text{C}$ . Како што се гледа од анализата на податоците, може да се заклучи дека пониските температури не го забавуваат значително распаѓањето на одонтобластите. Авторот завршува со заклучок дека непосредно по смртта доаѓа до изумирање на одонтобластите, така што веќе во шестиот ден не постои витален одонтобласт во пулпната комора. Студијата на Caviedes-Busheli (2006) укажува на 41% виталност на клетките на пулпата 24 часа по смртта.

### **3. Цели на дисертацијата**

### 3. Цели на дисертацијата:

Напредокот на современата технологија во сите гранки на денешното живеење, а исто така и во медицината, резултираат со сè пософистицирани апарати и технологии кои нудат нови можности за подобрување на постојаните тераписки методи и методи на идентификација. Со откривањето на ДНК молекулата и нејзината примена во постапката за идентификација на индивидуите, се наметна потребата за одредување на протоколи и параметри врз основа на кои ќе може на најлесен, најбрз и најсигурен начин да се утврди идентитетот на индивидуата употребувајќи го забното ткиво. Оттука произлегоа и целите на овој докторски труд:

1. Да се испита од која група заби се добива најголема количина ДНК, т.е. да се одреди дали постои корелација помеѓу тежината на забот и количината на екстрахирана ДНК.
2. Да се испита од кое забно ткиво се добива квалитативно и квантитативно поголема количина ДНК, т.е. дали од пулпата или од цврстите забни ткива (дентин и цемент).
3. Да се утврди влијанието на надворешните услови на средината врз квалитетот и квантитетот на екстрахирана ДНК, односно да се утврди влијанието на овие фактори врз степенот на деградација на ДНК молекулата.
4. Да се испита дали е возможна изолација на ДНК од млечните заби и да се испита како влијае физиолошката ресорпција на коренот на забот врз количината на изолирана ДНК, а исто така да се утврди и влијанието на присутните бактериски соеви во кариозните лезии врз количината на изолирана ДНК.

Забите се одличен извор како на нуклеарна така и на митохондријална ДНК, и успешно се користат во судската идентификација на компромитирани човечки скелетни остатоци. Јасно е дека сеопфатното разбирање на структурата на забот и составот, како и на процесот на дијагенеза во забите, е од клучно значење за утврдување на локацијата на ДНК во забите по смртта. Тоа ќе овозможи посоодветна селекција на примероците за земање мостри и соодветни техники за нивно изведување. Целното земање мостри и внимателниот избор на соодветни протоколи на деконтаминација и екстракција, уште повеќе ќе ја зголемат вредноста на забите како извор на ДНК за употреба во хуманата идентификација.

Се очекува истражувањата од оваа студија сериозно да учествуваат во прогресија на научноистражувачката мисла. Со напредокот на науката, овие научни сознанија се надградуваат со нови идеи и можности со кои посуптилно ќе се навлезе во структурата на ДНК молекулата и ќе се одреди влијанието на сите оние фактори што учествуваат во нејзина деградација. Докторскава дисертација дава можност да се отворат нови научноистражувачки идеи кои ќе потпомогнат за нови научни сознанија и развој на науката, не само на полето на форензичката стоматологија туку воопшто во форензичката научна област.



## **4. Материјал и метод**

#### 4. Материјал и метод

Истражувањето *Форензичка ДНК анализа на забите* претставува проспективна аналитичка студија имплементирана во периодот 2014-2015 година. За реализација на поставените цели на студијата, спроведено е четириделно истражување во кое беа опфатени 138 екстрахирани заби, без поголеми кариозни оштетувања (ин витро студија), кои се екстрахираа на Клиниката за орална Хирургија при Универзитетскиот стоматолошки клинички центар – „Св.Пантелејмон“ во Скопје. Дел од испитувањата, и тоа 153 постапки на изведена изолација на ДНК молекулата и нејзина квантификација се реализираа на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија при Медицинскиот факултет, УКИМ во Скопје.

##### 4.3. Изолација на ДНК молекулата

Постојат неколку методи што можат да се користат за изолација на ДНК од различни биолошки материјали. Методот што ние го користиме за изолација на ДНК од забите е метод на изолација со магнетни честички како цврста фаза за врзување на ДНК молекулата. Изолацијата на ДНК молекулата од забниот материјал се изведе со Prepfilер Kit од ABI™ (сл.3).



Сл.3 Prepfilер Kit на Applied Biosystem за изолација на ДНК

Стандардната постапка на екстракција на ДНК од клетките се изведе по нивно разорување, а се базира на различните карактеристики што ги имаат ДНК, протеините и другите конституенци. Оваа постапка се одвива преку дигестија на клетките со протеиназа К во присуство на метален хелатор (EDTA) и детергент како SDS (натриум додецил сулфат), по што следува течно-течна екстракција на растворот на ДНК со фенол и преципитација на ДНК со алкохол. Со оваа постапка се добива голем принос на ДНК со големина од 100 до 150kb која е адекватна за понатамошни анализи како *полимераза верижна реакција* (PCR амплификација), секвенционирање итн.

Новите техники на изолација (за разлика од оние на старата постапка на органска изолација) на ДНК се базираат на цврстофазна екстракција (SPE - solid phase extraction). Со овој метод се употребуваат колони исполнети со силика (или некоја друга цврста фаза) која селективно ги врзува (адсорбира) нуклеинските киселини (ДНК или РНК) во зависност од рН средината и концентрацијата на соли во пуферот (во нашиов случај цврстата фаза за врзување на ДНК се магнетните честички). Овие колони, како и сите пуфери што се употребуваат за изведување на постапката, доаѓаат во облик на комерцијални китови, а изолацијата на ДНК се изведува според инструкциите на производителот. Предноста на овие китови се состои во тоа што, за разлика од стандардната постапка, целиот процес на изолација на ДНК ќе се одвива многу полесно и побрзо, но, освен високата цена како недостатоци се и помалиот принос на ДНК. Генерално, сите китови за изолација на ДНК вклучуваат неколку чекори:

1. **Лиза.** Пуферите за лизирање можат да имаат различен состав, но секогаш содржат а) висока концентрација на некој хаотропен агенс (на пр. гванидин хидрохлорид, гванидин тиоцијанат, уреа, литиум перхлорат) кои ги денатурираат протеините преку дестабилизирање на водородните врски, Вандервалсовите сили и хидрофобните интеракции; б) детергенти кои помагаат во солубилизацијата на протеините; в) ензими, на пр. протеиназа К (тоа е првиот дел од протоколот до моментот на додавање на магнетните честички) .

2. **Врзување.** Освен што се значајни за лизата, хаотропните соли ја намалуваат асоцијацијата на ДНК со молекулите на водата со што се обезбедуваат услови за врзување на ДНК за цврстата фаза. Најчесто во овој чекор се додава апсолутен етанол, кој исто така го олеснува врзувањето (во нашиов случај за промовирање на врзување на ДНК за магнетните честички додаваме изопропанол).

3. **Миене на колоната.** Најчесто се изведуваат две последователни миене со два различни пуфери. Првиот обично содржи некој денатурирачки агенс, за да се отстранат протеините кои се адсорбирале на колоната. Вториот пуфер обично има висока концентрација на етанол, за да се отстранат солите (тоа е постапката на измивање до пуферите, пуфер А и Б (сл.4).



Сл. 4 Промивање на колоните со пуфери за изолација

4. **Елуција на ДНК.** Обично се користат пуфери со рН помеѓу 8-9, со цел да се зголеми растворливоста и стабилноста на елуираната ДНК (тоа е постапката на додавање на пуферот за елуирање кога доаѓа до елуирање на ДНК од магнетните честички во растворот со цел да се ослободиме од цврстата фаза, односно од магнетните честички).

#### 4.4. Квантификација на примероците

Квантификацијата на примероците во студијата е извршена со помош на Quantifiler DNA Quantification Kit од Applied Biosystems, на 7500 Real Time PCR System (сл.5). Овој пристап овозможува квантификација на иницијалната ДНК во примерокот со помош на мерење на флуоресцентниот сигнал за време на амплификација на целната секвенца.



Сл.5 Quantifiler ABI на Realtime PCR 7500 ABI

Примарната цел на Real Time PCR квантификацијата е одредување на „амплификабилната„ ДНК присутна во примерокот. PCR амплификацијата може да не биде успешна како резултат на присуство на коекстрахирани инхибитори, многу деградирана ДНК, недоволно количество на ДНК или комбинација од сите овие фактори. Според тоа, тестот кој точно ги рефлектира и квалитетот и квантитетот на ДНК присутна во екстрахираниот примерок, е голема придобивка за донесување на одлуката како да се продолжи со понатамошната анализа на примерокот. Real Time PCR анализите го овозможуваат ваквиот пристап.

#### 4.3. Третман на примероците

Во првото испитување се опфатија 30 заби поделени во три групи од по 10 заби: првата група беа инцизиви, втората премолари и третата молари. Забите беа мерени пред започнување на постапката за изолација на ДНК молекулата, и по завршување на постапката за изолација со посебна вага со децимали од 0,02 ng до 0,000005 ng. (сл 6).



Сл. 6 Дигитална вага за мерење на забите пред започнување на постапката на изолација на ДНК

Техниката на изолација на ДНК се изведе со поставување на забите во посебни блендери за коска и заби (сл.7, сл. 8), со намера комплетно да се здроби целиот заб. Со ова испитување се одреди постоење на корелација помеѓу тежината на забот и количината на екстрахирана ДНК и се одреди од која група заби е возможна најквалитена изолација на ДНК.



Сл. 7. Блендер за заби и коска



Сл.8. Комора каде што се дробат заби

За второто испитување употребените заби беа поделени во две групи. Во првата група изолацијата се правеше од пулпата на забот, а во втората група изолацијата ја изведувавме со мелење на остатокот од забот во блендер за оваа намена. Екстирпацијата на пулпата од забот се правеше со нерв екстирпатори по извршено хоризонтално раздвојување на забот (сл. 10). Оваа постапка на хоризонтално раздвојување на забот во пределот на вратот од забот се правеше со цел да се сочува оклузалната површина на забот којашто може да послужи во понатамошната постапка на идентификација. Ова раздвојување се изврши со дијамантски борер и микромотор, при што забот се држеше цврсто во стега. Се започна од едната апроксимална страна движејќи се циркуларно околу вратот на забот (сл. 9).

Кога бевме веќе блиску до пулпната комора, забот се раздвои со полуга, за да се избегне загревање и механичко оштетување на пулпата, а со тоа и контаминација на материјалот. На овој начин се споредуваше квантитетот и квалитетот на добиената ДНК од пулпата и ДНК добиена од цврстите забни структури, и се одреди од кое забно ткиво е подобро да се изолира ДНК молекулата.



Сл.9. Циркуларно сепарирање на коронката од коренот во пределот на вратот на забот и Сл.10. Екстирпација на пулпата со нерв-екстирпатори

Во третото испитување го следевме влијанието на надворешните услови врз квалитетот на изолираната ДНК и притоа се опфатија 48 заби поделени во четири групи од по 12 заби. Првата група беа заби поставени во фрижидер со константна температура од  $+4^{\circ}\text{C}$  (контролирана деградација), втората група 12 заби беа поставени во надворешна средина каде што беа изложени на различни временски услови и на различни температурни промени, со што го следевме влијанието на надворешните услови врз степенот на деградација на ДНК молекулата. Третата група 12 заби беа поставени во вода, поточно во реката Вардар во временски период од 15.02.2015 до 15 04.2015 и тука сакавме да го утврдиме влијанието на водата врз степенот на деградација на ДНК молекулата. Четвртата група 12 заби беа закопани во земја на отворено и тука го следевме влијанието на хумусната и фулвичната киселина и влијанието на другите егзогени агенси врз количината на изолирана ДНК. Забите се анализираат во временски период од 2 месеци, при што секој секоја втора недела се правеше анализа на забите од секоја група.

За последното испитување се направи анализа на 45 млечни заби поделени во три групи од по 15 заби. Првите две групи беа здрави заби, меѓутоа со различен степен на ресорпција на коренот, додека третата група беше група млечни заби со помал степен на ресорпција на коренот на забот, но со присутни кариозни лезии. Првата група беше со заби со минимална ресорпција на коренот на забот (подолг корен), додека во втората група беа заби со поголем степен на ресорпција, т.е.



ресорбиран корен повеќе од половината од неговата физиолошка должина (пократок корен). Притоа испитавме дали е возможна изолација на ДНК од млечните заби и како влијае степенот на ресорпција на забот, на количината на екстрахирана ДНК. Воедно го утврдивме и влијанието на присутните бактериски соеви и нивните ензими, врз степенот на деградација на ДНК молекулата.

#### 4.4. Протокол за изолација на ДНК од заби

Изолацијата на ДНК од забите ја изведовме со **Prepfilers BTA Forensic DNA Extraction Kit**. Во понатамошниот текст ќе биде објаснет комплетниот протокол за изолација на ДНК од забите со овој комерцијален сет.

- Забите се чистат со четка прво со обична вода, а потоа се ставаат во епрувета во која се полеваат со раствор на NaClO 1% и се ставаат во ултрасонично купатило 10 мин. на собна температура (сл.11). Истото се прави и со дестилирана вода. Постапката се повторува двапати, односно, двапати со NaClO 1% и двапати со дестилирана вода, вкупно 40 мин. чистење.



Сл.11 Ултрасонично купатило

- Потоа забите се оставаат преку ноќ да се исушат.
- По сушењето забите се мелат со блендер за заби.

### PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit

Одредување на големината на примерокот или почетната количина

Вид примерок	Потребна количина на примерок
Коска	До 50 mg спрашена коска
Заб	До 50 mg спрашен заб
Капак	Засек до 1x1,5-см
Мастика за цваќање	До 50 mg (околу 3x3x5-мм парче)
Отпушок од цигара	До 25-мм <sup>2</sup> засек од филтерот на цигарата <b>ВАЖНО!</b> Се отстранува целиот филтер материјал од филтерната хартија.
Адхезивна трака	До 5-см <sup>2</sup> засек со плунка или крв

Табела 1. Примери за типови на примероци и почетната количина за употреба во стандардниот протокол

#### Потребни материјали

##### Реагенси:

- PrepFiler® BTA Lysis Buffer
- 1.0 M раствор DL-Dithiothreitol (DTT)
- Протеиназа К
- PrepFiler® Lysis Buffer
- PrepFiler® Магнетни честички

**Забелешка:** За пипетирање на магнетните честички се користат стандардни типови за пипетирање.

- Изопропанол

**Забелешка:** Кога не се употребува изопропанолот се затвора и се следат препораките за рокот на траење според производителот.

- Подготвени PrepFiler® Wash Buffers A and B
- PrepFiler® Elution Buffer

#### Пластични материјали

- 2,0-mL тубички
- (за отстранување на супстратот од примероците) PrepFiler® тубички за центрифугирање и филтер-колони
- 1,5-mL тубички за микроцентрифурање

#### Лабораториска опрема

- пипетори
- аеросол резистентни типови за микропипетори
- вортекс (мешалка) со различни брзини
- микроцентрифуга
- стерилни пинцети или друг алат за отстранување на супстратот од примероците
- мешалка или вортекс со адаптер
- магнетен држач за 16 примероци
- термална мешалака (шејкер) или термален блок

#### Стандарден протокол

##### **Чекор 1: Подготовка на реагенси**

1. Пред секоја употреба, магнетните честички се инкубираат 10 минути на 37°C, потоа се ставаат во вортекс на средна брзина додека честичките целосно се ресуспендираат. За да се спречи евапорација на пуферите од магнетните честички, по секоја употреба тубата веднаш се затвора.
2. Доколку PrepFiler® Lysis Buffer содржи преципитат, растворот со пуферот се загрева 15 мин. на 37°C, а потоа се меша во вортекс (се вортексира) 5 сек.

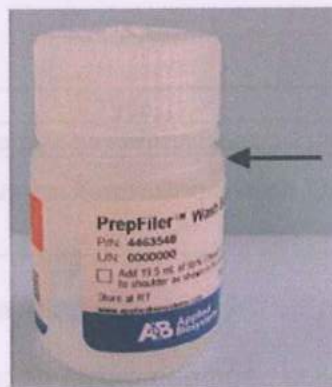
3. Се подготвува по едно шише од пуферите за промивање А и В пред првата употреба. Вторите шишиња се подготвуваат доколку првото/првите се искористат целосно во претходните анализи:

А) Првото шише PrepFiler® Wash Buffer A Concentrate (сл.12) се полни до заоблениот крај од шишето со свежо отворен 95% етанол (93ml етанол) за да се изработи 1X раствор. Шишето се означува на налепницата на местото каде што стои дека е додаден етанол.

Б) Првото шише PrepFiler® Wash Buffer B Concentrate (сл. 13) се полни до заоблениот крај од шишето со свежо отворен 95% етанол (93ml етанол) за да се изработи 1X раствор. Шишето се означува на налепницата на местото каде што стои дека е додаден етанол.



Сл.12 Wash Buffer A



Сл.13 Wash Buffer B

**Забелешка:** Китот содржи две шишиња од секој од концентратите на пуферите. За подобри резултати се подготвува по едно шише за употреба.

**Забелешка:** Подготвените пуфери имаат рок на употреба до шест месеци или до назначениот рок на употреба од производителот во зависност што е поскоро, доколку шишињата се чуваат затворени кога не се употребуваат.

4. Се одмрзнува или се подготвува свеж 1,0M раствор на DL-dithiothreitol (DTT) со микробиолошка чистота и вода без присуство на ДНК.

**Забелешка:** По завршување на лизирањето, неискористениот DTT се фрла.

**Забелешка:** За подготовка на свеж DTT, се раствораат 1,54 g dithiothreitol (DTT, MW 154) во 10ml вода со микробиолошка чистота и без ДНК.

Аликвоти со одреден волумен (на пример 100  $\mu$ l или 500  $\mu$ l) може да се подготват однапред и да се чуваат до 6 месеци на температура од  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Чекор 2: Изведба на лизирање

**ВАЖНО!** За да се избегне преципитација на пуферските компоненти за лизирање, лизатот од примерокот не се лади.

1. Термалната мешалка (шејкер) се загрева на  $56^{\circ}\text{C}$ .
2. Секој примерок се става во туба:

Вид на примерок	Туба
Коска, заб или лента	Туба со капаче на завртување од 2,0-ml
Сите други PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit видови на примероци	Туба за микроцентрифугирање од 1,5-ml

Таб.2. Видови примероци за анализа

3. Се приготвува свеж раствор на пуфер за лизирање пред секој експеримент.

а) Се пресметуваат волумените на компонентите кои се потребни за бројот на реакции. Се вклучува до 5% вишок за да се компензира вишокот при пипетирање.

Компонента на растворот за лизирачки пуфер	Волумен	
	Една реакција	96 реакции
PrepFiler BTA Пуфер за лизирање	220 $\mu$ l	22 $\mu$ l
1.0 M DTT	3 $\mu$ l	300 $\mu$ l
Протеиназа К	7 $\mu$ l	700 $\mu$ l

Таб.3. Компоненти за раствор за лизирачки пуфер

б) Потребните волумени од компонентите се додаваат заедно и потоа лесно се промешуваат.

4. Се додаваат 230  $\mu\text{l}$  раствор на пуферот за лизирање во секој примерок.
5. Тубите се затвораат, се мешаат во вортекс 5 секунди, кратко се ставаат во центрифуга, а потоа лесно се потчукнуваат за да се ресуспендира каква била прашина или супстрат.
6. Треба да се осигура дека тубите се добро затворени, а потоа тубите се ставаат на термална мешалка (шејкер) и се инкубираат на следниот начин:

Вид на примерок	Инкубација
Заб	2h на 1100 rpm и 56°C

### Чекор 3: Супстратот се отстранува од лизатот на примерокот

1. Се означуваат до 96 нови туби за микроцентрифугирање од 1,5 ml.
2. Примерокот се остава да се стабилизира на собна температура.
3. Тубите со примероците се ставаат во центрифуга 90 сек. На 10,000 x g, а потоа чистиот лизат внимателно се префрла во нова туба за микроцентрифугирање од 1,5 ml. Седиментот не се допира.
4. Се проверува волуменот на лизатот што е собран во тубата за центрифугирање. Доколку волуменот е помал од 180  $\mu\text{l}$ , се додава PrepFiler ВТА Пуфер за лизирање до тотален волумен од 180  $\mu\text{l}$ .

### Чекор 4: Додатен волумен на лизат со PrepFiler Пуфер за лизирање

Се додаваат 300  $\mu\text{l}$  PrepFiler Пуфер за лизирање на тубата што го содржи лизатот од примерокот, кратко се става во вортекс за да се измеша, а потоа кратко се става и во центрифуга.

## Чекор 5: Врзување на геномската ДНК за магнетните честички

1. Треба да се осигура дека примерокот се стабилизира на собна температура пред да се продолжи со работа.
2. Тубата со PrepFiler магнетните честички се меша во вортекс околу 5 сек., потоа тубата се превртува нопаку за да се осигураме дека нема заостанати цврсти честички на дното од тубата, а потоа кратко се става во центрифуга.
3. Се пипетираат 15  $\mu$ l од ресуспендираните магнетни честички во тубата со лизат од примерокот.
4. По додавањето на честичките, тубата со PrepFiler магнетните честички се затвора за да се спречи евапоризација.
5. Тубата со лизат од примерокот се затвора, се меша во вортекс 10 сек. на мала брзина (околу 500-1,200 rpm), а потоа кратко се става во центрифуга за да се соберат остатоците од страните и капачето од тубата.
6. Се додава изопропанол и се мешаат еден по еден примерок со цел да се поттикне врзувањето:
  - а) се додаваат 300  $\mu$ l изопропанол (99,5%) на тубата со лизат од примерокот;
  - б) веднаш по додавањето изопропанол, тубата со лизат од примерокот се затвора, се меша во вортекс 5 сек. на мала брзина (околу 500-1,200 rpm), потоа кратко се става во центрифуга за да се соберат остатоците од страните и капачето на тубата;
7. Тубата со лизатот од примерокот се става во мешалка (шејкер или вортексер со адаптер), а потоа се меша 10 мин. На 700 rpm и собна температура.

## Чекор 6: Измивање на врзаната ДНК

1. Тубата со ДНК примерок се меша во вортекс (се вортексира):
  - а) доколку на страните од тубата со ДНК примерокот над менискусот се присутни магнетни честички, тубата се превртува за да се ресуспендираат честичките;
  - б) тубата со ДНК примерокот се меша во вортекс 10 сек. на максимална брзина (околу 10,000 rpm), а потоа кратко се става во центрифуга за да се соберат остатоците од страните или капачето од тубата.
2. Тубата со ДНК примерокот се става на магнетен држач и се следи формирањето на пелети од магнетните честички на задната страна од тубата. Се чека додека големината на пелетите не престане да се зголемува (околу 10 мин.).
3. Додека тубата со ДНК примерокот стои на магнетниот држач, внимателно целосно се аспирира и се отстранува видливата течна фаза. Не се аспирираат ниту се допираат пелетите од магнетните честички.
4. Чекорите од точка а. до точка д. се повторуваат трипати:
  - а. се додава пуфер за промивање на тубите со ДНК примерок;

Прво промивање: Пуфер за промивање Пуфер А	Второ промивање: Пуфер за промивање А	Трето промивање: Пуфер за промивање В
600 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l

- б) тубите со ДНК примероци се затвораат и се вадат од магнетниот држач;
- в) тубите со ДНК примероци се мешаат во вортекс 15 сек. и потоа кратко се ставаат во центрифуга за да се соберат остатоците од страните и капачињата од тубите;
- г) тубите со ДНК примероците се ставаат на магнетен држач 1 мин.;



д) додека тубите со ДНК примерок сè уште се наоѓаат на магнетниот држач, внимателно, целосно се аспирира и се отстранува видливата течна фаза. Не се аспирираат или допираат пелетите од магнетните честички.

5. Тубите кратко се центрифугираат, се ставаат 30-60 сек. назад на магнетниот држач, а потоа се собира остатокот од резидуална течност со пипетор со среден или мал волумен (пипци од 200  $\mu$ l или 20  $\mu$ l).

6. Доколку сè уште е присутна резидуална течност, тубите повторно се ставаат на магнетен држач, се отвораат, а потоа се дозволува магнетните честички кои ја имаат врзано ДНК, да се исушат до 5 мин.

**ВАЖНО!** Сушењето подолго од 10 мин. може да го намали приносот на ДНК.

#### Чекор 7: Елуирање на ДНК

1. Термалната мешалка (шејкер) се загрева на 70<sup>o</sup>C.

2. Се додаваат 50  $\mu$ l PrepFiler Пуфер за елуирање на тубата со ДНК примерок, потоа се мешаат во вортекси на максимална брзина додека пелетите не се ресуспендираат.

3. Тубата со ДНК примерок се става во термална мешалка (шејкер) и се инкубира 10 мин. На 70 <sup>o</sup>C и 900 rpm.

4. Тубата со ДНК примерок се меша во вортекс на максимална брзина (околу 10,000 rpm) додека повеќе нема видливи пелети од магнетни честички на страна од тубата (околу 2 сек.), а потоа кратко се става во центрифуга за да се соберат остатоците од страните и капачето од тубата

5. Тубата со ДНК примерок се става на магнетен држач, а потоа се чека додека големината на пелетите на страната од тубата не престане да се зголемува (околу 5 мин.).

6. Внимателно, целосно се аспирира видливата течна фаза во тубата со ДНК примерок (ова е изолираната геномска ДНК). Не се аспирираат или допираат пелетите од магнетни честички. Елуатот се пренесува во нова, означена туба за микроцентрифугирање од 1,5 ml за чување.

Изолираната ДНК може да се чува на 4°C до една недела, или на -20°C подолго време.

#### 4.5. Статистичка обработка

Податоците добиени во текот на истражувањето беа внесени во специјално изработена база на податоци, а статистичката обработка беше направена со користење на соодветни статистички програми (Statistica for Windows 7,0 и SPSS 17.0).

Анализата на атрибутивните (квалитативни) серии е правена преку одредување на коефициент на односи, пропорции и стапки, кои беа прикажани како апсолутни и релативни броеви. Нумеричките (квантитативни) серии се анализирани со употреба на мерките на централна тенденција (просек, медијана, минимални вредности, максимални вредности, интерактивни рангови), како и со мерки на дисперзија (стандардна девијација, стандардна грешка).

Pearson Chi square тестот за хомогеност, Yates corrected и Fischer exact тестот беа користени за утврдување на разликата помеѓу одредени атрибутивни дихотомни белези во двете групи испитаници. Пирсоновиот ( $r$ ) коефициент на корелација и Спермановиот коефициентот на ранг-корелација беа употребувани за утврдување на асоцијацијата помеѓу консеквентно нумеричките симетрични статистички серии и нехомогените нумерички статистички серии. За тестирање на значајноста на разликата меѓу одредени анализирани параметри, беа користени, во зависност од видот и дистрибуцијата на податоците, параметарски Студентов  $t$ -тест (за два независни примероци) и ANOVA (за повеќе независни примероци), како и непараметарски тестови за независни примероци (Mann Whitney U тест и Kruskal-Wallis ANOVA test). Темпото на растот т.е. опаѓање е одредуван преку индекси на динамика.

За утврдување на статистичка значајност се користеше ниво на сигнификантност од  $p < 0,05$ . Резултатите се прикажани табеларно и графички.

5.

## РЕЗУЛТАТИ

## 5. Резултати

### 5.1. Прв дел на истражувањето

Во првиот дел од истражувањето се опфатени вкупно 30 заби поделени во три групи од по 10 заби и тоа: а) прва група - инцизиви; б) втора група - премолари и в) трета група - молари.

Анализата на секоја група заби е правена поединечно за да се испита од која група се добива најголема количина на ДНК, т.е. да се одреди дали постои корелација помеѓу тежината т.е. масата на забот и концентрацијата на екстрахирана ДНК. Забите се мерени пред започнување и по завршување на постапката за изолација на ДНК молекулата. За секој заб од трите групи заби утврдена е масата на забот во грамови, концентрацијата на ДНК во  $\text{ng}/\mu\text{l}$  како и концентрацијата на ДНК на грам заб  $\text{ng}/\mu\text{l/g}$  заб.

#### 5.1.1. Инцизиви

Поединечните вредности на масата на заб, како и концентрацијата на изолирана ДНК од цврстото забно ткиво на десетте заби ИНЦИЗИВИ се претставени во табелата 1.

Табела 1. Маса (тежина) и количина на изолирана ДНК од цврстото забно ткиво на инцизиви

Број	ИНЦИЗИВИ		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/ $\mu$ l)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)
1	0,52	0,01600	0,030769
2	0,29	0,04510	0,155517
3	1,33	0,01240	0,009323
4	1,24	0,05850	0,047177
5	0,10	0,00216	0,021600
6	0,57	0,02100	0,036842
7	1,01	0,05310	0,052574
8	0,13	0,02240	0,172307
9	0,62	0,06350	0,102419
10	0,24	0,00366	0,015250

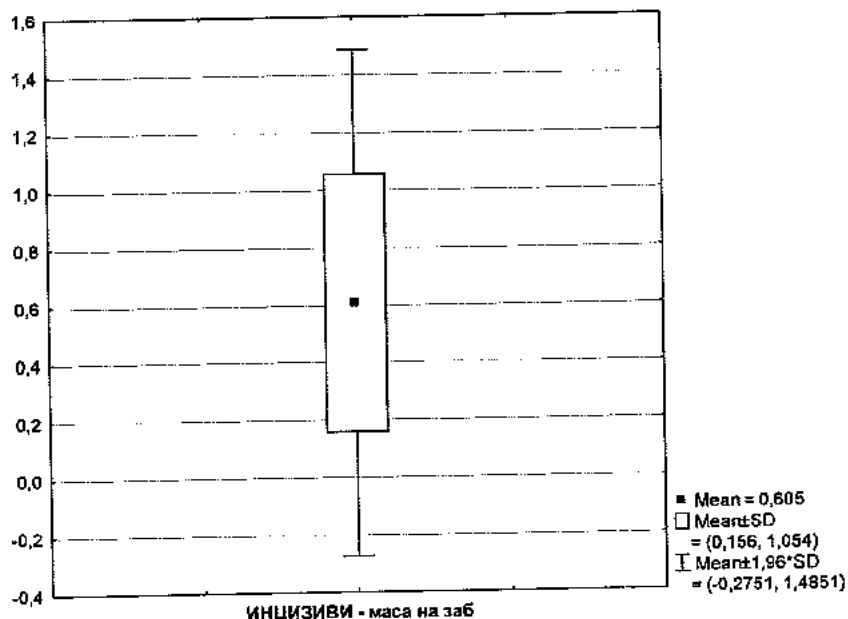
Согласно со дескриптивната анализа на примерокот од десет ИНЦИЗИВИ, просечната вредност на добиената маса (тежина) на заб изразена во грамови изнесува  $0,605 \pm 0,44903$  грама со минимална вредност од 0,1 и максимална вредност од 1,33 грама (табела 2). Анализата покажа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната маса на заб била поголема од 0,545 грама.

Табела 2. Дескриптивна анализа на масата на заб - инцизиви

ИНЦИЗИВИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
маса на заб (g)	10	0,605000	0,449030	0,545000	0,100000	1,330000

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на масата на заб – инцизиви е дадена во графикот 1, подолу во текстот.

График 1. Дескриптивна анализа на масата на заб - инцизиви



Во примерокот на ИНЦИЗИВИ одредувана е концентрацијата на добиената ДНК (ng/μl) од секој заб, а пресметувана е и концентрацијата на добиената ДНК на грам заб (ng/μl/g заб). Дескриптивната анализа на концентрацијата на добиената ДНК – инцизиви е прикажана во табелата 3.

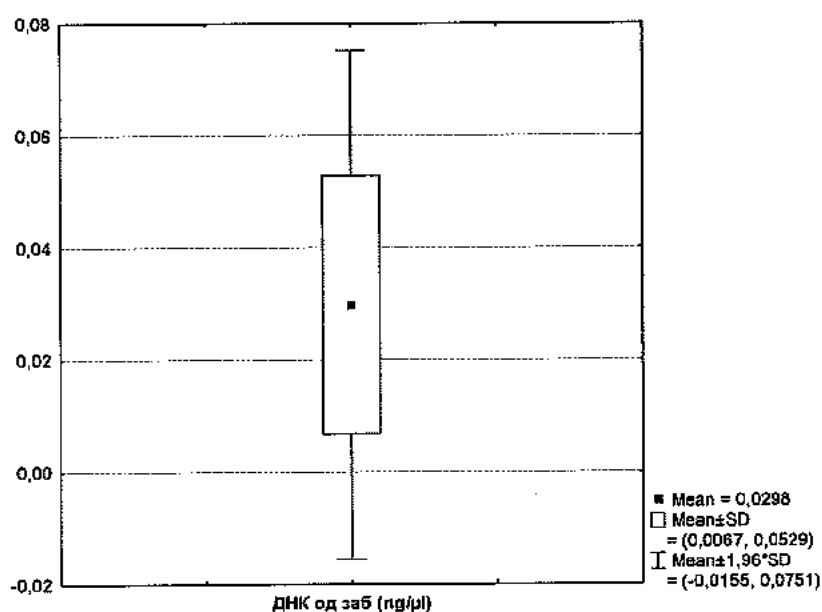
Табела 3. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК од заб - инцизиви

ИНЦИЗИВИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
концентрација на ДНК од заб (ng/μl)	10	0,029782	0,023116	0,021700	0,002160	0,063500

Согласно со дескриптивната анализа на примерокот од десет ИНЦИЗИВИ, просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК од заб изнесува

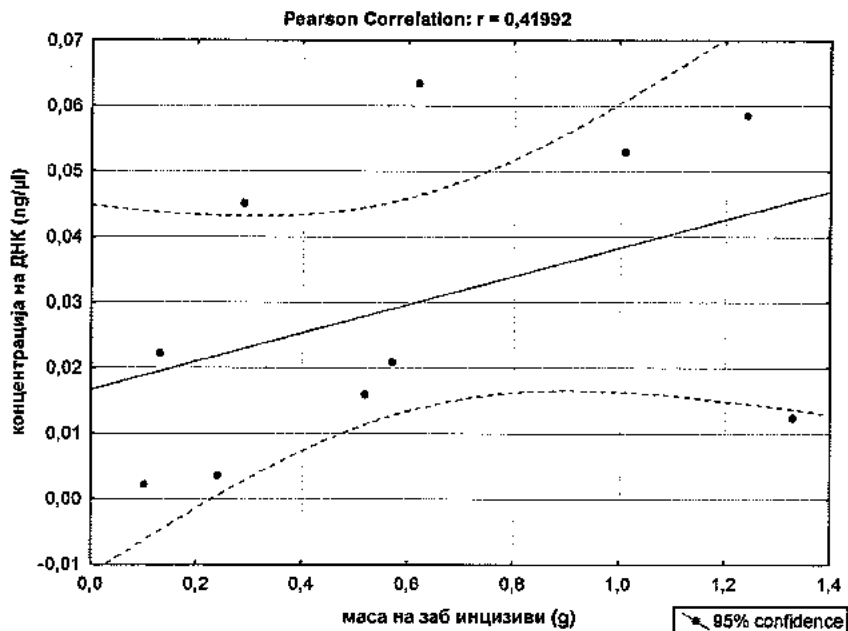
0,029782±0,023116 (ng/μl) со минимална вредност од 0,00216 и максимална вредност од 0,0635 (ng/μl) (табела 3 и график 2). Анализата покажа дека кај 50% од ИНЦИЗИВИТЕ во примерокот, просечната концентрацијата на ДНК од заб била поголема од 0,0217 (ng/μl).

**График 2. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК од заб - инцизиви**



Направена е анализа на меѓусебната поврзаност помеѓу масата на заб – ИНЦИЗИВИ и концентрацијата на екстрахирана ДНК, и утврдено е постоење на линеарна, позитивна умерена корелација (Pearson Corellation:  $r=0,41992$   $p=0,227$ ). Корелацијата е директна, што значи дека со зголемувањето на масата на забот се зголемува и концентрацијата на екстрахираната ДНК од заб.

**График 3. Линеарна корелација помеѓу масата на заб – инцизиви и концентрацијата на екстрахирана ДНК од заб**



Дополнителната анализа на примерокот на ИНЦИЗИВИ укажа дека просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб изнесува  $0,064378 \pm 0,058689$  (ng/μl/g заб) со минимална вредност од 0,009323 и максимална вредност од 0,172307 (ng/μl/g заб) (табела 4 и график 4). Анализата покажа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната концентрацијата на добиената ДНК на грам заб била поголема од 0,042009 (ng/μl/g заб).

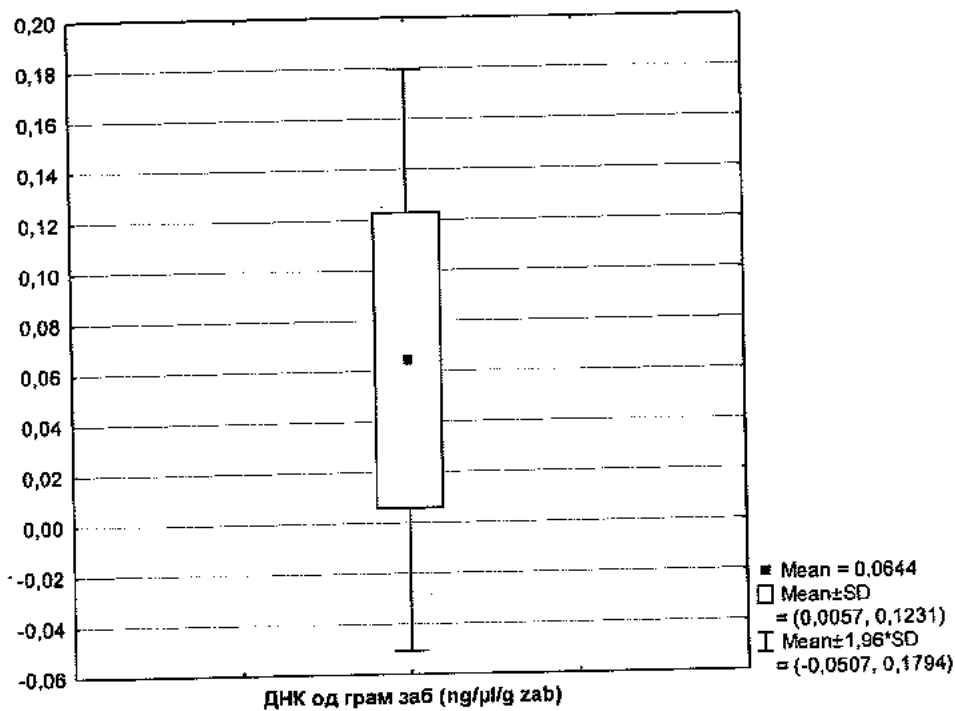
**Табела 4. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК на грам заб - инцизиви**

ИНЦИЗИВИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)	10	0,064378	0,058689	0,042009	0,009323	0,172307



Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на концентрација на ДНК на грам заб – инцизиви е дадена во графикот 4, подолу во текстот.

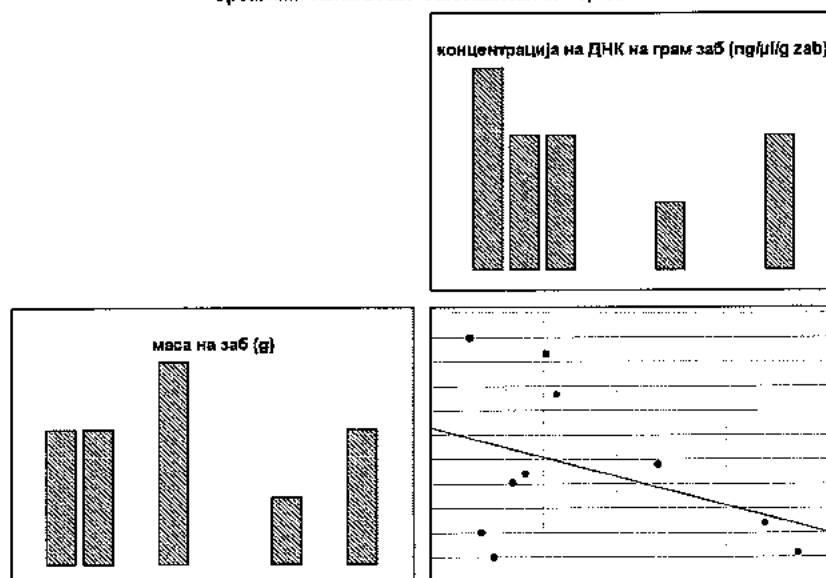
График 4. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК на грам заб - инцизиви



Направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу масата на забот - ИНЦИЗИВИ и концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, покажа постоење на линеарна негативна индиректна незначајна корелација (Spearman Rank Order Correlation:  $R=-0,1394$ ,  $p>0,05$ ). Со зголемувањето на масата на забот, несигнификантно се намалува концентрацијата на екстрахираната ДНК на грам заб (график 5).

График 5. Непараметарска корелација помеѓу масата на забот и концентрацијата на екстрахирана ДНК на грам заб – инцизиви

Spearman Rank Order Correlations:  $R = -0,1394$



### 5.1.2. Премолари

Поединечните вредности на масата на заб, како и концентрацијата на изолираната ДНК од цврстото забно ткиво, на десетте заби од примерокот на ПРЕМОЛАРИ, се дадени во табелата 5.

Табела 5. Маса (тежина) и количина на изолирана ДНК од цврстото забно ткиво на премолари

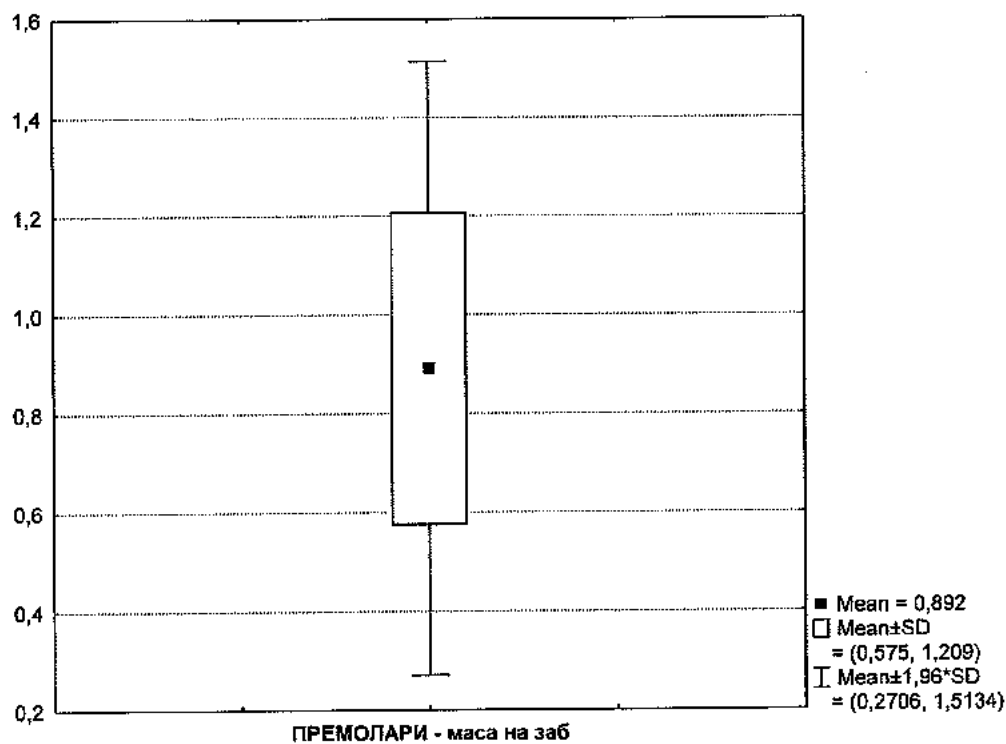
Број	ПРЕМОЛАРИ		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/ $\mu$ l)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)
1	0,76	0,0115	0,015132
2	1,02	0,0548	0,053725
3	1,13	0,0514	0,045487
4	1,00	0,0321	0,032100
5	0,25	0,0345	0,138000
6	0,63	0,0965	0,153174
7	0,92	0,0628	0,068260
8	1,04	0,0614	0,059038
9	1,42	0,0971	0,068380
10	0,75	0,0496	0,066133

Дескриптивната анализа на примерокот од десет ПРЕМОЛАРИ, покажа дека просечната вредност на добиената маса на заб изразена во грамови изнесува  $0,892 \pm 0,317028$  грама со минимална вредност од 0,25 и максимална вредност од 1,42 грама (табела 6 и график 6). Анализата покажа дека кај 50% од премоларите во примерокот, просечната маса на заб е поголема од 0,96 грама.

Табела 6. Дескриптивна анализа на масата на заб - премолари

ПРЕМОЛАРИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
маса на заб (g)	10	0,892000	0,317028	0,960000	0,250000	1,420000

График 6. Дескриптивна анализа на масата на заб - премолари



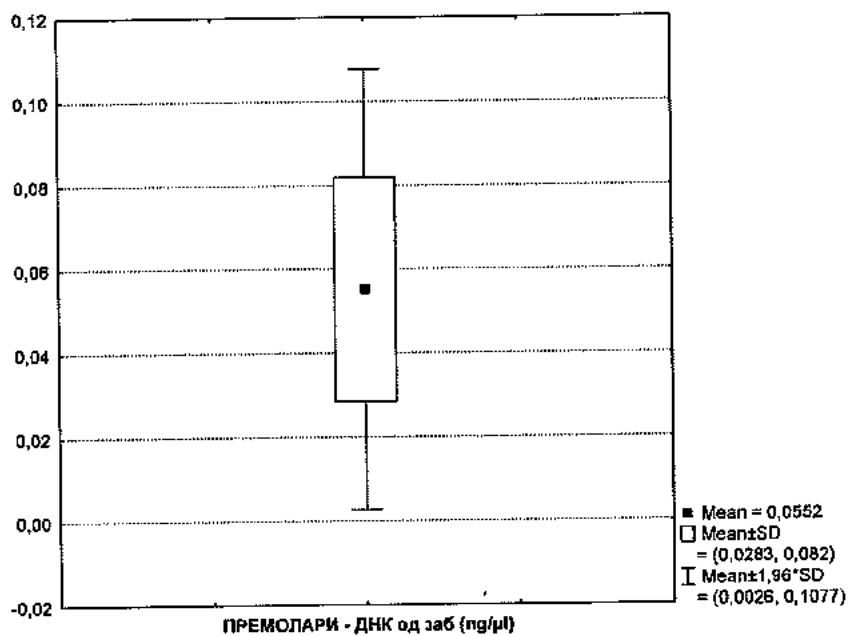
Во примерокот на ПРЕМОЛАРИ одредувана е концентрацијата на добиената ДНК (ng/μl) од секој заб, а пресметувана е и концентрацијата на добиената ДНК на грам заб (ng/μl/g заб). Дескриптивната анализа на концентрацијата на добиената ДНК – премолари е прикажана во табелата 7 и во графикот 7.

Табела 7. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК од заб - премолари

ПРЕМОЛАРИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
концентрација на ДНК од заб (ng/μl)	10	0,055170	0,026823	0,053100	0,011500	0,097100

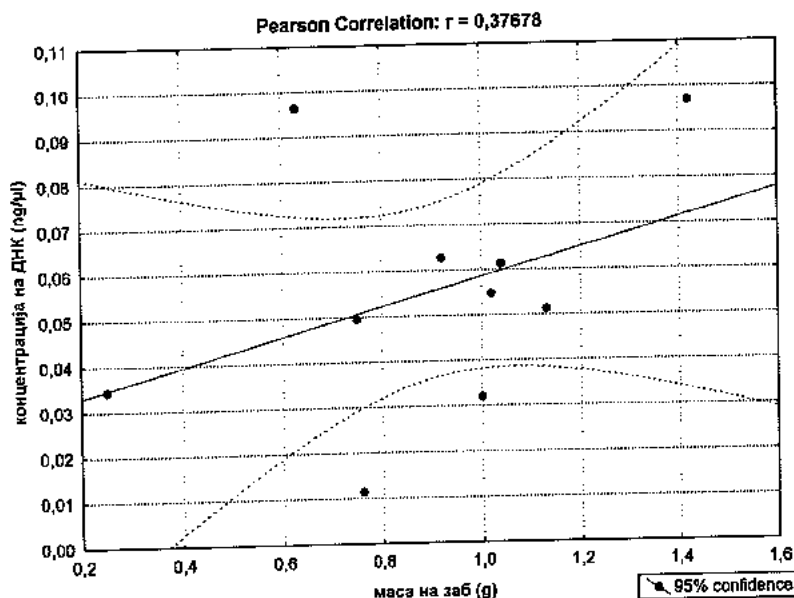
Согласно со дескриптивната анализа на примерокот од десет премолари, просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК од заб изнесува  $0,05517 \pm 0,026823$  (ng/μl) со минимална вредност од 0,0115 и максимална вредност од 0,0971 (ng/μl) (табела 7 и график 7). Анализата покажа дека кај 50% од ПРЕМОЛАРИТЕ во примерокот, просечната концентрација на ДНК од заб била поголема од 0,0531 (ng/μl).

График 7. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК од заб - премолари



Анализата на меѓусебната поврзаност помеѓу масата на заб - ПРЕМОЛАРИ и концентрацијата на екстрахираната ДНК, покажа на постоење на линеарна позитивна умерена корелација (Pearson Corellation:  $r=0,3768$ ,  $p=0,283$ ). Корелацијата е директна, т.е. со зголемувањето на масата на забот се зголемува и концентрацијата на екстрахираната ДНК од забот (график 8).

График 8. Линеарна корелација помеѓу масата на заб - премолари и концентрацијата на екстрахирана ДНК од заб



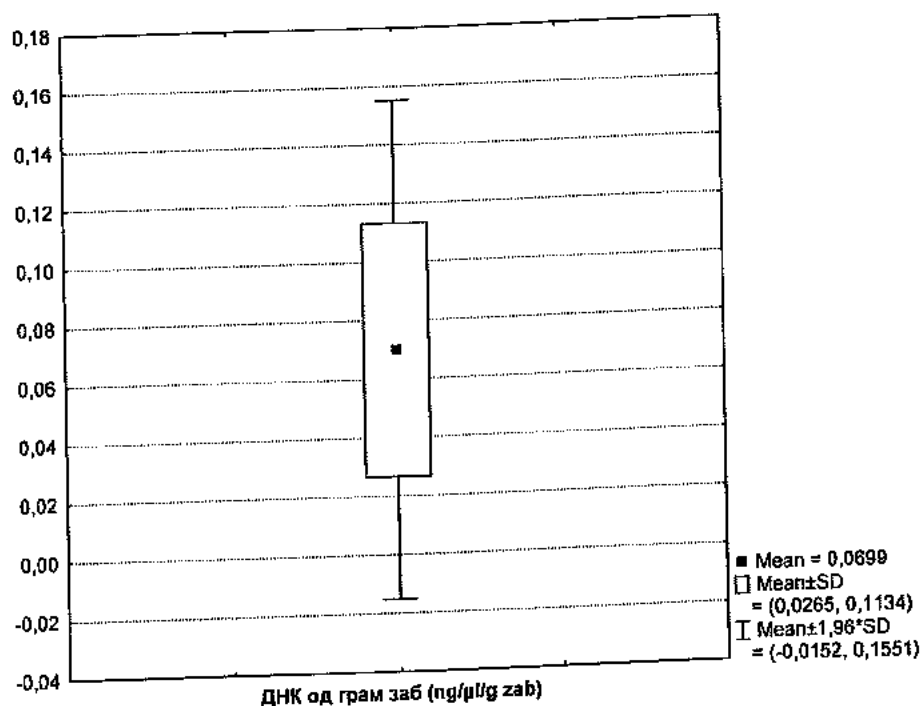
Дополнителната анализа на примерокот на ПРЕМОЛАРИ покажа дека просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб изнесува  $0,069943 \pm 0,043455$  (ng/μl/g заб) со минимална вредност од 0,015132 и максимална вредност од 0,153174 (ng/μl/g заб) (табела 8). Анализата покажа дека кај 50% од ПРЕМОЛАРИТЕ во примерокот, просечната концентрацијата на добиената ДНК на грам заб била поголема од 0,062586 (ng/μl/g заб).

Табела 8. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК на грам заб-премолари

ПРЕМОЛАРИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
концентрација на ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)	10	0,069943	0,043455	0,062586	0,015132	0,153174

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на концентрацијата на ДНК на грам заб – ПРЕМОЛАРИ е дадена во графикот 9, подолу во текстот.

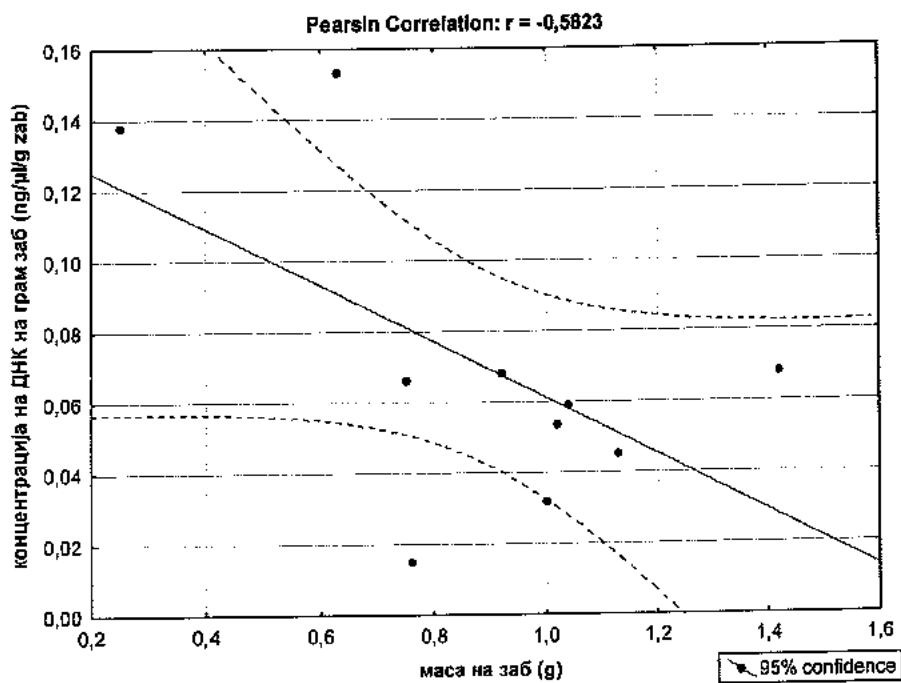
График 9. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК на грам заб - премолари



Направената анализата на меѓусебната зависност помеѓу масата на забот - ПРЕМОЛАРИ и концентрацијата на добиената ДНК на грам заб покажа на

постојење на линеарна, негативна, индиректна умерена корелација (Pearson Correlation:  $r = -0,5823$   $p = 0,077$ ). Со зголемувањето на масата на забот - ПРЕМОЛАРИ се намалува концентрацијата на екстрахираната ДНК на грам заб (график 10).

**График 10. Непараметарска корелација помеѓу масата на забот и концентрацијата на екстрахирана ДНК на грам заб – премолари**



### 5.1.3. Молари

Поединечните вредности на масата на заб, од десетте заби од примерокот на МОЛАРИ, како и концентрацијата на изолираната ДНК од цврстото забно ткиво, се дадени во табелата 9.



Табела 9. Маса (тежина) и количина на изолирана ДНК од цврстото забно ткиво на молари

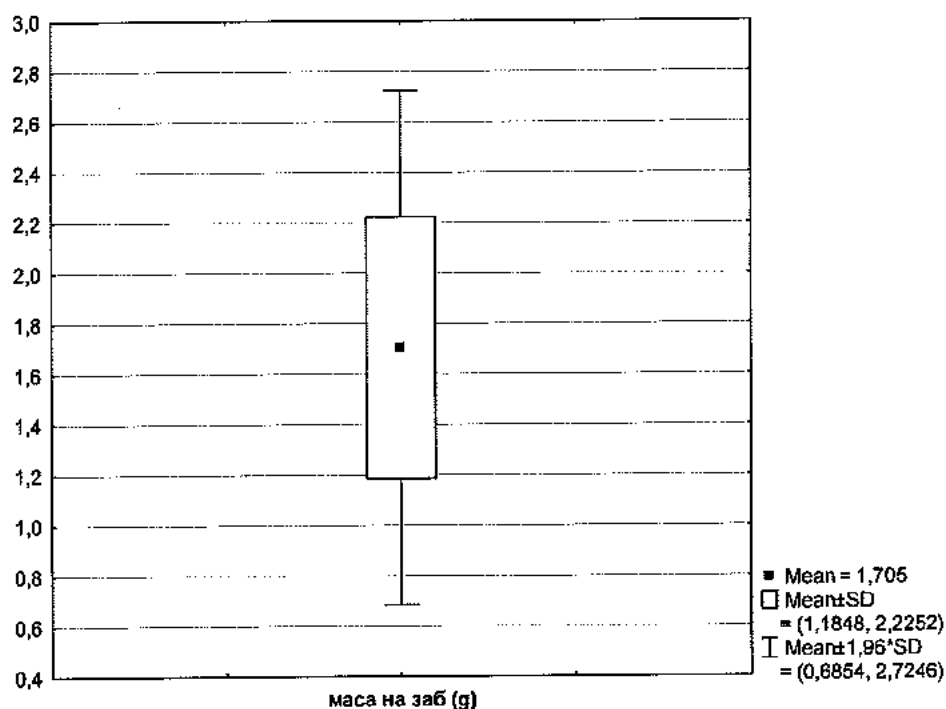
Број	МОЛАРИ		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
1	2,31	1,016923	0,44022640
2	2,64	0,405668	0,15366212
3	1,63	0,012613	0,00773803
4	2,02	0,097654	0,04834391
5	1,55	1,043592	0,67328516
6	1,62	0,021987	0,01357246
7	1,84	0,213665	0,11612277
8	0,92	0,022867	0,02485543
9	1,14	0,092645	0,08126754
10	1,38	0,046416	0,03363478

Дескриптивната анализа на примерокот од десет МОЛАРИ, покажа дека просечната вредност на добиената маса на заб изразена во грамови изнесува  $1,705 \pm 1,625$  грама со минимална вредност од 0,92 и максимална вредност од 2,64 грама (табела 10 и график 11). Анализата покажа дека кај 50% од моларите во примерокот, просечната маса на заб е поголема од 1,625 грама.

Табела 10. Дескриптивна анализа на масата на заб – молари

МОЛАРИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
маса на заб (g)	10	1,705000	1,625000	1,625000	0,920000	2,640000

График 11. Дескриптивна анализа на масата на заб - молари



Во примерокот на МОЛАРИ одредувана е концентрацијата на добиената ДНК (ng/μl) од секој заб, а пресметувана е и концентрацијата на добиената ДНК на грам заб (ng/μl/g заб). Дескриптивната анализа на концентрацијата на добиената ДНК – премолари е прикажана во табелата 11 и во графикот 12.

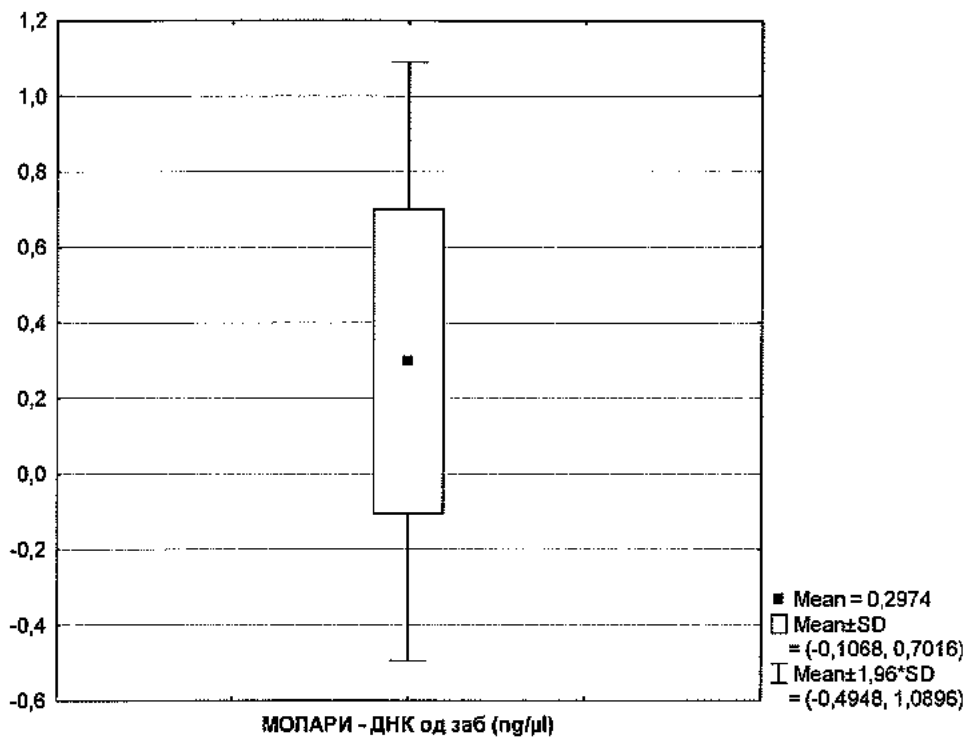
Табела 11. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК од заб - молари

МОЛАРИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
концентрација на ДНК од заб (ng/μl)	10	0,297403	0,404199	0,095150	0,012613	1,043592

Согласно со дескриптивната анализа на примерокот од десет молари, просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК од заб изнесува  $0,297403 \pm 0,404199$  (ng/μl) со минимална вредност од 0,012613 и максимална

вредност од 1,043592 (ng/μl) (табела 11 и график 12). Анализата покажа дека кај 50% од МОЛАРИТЕ во примерокот, просечната концентрацијата на ДНК од заб била поголема од 0,09515 (ng/μl).

График 12. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК од заб - молари

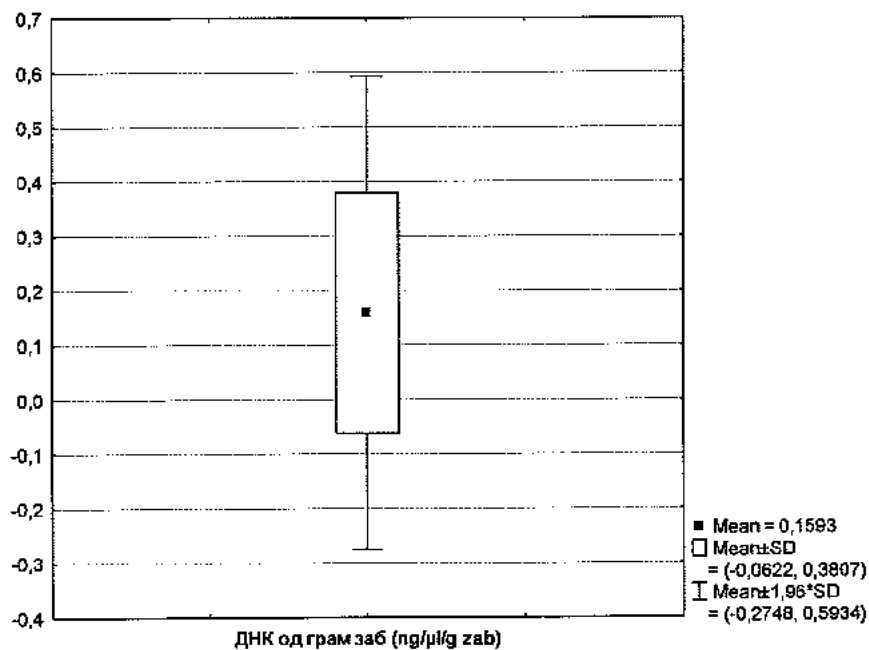


Анализата на меѓусебната зависност помеѓу масата на заб - МОЛАРИ и концентрацијата на екстрахираната ДНК, покажа на постоење на линеарна, позитивна, директна умерена корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R=0,4424$ ,  $p>0,05$ ). Со зголемувањето на масата на забот - МОЛАРИ се зголемува и концентрацијата на екстрахираната ДНК од забот (график 13).



Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на концентрацијата на ДНК на грам заб – МОЛАРИ е дадена во графикот 14. Дополнителната анализа на меѓусебната зависност помеѓу масата на забот - МОЛАРИ и концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, покажа постоење на линеарна негативна индиректна незначајна корелација (Pearson Corellation:  $r=-0,1273$   $p>0,05$ ).

**График 14. Дескриптивна анализа на концентрацијата на ДНК на грам заб - молари**



#### 5.1.4. Добиена маса на заб - споредба помеѓу инцизиви, премолари и молари

Направена е споредба на трите групи заби (инцизиви, премолари и молари) во однос на просечната вредност на добиената маса на заб изразена во грамови (табела 13). Анализата покажа дека за  $p<0,05$  постои статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи заби во однос на просечната добиена маса на заб (One Way ANOVA:  $F=17,052$ ,  $df=2$ ,  $p=0,000016$ ).

Табела 13. Анализа на варијанса на масата на заб

Маса на заб (g)			
Групи заби	број	Просек (Means)	p
Инцизиви	10	0,605000	One Way ANOVA F=17,0519, df=2, p=0,000016*
Премолари	10	0,892000	
Молари	10	1,705000	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Направена е анализа на просечната добиена маса на заб на секоја група поединечно во однос на другите групи. Поединечната анализа на просечната добиена маса на заб на секоја група во однос на другите две групи заби, за  $p < 0,05$ , покажува сигнификантна разлика (табела 14). Просечната добиена маса на заб во групата молари, сигнификантно се разликува во однос на просечно добиената маса на заб во групата инцизиви т.е. во однос на групата премолари.

Табела 14. Tukey (HSD) тест за масата на заб

Tukey HSD тест за масата на заб			
Групи заби	Инцизиви	Премолари	Молари
Инцизиви		0,321507	0,000139*
Премолари	0,321507		0,000929*
Молари	0,000139*	0,000929*	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

### 5.1.5. Концентрација на добиената ДНК од заб - споредба помеѓу инцизиви, премолари и молари

Трите групи заби (инцизиви, премолари и молари) се споредувани и во однос на просечната концентрација на добиена ДНК од заб (табела 15). За  $p < 0,05$ , анализата покажа статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи во однос на просечната концентрација на добиена ДНК од заб (One Way ANOVA:  $F=3,9769$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0306$ ).

Табела 15. Анализа на варијанса на концентрацијата на добиена ДНК од заб

Концентрација на добиена ДНК од заб (ng/μl)			
Групи на заби	Број	Просек (Means)	p
Инцизиви	10	0,029782	One Way ANOVA $F=3,9769$ , $df=2$ , $p=0,0306^*$
Премолари	10	0,055170	
Молари	10	0,297403	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Дополнителната анализа на концентрацијата на добиената ДНК од заб на секоја група во однос на другите две групи заби, за  $p < 0,05$ , покажа статистички сигнификантна разлика (табела 16). Просечната концентрација на добиената ДНК од заб во групата молари, сигнификантно се разликува во однос на истата во групата инцизиви, а неси́гнификантно се разликува во однос на групата премолари.

Табела 16. Tukey (HSD) тест за концентрација на добиената ДНК од заб

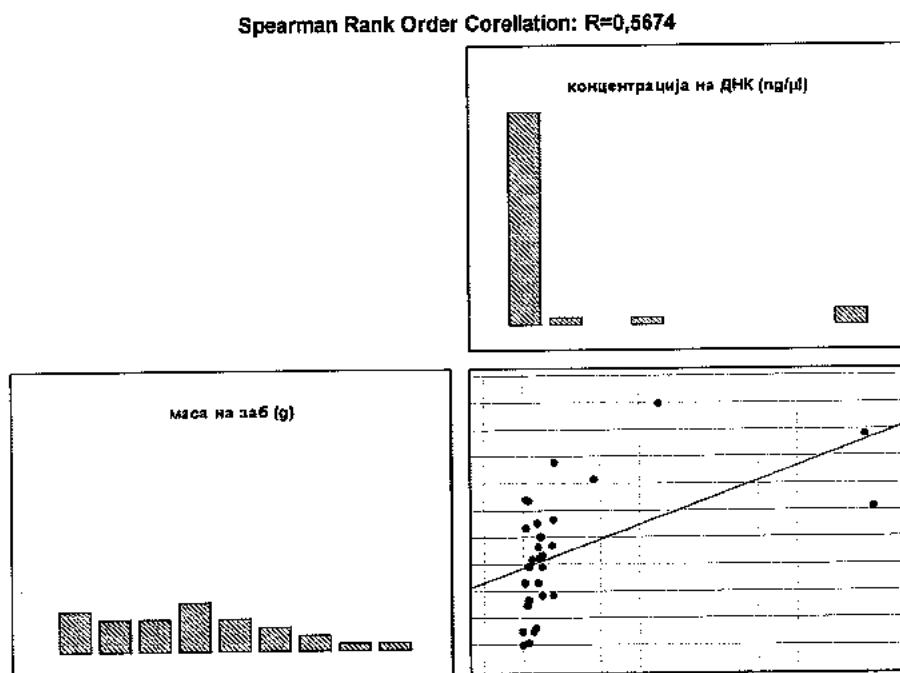
Tukey HSD тест за концентрација на добиената ДНК од заб			
Групи заби	Инцизиви	Премолари	Молари
Инцизиви		0,968264	0,042581*
Премолари	0,968264		0,071221
Молари	0,042581*	0,071221	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

### 5.1.6. Поврзаност на масата на заб со концентрацијата на добиената ДНК од заб на примерок од мешана група заби

Во рамките на истражувањето, на примерок на мешана група заби (инцизиви, премолари и молари), анализирана е поврзаноста на добиената маса на заб со концентрацијата на добиената ДНК од заб. Анализата покажа постоење на позитивна линеарна директна умерена корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R=0,5674$ ) сигнификантна за  $p<0,05$ . Со зголемување на масата на забот, сигнификантно се зголемува концентрацијата на екстрахираната ДНК од забот (график 15).

График 15. Непараметарска корелација помеѓу масата на заб и концентрацијата на екстрахирана ДНК – сите заби





## 5.2. Втор дел на истражувањето

Во рамките на вториот дел од истражувањето, примерокот од вкупно 15 заби примарно е поделен на три групи од по 5 заби (инцизиви, премолари и молари). Во секоја од трите групи заби се издвоени две подгрупи од по 5 примерока од кои: а) во првата подгрупа е анализирана пулпата б) во втората подгрупа е анализирано преостанатото цврсто забно ткиво (дентин и цементин). Анализите во овој дел од истражувањето имаат за цел да покажат од кое забно ткиво (пулпа или цврсто забно ткиво) се добива квантитативно поголема количина ДНК.

### 5.2.1. Пулпа и цврсто забно ткиво – ИНЦИЗИВИ

#### 5.2.1.1. Споредба на добиената маса од пулпата и од цврстото забно ткиво

Вредностите на добиената маса во грамови од пулпата и од цврстото забно ткиво, од примерокот на ИНЦИЗИВИ, се дадени во табелата 17.

Табела 17. Маса на пулпата и на забното ткиво – инцизиви

Број	ИНЦИЗИВИ - маса (g)	
	пулпа	забно ткиво
1	0,01195	1,14
2	0,01049	0,29
3	0,00132	0,10
4	0,00282	0,47
5	0,00725	1,23

Согласно со дескриптивната анализа на масата на пулпата од примерокот од пет ИНЦИЗИВИ, согледано е дека просечната вредност на добиената маса (тежина) на пулпата изразена во грамови изнесува  $0,006766 \pm 0,004642$  грама со минимална вредност од 0,00132 и максимална вредност од 0,01195 грама (табела 18). Анализата покажа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната маса на пулпата била поголема од 0,00725 грама (табела 18). Во однос на анализата на масата на забното ткиво, анализата покажа дека просечната вредност на добиената маса на забното ткиво изнесува  $0,646 \pm 0,5101$  грама со минимална вредност од 0,1 и максимална вредност од 1,23 грама (табела 18). Анализата покажа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната маса на пулпата била поголема од 0,47 грама (табела 18 и график 16).

**Табела 18. Дескриптивна анализа на масата на пулпата и на забното ткиво - инцизиви**

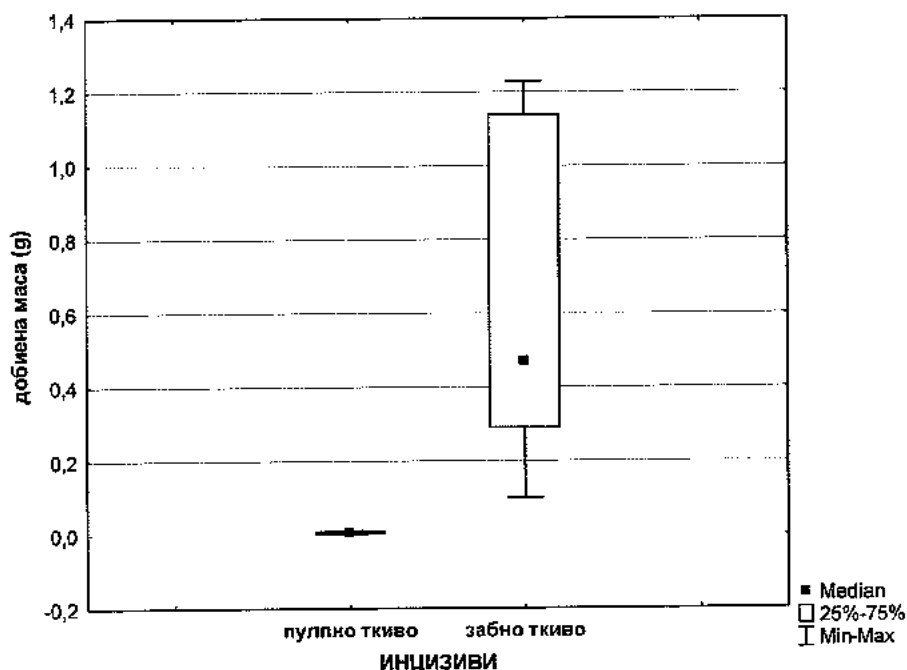
ИНЦИЗИВИ маса (g)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	0,006766	0,004642	0,007250	0,001320	0,011950
забно ткиво	5	0,646000	0,510127	0,470000	0,100000	1,230000

Mann-Whitney U Test:  $Z=-2,61116$ ;  $p=0,009024^*$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

За  $p<0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу пулпата и цврстото забно ткиво на ИНЦИЗИВИТЕ во однос на просечно добиената маса во грамови (Mann-Whitney U Test:  $Z=-2,611$ ;  $p=0,009$ ) во прилог на значајно поголема добиена маса од забното ткиво.

**График 16. Дескриптивна анализа на масата на пулпата и на забното ткиво - инцизиви**



### 5.1.1.2. Споредба на изолирана ДНК од пулпата и од цврстото забно ткиво

Во табелата 19 се прикажани добиените вредности на изолираната ДНК во ng/μl од пулпата и од цврстото забно ткиво (дентин и цементин).

**Табела 19. Изолирана ДНК од пулпата и од забното ткиво - инцизиви**

Број	ИНЦИЗИВИ - изолирана ДНК (ng/μl)	
	пулпа	забно ткиво
1	0,0558	0,0575
2	0,1890	0,0446
3	0,0606	0,00211
4	0,0170	0,0155
5	0,3060	0,0114

Просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата на примерокот од пет ИНЦИЗИВИ, изнесува  $0,1257 \pm 0,1198$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,017 и максимална вредност од 0,306 ng/ $\mu$ l (табела 20). Анализата покажа дека кај 50% од пулпата од инцизивите во примерокот, просечната изолирана ДНК од пулпата била поголема од 0,061 ng/ $\mu$ l (табела 20). Во однос на изолираната ДНК од забното ткиво, анализата покажа дека просечната вредност на добиената ДНК изнесува  $0,026 \pm 0,024$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,002 и максимална вредност од 0,057 ng/ $\mu$ l (табела 18). Анализата покажа дека кај 50% од забното ткиво на инцизивите во примерокот, просечната изолирана ДНК е поголема од 0,015 ng/ $\mu$ l (табела 20 и график 17).

Табела 20. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од пулпата и од забното ткиво - инцизиви

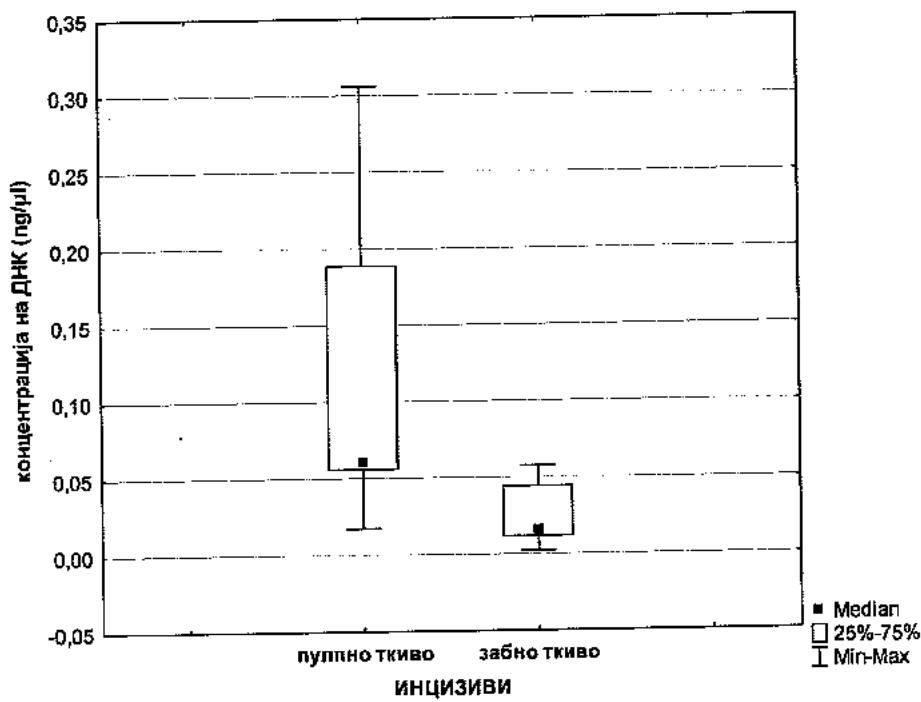
ИНЦИЗИВИ изолирана ДНК (ng/ $\mu$ l)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	0,125688	0,119839	0,060600	0,017040	0,306000
забно ткиво	5	0,026222	0,023623	0,015500	0,002110	0,057500

Mann-Whitney U Test: Z=1,984485; p=0,047203\*

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

За  $p < 0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу пулпата и цврстото забно ткиво на ИНЦИЗИВИТЕ во однос на просечната изолирана ДНК (Mann-Whitney U Test: Z=1,984485; p=0,047203) во прилог на значајно повеќе изолирана ДНК од пулпата (табела 20 и график 17).

График 17. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од пулпата и од забното ткиво - инцизиви



Дополнителната анализа на изолираната ДНК од грам пулпа наспроти забното ткиво на ИНЦИЗИВИ, за  $p < 0,05$ , покажа сигнификантна разлика помеѓу двете групи (Mann-Whitney U Test:  $Z=2,611$ ;  $p=0,009$ ) во прилог на значително поголема количина на ДНК по грам од пулпата (табела 21).

Табела 21. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од грам пулпа и од забно ткиво - инцизиви

ИНЦИЗИВИ изолирана ДНК од грам ткиво (ng/µl/g)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	23,36903	19,63061	18,01716	4,669456	45,90909
забно ткиво	5	0,05352	0,05808	0,03298	0,009268	0,15379

Mann-Whitney U Test:  $Z=2,611165$ ;  $p=0,009024^*$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

## 5.2.2. Пулпа и цврсто забно ткиво - ПРЕМОЛАРИ

### 5.2.2.1. Споредба на добиената маса од пулпата и од цврстото забно ткиво

Добиената маса во грамови од пулпата и од цврстото забно ткиво, од примерокот на ПРЕМОЛАРИ, е прикажана во табелата 22, подолу во текстот.

Табела 22. Маса на пулпата и на забното ткиво - премолари

Број	ПРЕМОЛАРИ - маса (g)	
	пулпа	забно ткиво
1	0,00812	1,03
2	0,01700	0,22
3	0,01658	0,71
4	0,00754	1,00
5	0,01026	1,02

Согласно со дескриптивната анализа на масата на пулпата од примерокот од пет ПРЕМОЛАРИ, согледано е дека просечната вредност на добиената маса (тежина) на пулпата изразена во грамови изнесува  $0,012 \pm 0,005$  грама со минимална вредност од 0,00754 и максимална вредност од 0,017 грама (табела 23). Анализата покажа дека кај 50% од премоларите во примерокот, просечната маса на пулпата била поголема од 0,01 грама (табела 23).

Табела 23. Дескриптивна анализа на масата на пулпата и на забното ткиво - премолари

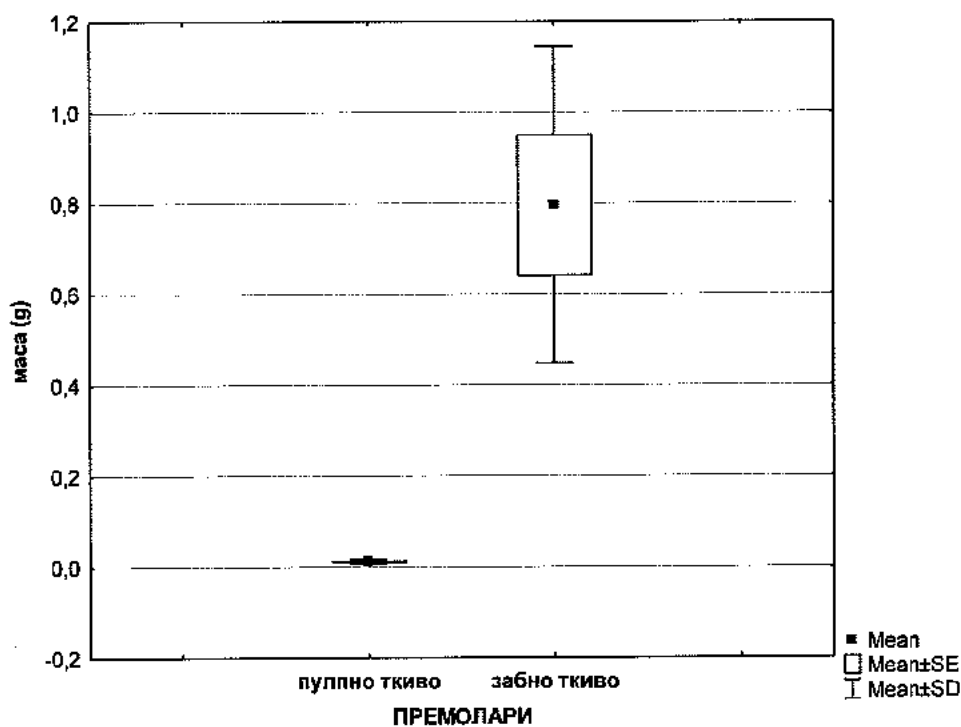
ПРЕМОЛАРИ маса (g)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	0,011900	0,004580	0,010260	0,007540	0,017000
забно ткиво	5	0,796000	0,348468	1,000000	0,220000	1,030000

Mann-Whitney U Test:  $Z = -2,61116$ ;  $p = 0,009024^*$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Во однос на масата од забното ткиво, анализата покажа дека просечната вредност на добиената маса забно ткиво изнесува  $0,796 \pm 0,348$  грама со минимална вредност од 0,22 и максимална вредност од 1,03 грама (табела 23). Анализата покажа дека кај 50% од премоларите во примерокот, просечната маса на пулпата била поголема од 1,00 грама (табела 23 и график 18). За  $p < 0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу пулпата и цврстото забно ткиво на ПРЕМОЛАРИТЕ во однос на просечната добиена маса во грамови (Mann-Whitney U Test:  $Z = -2,611$ ;  $p = 0,009$ ) во прилог на значајно поголема добиена маса од забното ткиво.

График 18. Дескриптивна анализа на масата на пулпата и на забното ткиво – премолари



Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на добиената маса од пулпата и од цврстото забно ткиво е даден во графикот 18, погоре во текстот.

### 5.2.2.2. Споредба на изолираната ДНК од пулпата и од цврстото забно ткиво

Вредностите на изолираната ДНК во  $\text{ng}/\mu\text{l}$  од пулпата и од цврстото забно ткиво на ПРЕМОЛАРИ се прикажани во табелата 24. Просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата на анализираниите ПРЕМОЛАРИ, изнесува  $0,131 \pm 0,082 \text{ ng}/\mu\text{l}$  со минимална вредност од 0,045 и максимална вредност од  $0,227 \text{ ng}/\mu\text{l}$  (табела 20). Анализата покажа дека кај 50% од пулпата од премоларите во примерокот, просечната изолирана ДНК е поголема од  $0,1008 \text{ ng}/\mu\text{l}$  (табела 25).

Табела 24. Изолирана ДНК од пулпата и од забното ткиво - премолари

Број	ПРЕМОЛАРИ - изолирана ДНК ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	
	пулпа	забно ткиво
1	0,0735	0,0504
2	0,2094	0,0343
3	0,1008	0,0110
4	0,2271	0,0311
5	0,0453	0,0538

Анализата на изолираната ДНК од забното ткиво (дентин и цементин) покажа дека просечната вредност на добиената ДНК изнесува  $0,0361 \pm 0,0172 \text{ ng}/\mu\text{l}$  со минимална вредност од 0,011 и максимална вредност од  $0,0538 \text{ ng}/\mu\text{l}$  (табела 25). Анализата покажа дека кај 50% од забното ткиво на премоларите во примерокот, просечната изолирана ДНК е поголема од  $0,0343 \text{ ng}/\mu\text{l}$  (табела 24 и график 19).

Табела 25. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од пулпата и од забното ткиво - премолари

ПРЕМОЛАРИ изолирана ДНК ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	0,131220	0,082074	0,100800	0,045300	0,227100
забно ткиво	5	0,036120	0,017147	0,034300	0,011000	0,053800

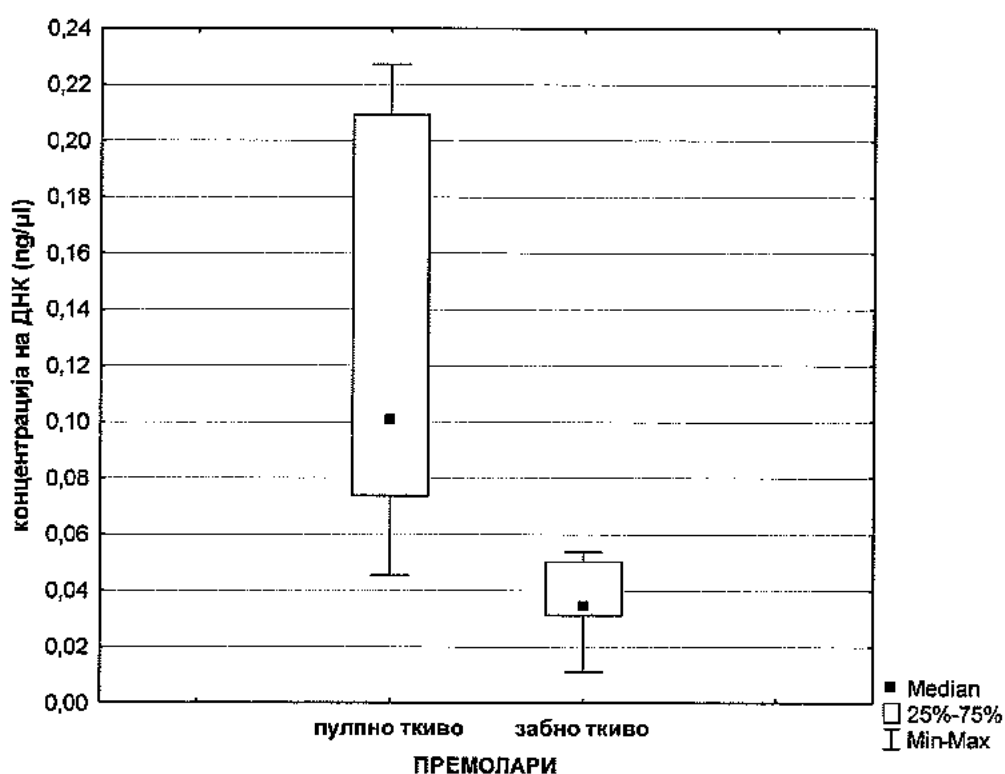
Mann-Whitney U Test:  $Z=2,193378$ ;  $p=0,028281^*$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$



За  $p < 0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу пулпата и цврстото забно ткиво на ПРЕМОЛАРИТЕ во однос на просечно изолираната ДНК (Mann-Whitney U Test:  $Z=2,193$ ;  $p=0,0283$ ) во прилог на значајно повеќе изолирана ДНК од пулпата (табела 25 и график 19).

График 19. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од пулпата и од забното ткиво - премолари



Дополнителната анализа на изолираната ДНК од грам пулпа наспроти забно ткиво, на ПРЕМОЛАРИ, за  $p < 0,05$ , покажа на сигнификантна разлика помеѓу двете групи (Mann-Whitney U Test:  $Z=2,611$ ;  $p=0,009$ ) во прилог на значително поголема количина ДНК по грам од пулпата (табела 26).

**Табела 26. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од грам пулпа и од забно ткиво – премолари**

ПРЕМОЛАРИ изолирана ДНК од грам ткиво (ng/μl/g)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	12,39671	10,35492	9,051724	4,415205	30,11936
забно ткиво	5	0,06084	0,05520	0,048932	0,015493	0,15591

Mann-Whitney U Test: Z=2,611165; p=0.009024\*

\*сигнификантно за p<0,05

### 5.2.3. Пулпа и цврсто забно ткиво - МОЛАРИ

#### 5.2.3.1. Споредба на добиената маса од пулпата и од цврстото забно ткиво

Масата во грамови, добиена од пулпата и од цврстото забно ткиво во примерокот на МОЛАРИ, е прикажана во табелата 27, подолу во текстот.

**Табела 27. Маса на пулпата и на забното ткиво - молари**

Број	МОЛАРИ - маса (g)	
	пулпа	забно ткиво
1	0,02808	0,55
2	0,00988	1,92
3	0,01098	1,53
4	0,01856	2,61
5	0,01098	2,26

Согласно со дескриптивната анализа на масата на пулпата од примерокот на МОЛАРИ, согледано е дека просечната вредност на добиената маса од пулпата изразена во грамови изнесува  $0,0157 \pm 0,0077$  грама со минимална вредност од

0,0099 и максимална вредност од 0,0281 грама (табела 28). Анализата покажа дека кај 50% од моларите во примерокот, просечната добиена маса на пулпата била поголема од 0,01098 грама (табела 28).

Табела 28. Дескриптивна анализа на масата на пулпата и на забното ткиво - молари

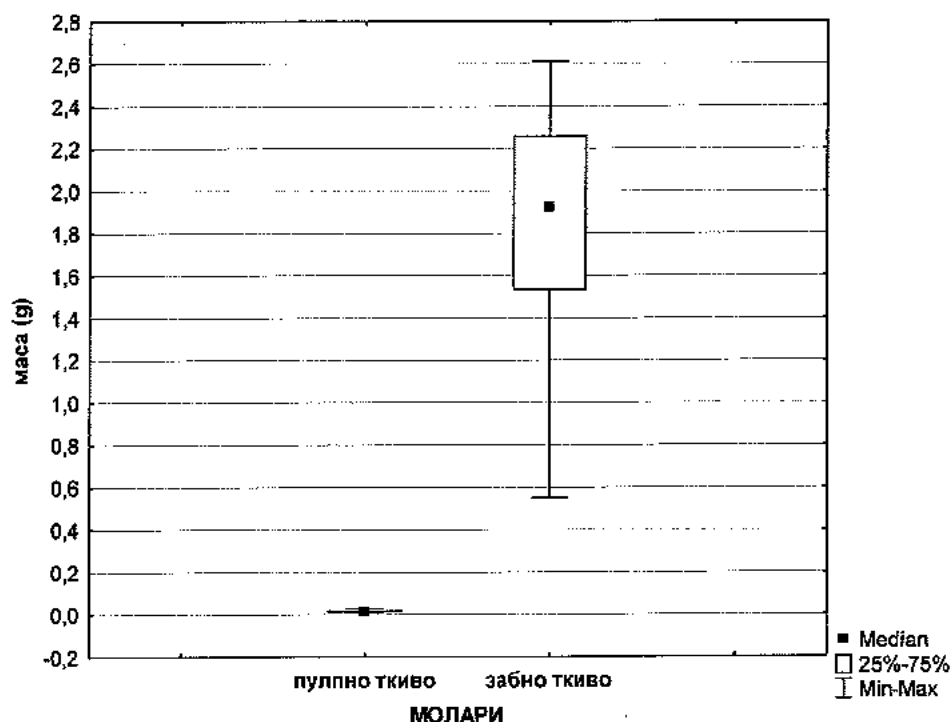
МОЛАРИ маса (g)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	0,015696	0,007744	0,010980	0,009880	0,028080
забно ткиво	5	1,774000	0,792799	1,920000	0,550000	2,610000

Mann-Whitney U Test:  $Z=-2,61116$ ;  $p=0,009024^*$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Во однос на анализата на добиената маса од забното ткиво, согледано е дека нејзината просечната вредност изнесува  $1,774 \pm 0,793$  грама со минимална вредност од 0,55 и максимална вредност од 2,61 грам (табела 28). Анализата покажа дека кај 50% од моларите во примерокот, просечната маса на пулпата била поголема од 1,92 грама (табела 28 и график 20). За  $p<0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу пулпата и цврстото забно ткиво на МОЛАРИТЕ во однос на просечно добиената маса во грамови (Mann-Whitney U Test:  $Z=-2,611$ ;  $p=0,009$ ) во прилог на значајно поголема добиена маса од забното ткиво.

График 20. Дескриптивна анализа на масата на пулпата и на забното ткиво – молари



Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на добиената маса од пулпата и од цврстото забно ткиво е даден во графикот 20, погоре во текстот.

#### 5.2.3.2. Споредба на изолираната ДНК од пулпата и од цврстото забно ткиво

Вредностите на изолираната ДНК во  $\text{ng}/\mu\text{l}$  од пулпата и од цврстото забно ткиво на МОЛАРИ се прикажани во табелата 29. Просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата на примерокот на МОЛАРИ, изнесува  $3,1169 \pm 4,3842 \text{ ng}/\mu\text{l}$  со минимална вредност од 0,1998 и максимална вредност од 10,6056  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (табела 30). Анализата покажа дека кај 50% од пулпата од моларите во примерокот, просечната изолирана ДНК од пулпата била поголема од 1,0195  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (табела 30).

Табела 29. Изолирана ДНК од пулпата и од забното ткиво – молари

Број	МОЛАРИ - изолирана ДНК (ng/μl)	
	пулпа	забно ткиво
1	1,0195	1,0100
2	3,4344	0,0966
3	10,6056	0,0116
4	0,1998	0,2045
5	0,3251	0,0164

Анализата на изолираната ДНК од забното ткиво (дентин и цементин), покажа дека просечната вредност на добиената ДНК од МОЛАРИТЕ изнесува  $0,26782 \pm 0,422202$  ng/μl со минимална вредност од 0,0116 и максимална вредност од 1,01 ng/μl (табела 30). Анализата покажа дека кај 50% од забното ткиво на инцизивите во примерокот, просечната изолирана ДНК била поголема од 0,0966 ng/μl (табела 30 и график 19).

Табела 30. Дескриптивна анализа на добиена ДНК од пулпата и од забното ткиво – молари

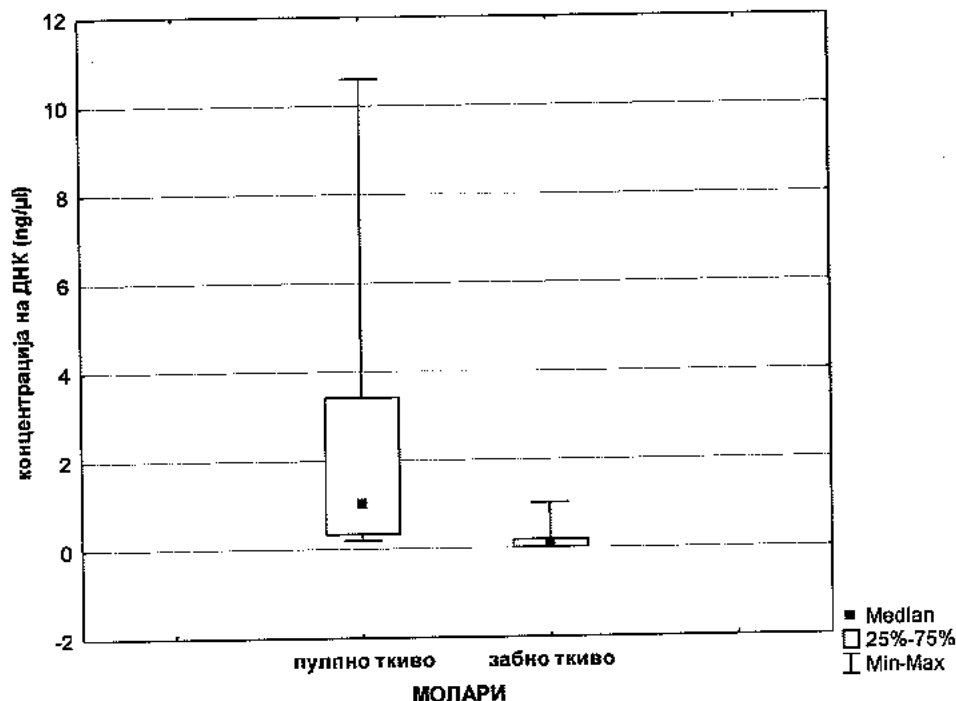
МОЛАРИ изолирана ДНК (ng/μl)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	3,116880	4,384181	1,019520	0,199800	10,60560
забно ткиво	5	0,267820	0,422202	0,096600	0,011600	1,01000

Mann-Whitney U Test:  $Z=1,984485$ ;  $p=0,047203^*$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

За  $p<0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу пулпата и цврстото забно ткиво на МОЛАРИТЕ во однос на просечно изолираната ДНК (Mann-Whitney U Test:  $Z=1,9845$ ;  $p=0,0472$ ) во прилог на значајно повеќе изолирана ДНК од пулпата (табела 30 и график 21).

График 21. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од пулпата и од забното ткиво - молари



Дополнителната анализа на изолираната ДНК од грам пулпа наспроти забно ткиво, на МОЛАРИ, за  $p < 0,05$ , покажа на сигнификантна разлика помеѓу двете групи (Mann-Whitney U Test:  $Z=2,6112$ ;  $p=0,009$ ) во прилог на значително поголема количина на ДНК по грам од пулпата (табела 31).

Табела 31. Дескриптивна анализа на добиената ДНК од грам пулпа и од забно ткиво – молари

МОЛАРИ изолирана ДНК од грам ткиво (ng/μl/g)	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
пулпа	5	278,0385	409,1404	36,30769	10,76509	965,9016
забно ткиво	5	0,3960	0,8058	0,05031	0,00726	1,8364

Mann-Whitney U Test:  $Z=2,611165$ ;  $p=0,009024^*$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

#### 5.2.4. Изолирана маса од пулпа - споредба помеѓу инцизиви, премолари и молари

Трите групи заби (инцизиви, премолари и молари) се споредувани во однос на просечната добиена маса од пулпата (табела 32). Анализата покажа дека, за  $p > 0,05$ , не е утврдена сигнификантна разлика помеѓу трите групи заби во однос на просечно добиената маса од пулпата (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=4,2275$ ,  $df=2$ ,  $p=0,1208$ ).

Табела 32. Споредба на добиената маса од пулпата помеѓу групи заби

Добиена маса од пулпата (g)			
Групи заби	број	Просек (Means)	p
Инцизиви	5	0,006766	Kruskal-Wallis ANOVA test: $H=4,227$ , $df=2$ , $p=0,1208$
Премолари	5	0,011900	
Молари	5	0,015696	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

#### 5.2.5. Изолирана ДНК од пулпата - споредба помеѓу инцизиви, премолари и молари

Направена е споредба на трите групи заби (инцизиви, премолари и молари) во однос на просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата (табела 33). Анализата покажа дека за  $p < 0,05$  постои статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи заби во однос на просечната изолирана ДНК од пулпата (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=7,44$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0242$ ).

Табела 33. Споредба на изолираната ДНК од пулпата помеѓу групи заби

Изолирана ДНК од пулпата (ng/ $\mu$ l)			
Групи заби	број	Просек (Means)	p
Инцизиви	5	0,125688	Kruskal-Wallis ANOVA test: H=7,44, df=2, p=0,0242*
Премолари	5	0,131220	
Молари	5	3,116880	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Дополнителната мултиплекс споредба на просекот на рангови за изолирана ДНК од пулпата помеѓу трите групи заби, за  $p < 0,05$  укажува на постоење на сигнификантна разлика (табела 34). Просечната изолирана ДНК од пулпата во групата молари, сигнификантно се разликува во однос на групата инцизиви, а несигнификантно се разликува во однос на онаа од премоларите. За  $p < 0,05$ , нема сигнификантна разлика помеѓу инцизивите и премоларите во однос на изолираната ДНК од пулпата.

Табела 34. Мултиплекс споредба на просек на рангови помеѓу групи заби

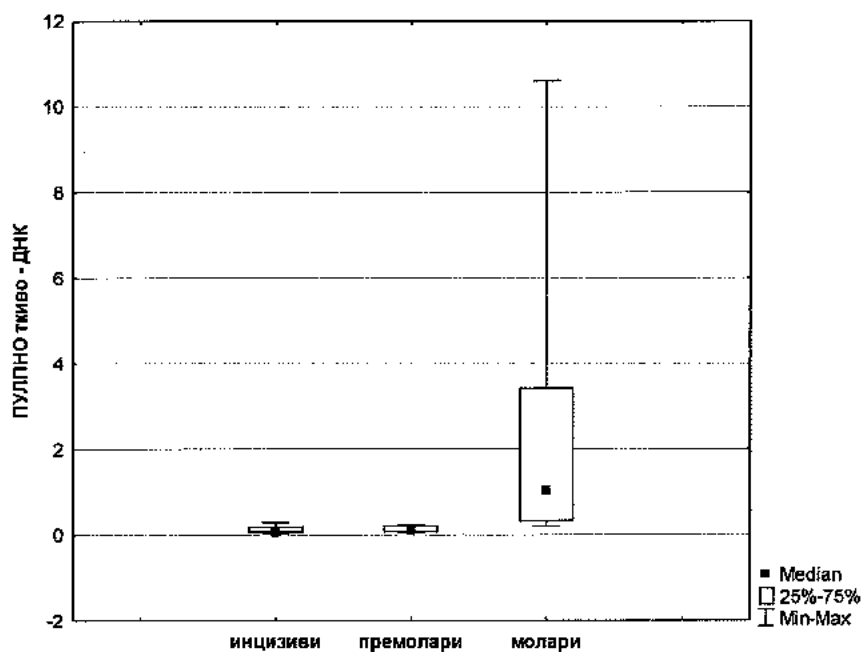
Multiple comparisons of mean ranks for al. groups (Kruskal-Wallis ANOVA test: H=7,44, df=2, p=0,0242*)			
Групи заби	Инцизиви	Премолари	Молари
Инцизиви		1,000000	0,032728*
Премолари	1,000000		0,101685
Молари	0,032728*	0,101685	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Дескриптивниот приказ на просекот на изолирана ДНК помеѓу трите групи заби е даден на графикот 22, подолу во текстот.



График 22. Дескриптивен приказ на изолираната ДНК од пулпата - групи заби



### 5.2.6. Изолирана маса од забното ткиво - споредба помеѓу инцизиви, премолари и молари

Во табелата 35 е прикажана споредбата на трите групи заби во однос на просечната добиена маса од забното ткиво (дентин и цементин). Анализата покажа дека за  $p < 0,05$  е согледана сигнификантна разлика помеѓу трите групи заби во однос на просечната добиена маса од забното ткиво (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=5,46$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0452$ ).

Табела 35. Споредба на добиената маса од забното ткиво помеѓу групи заби

Добиена маса од забно ткиво (g)			
Групи заби	број	Просек (Means)	p
Инцизиви	5	0,646000	Kruskal-Wal.is ANOVA test: $H=5,46$ , $df=2$ , $p=0,0452$
Премолари	5	0,796000	
Молари	5	1,774000	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

**5.2.7. Изолирана ДНК од забното ткиво - споредба помеѓу инцизиви, премолари и молари**

Направена е споредба на трите групи заби во однос на просечната вредност на изолираната ДНК од забното ткиво (табела 36). За  $p < 0,05$  е согледана сигнификантна разлика помеѓу трите групи во однос на просечната изолирана ДНК од забното ткиво (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=9,50$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0087$ ).

**Табела 36. Споредба на изолираната ДНК од забното ткиво помеѓу групи заби**

Изолирана ДНК од забно ткиво (ng/μl)			
Групи заби	број	Просек (Means)	p
Инцизиви	5	0,026222	Kruskal-Wal.is ANOVA test: $H=9,50$ , $df=2$ , $p=0,0087^*$
Премолари	5	0,036120	
Молари	5	0,318220	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

### 5.3. Трет дел на истражувањето

Во рамките на третиот дел од истражувањето, примерокот од вкупно 48 молари примарно е поделен на четири групи од по 12 заби поставени во различни услови и тоа: а) надворешна средина; б) внатрешна средина (фрижидер на +4°C); в) водна средина и г) земја. Секоја од четирите групи заби е анализирана на две недели во период од два месеца и тоа во однос на добиената маса (g), концентрацијата на ДНК (ng/μl) и концентрацијата на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб). Анализата во овој дел од истражувањето има за цел да го утврди влијанието на средината врз екстрахираната ДНК.

#### 5.3.1. Надворешна средина

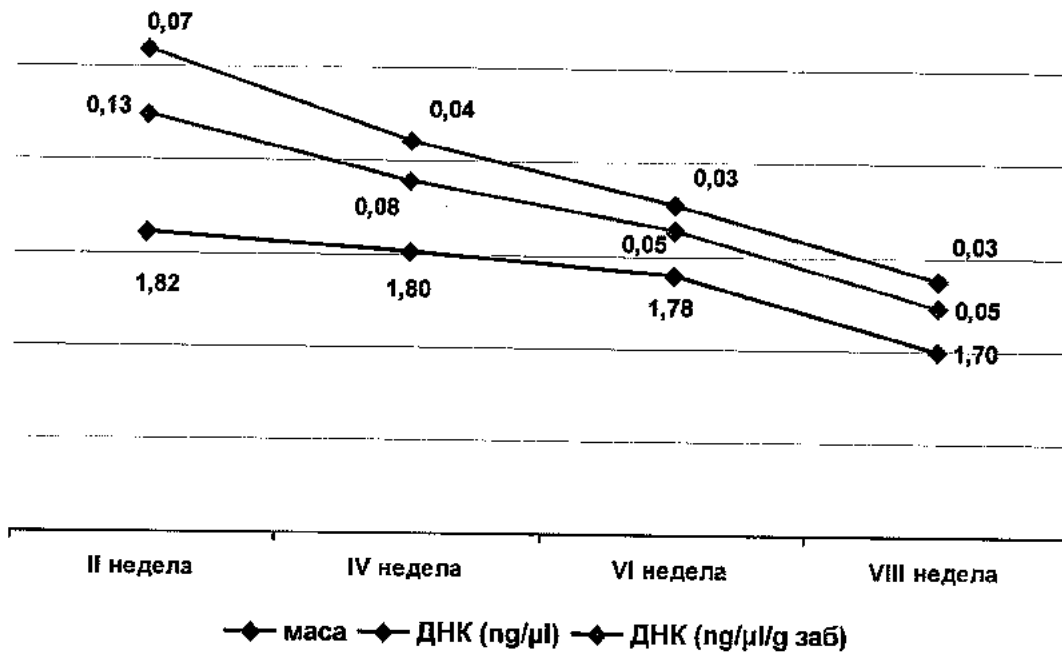
Просечните вредности од спроведените мерења на 12 заби во услови на НАДВОРЕШНАТА СРЕДИНА се прикажани во табелата 37. Направени се четири мерења на масата на забот во грамови, концентрацијата на ДНК и концентрацијата на ДНК на грам заб и тоа во четири временски точки (втора, четврта, шеста и осма недела).

Табела 37. Просечни вредности на параметрите на заби во надворешна средина во четири временски точки

Време на мерење	НАДВОРЕШНА СРЕДИНА Просек (means)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
II недела	1,823333	0,126933	0,070273
IV недела	1,803333	0,075833	0,042323
VI недела	1,780000	0,049200	0,026323
VIII недела	1,700000	0,045667	0,029410

Графичкиот приказ на просечните вредности од мерењата на параметрите од интерес направени во четири временски точки е даден на графикот 23.

График 23. Просечни вредности на параметрите на заби во надворешна средина во четири временски точки



Согласно со табелата 37, анализата на темпото на просечното намалување на вредностите на испитуваните параметри на примерокот на заби во надворешна средина во IV недела, VI недела и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот - 1,097% v.s. 2,376% v.s. 6,764%; б) концентрација на ДНК - 40,257% v.s. 61,239% v.s. 64,023% и в) концентрација на ДНК на грам заб - 39,594% v.s. 60,294% v.s. 61,413%.

Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај трите испитувани параметри во надворешна средина (табела 37). Најголемото просечно намалување на добиената маса од забот при престој во надворешна средина, се случува помеѓу VI и VIII недела од престојот и изнесува 4,39%. Најголемото просечно намалување на концентрацијата на ДНК добиена од забите оставени во

надворешна средина, се случува помеѓу II и IV недела (40,26%) и IV и VI недела (20,98%) додека во интервалот од VI до VIII недела просечното намалување изнесува само 2,78% (табела 38).

Табела 38. Темпо на просечно намалување на параметрите на заб во надворешна средина

Време на мерење	НАДВОРЕШНА СРЕДИНА Темпо на просечно намалување (%)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
II недела	/	/	/
IV недела	1,096892	40,25746	39,59435
VI недела	2,376582	61,23939	60,29648
VIII недела	6,764151	64,02275	61,41261

### 5.3.2. Внатрешна средина (контролирана деградација во фрижидер на +4°C)

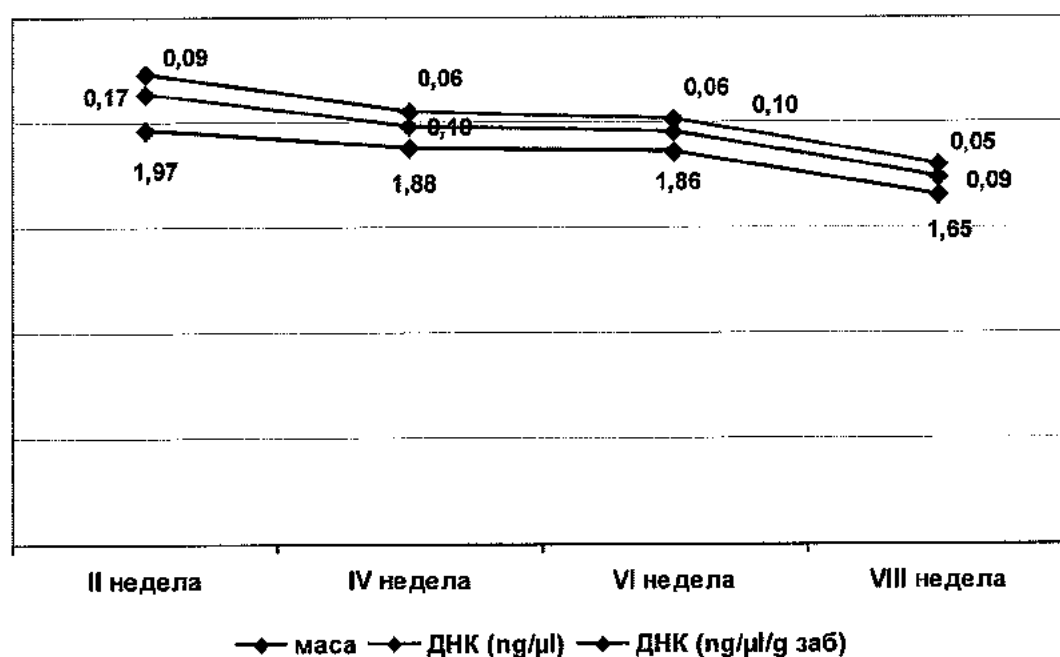
Во табелата 39 се прикажани просечните вредности од спроведените мерења на 12 заби ставени во услови на ВНАТРЕШНА СРЕДИНА.

Табела 39. Просечни вредности на параметрите на заби во внатрешна средина во четири временски точки

Време на мерење	ВНАТРЕШНА СРЕДИНА Просек (means)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
II недела	1,966667	0,174867	0,092427
IV недела	1,883333	0,103100	0,062520
VI недела	1,860000	0,096967	0,058603
VIII недела	1,653333	0,091973	0,052833

Направени се четири мерења на масата на забот во грамови, концентрацијата на ДНК и концентрацијата на ДНК на грам заб и тоа во четири временски точки (втора, четврта, шеста и осма недела). Графичкиот приказ на просечните вредности од мерењата направени во четири временски точки е даден на графикот 24.

График 24. Просечни вредности на параметрите на заби во внатрешна средина во четири временски точки



Анализата на темпото на просечното намалување на вредностите на испитуваните параметри на примерокот на заби во внатрешна средина во IV недела, VI недела и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот - 4,237% v.s. 5,424% v.s. 15,932%; б) концентрација на ДНК - 41,041% v.s. 44,548% v.s. 47,404% и в) концентрација на ДНК на грам заб - 31,357% v.s. 36,595% v.s. 42,837% (табела 39). Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај трите испитувани параметри на заби поставени во внатрешна средина.

Согласно со табелата 39, најголемото просечно намалување на добиената маса од забот се случува помеѓу VI и VIII недела од престојот во внатрешна средина и тоа за 10,51%. Најголемото намалување на концентрацијата на ДНК добиена од заби оставени во внатрешна средина се случува помеѓу II и IV недела (41,04%) додека намалувањето помеѓу IV и VI недела и VI и VIII недела изнесува консеквентно 3,51% и 2,86% (табела 40).

**Табела 40. Темпо на просечно намалување на параметрите на заб во внатрешна средина**

Време на мерење	ВНАТРЕШНА СРЕДИНА Темпо на просечно намалување (%)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
II недела	/	/	/
IV недела	4,237321	41,04091	32,35718
VI недела	5,423745	44,54814	36,59478
VIII недела	15,93223	47,40403	42,83756

### 5.3.3. Водна средина

Во рамките на истражувањето се прикажани и добиените просечни вредности од спроведените мерења на 12 заби во услови на ВОДНА СРЕДИНА. Направени се четири мерења и тоа на масата на забот во грамови, концентрацијата на ДНК и концентрацијата на ДНК на грам заб. Мерењата се правени во четири временски точки во II недела, IV недела, VI недела и VIII недела. Како споредбени се земени просечната вредност на анализираните параметри во II недела.

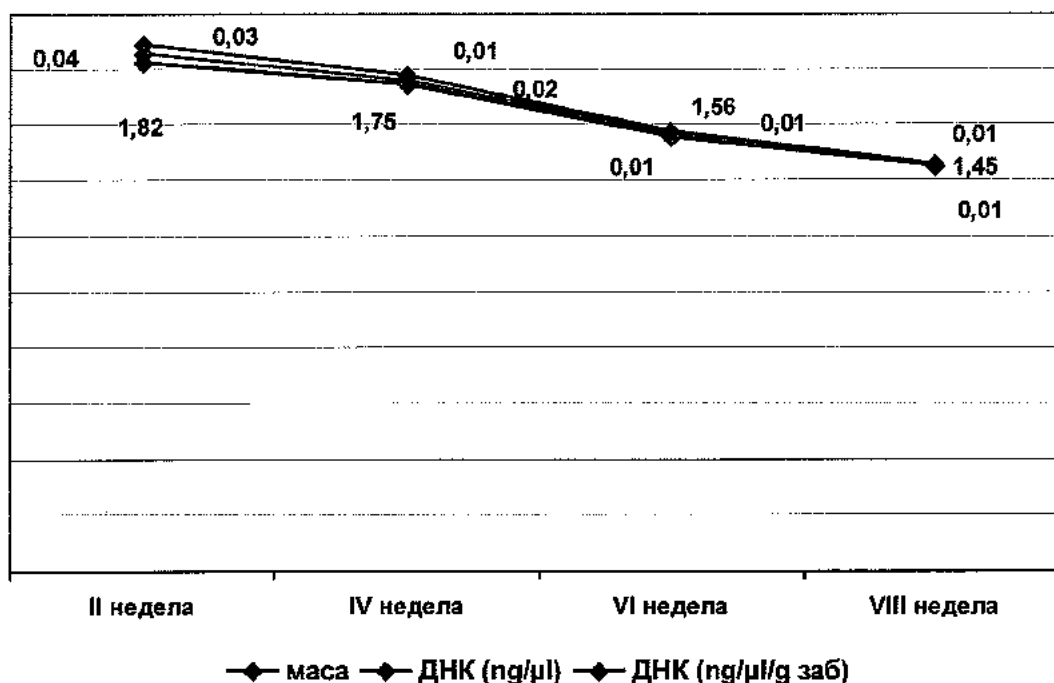
Табелерниот приказ на просечните вредности на анализираните параметри на забите поставени во водна средина се дадени во табелата 41, подолу во текстот.

Табела 41. Просечни вредности на параметри на заби во водна средина во четири временски точки

Време на мерење	ВОДНА СРЕДИНА Просек (means)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/ $\mu$ l)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)
II недела	1,823333	0,036433	0,028507
IV недела	1,746667	0,015437	0,013500
VI недела	1,560000	0,009387	0,006743
VIII недела	1,450000	0,006500	0,003913

Графичкиот приказ на просечните вредности од мерењата направени во четири временски точки е даден на графикот 25.

График 25. Просечни вредности на параметрите на заби во водна средина во четири временски точки





Анализата на темпото на просечното намалување на вредностите на испитуваните параметри на примерокот на заби ставени во водна средина во IV, VI и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот - 4,21% v.s. 14,4% v.s. 20,47%; б) концентрација на ДНК – 57,63% v.s. 74,23% v.s. 82,16% и в) концентрација на ДНК на грам заб – 52,64% v.s. 76,35% v.s. 86,27% (табела 42). Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај сите три испитувани параметри на заби поставени во водна средина.

Согласно со табелата 42, најголемото просечно намалување на добиената маса од забот се случува помеѓу IV и VI недела од престојот во водна средина (10,24%) следено со VI и VIII недела (6,03%). Најголемото намалување на концентрацијата на ДНК добиена од заби оставени во водна средина се случува помеѓу II и IV недела (57,62%) следено со IV и VI недела (16,61%) и VI и VIII недела 7,92% (табела 41).

**Табела 42. Темпо на просечно намалување на параметрите на заб во водна средина**

Време на мерење	ВОДНА СРЕДИНА Темпо на просечно намалување (%)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
II недела	/	/	/
IV недела	4,204717	57,62907	52,64321
VI недела	14,4424	74,2349	76,34616
VIII недела	20,47531	82,15903	86,27355

### 5.3.4. Земјена средина

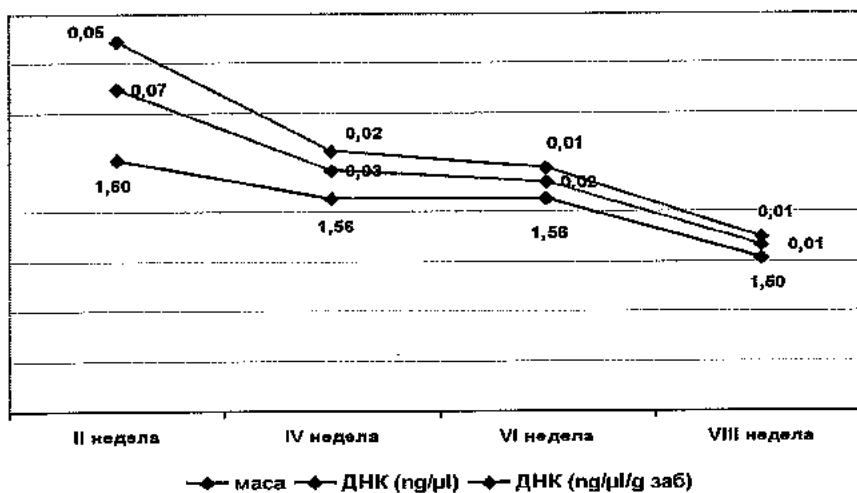
Во табелата 43 се прикажани просечните вредности од спроведените мерења на 12 заби ставени во ЗЕМЈА .

Табела 43. Просечни вредности на параметрите на заби ставени во земја во четири временски точки

Време на мерење	ЗЕМЈА Просек (means)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
II недела	1,603333	0,071000	0,048000
IV недела	1,563333	0,028723	0,020060
VI недела	1,563333	0,017233	0,014180
VIII недела	1,503333	0,013367	0,007917

Графичкиот приказ на просечните вредности од мерењата направени во четири временски точки е даден на графикот 26.

График 26. Просечни вредности на параметрите на заби во водна средина во четири временски точки (%)



Анализата на темпото на просечното намалување на вредностите на испитуваните параметри на примерокот на заби ставени во земја во IV недела, VI недела и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот – 2,49% v.s. 2,49% v.s. 6,24%; б) концентрација на ДНК – 59,55% v.s. 75,73% v.s. 81,17% и в) концентрација на ДНК на грам заб – 58,21% v.s. 70,46% v.s. 83,51% (табела 43). Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај сите три испитувани параметри на заби поставени во земја.

Согласно со табелата 44, најголемото просечно намалување на добиената маса од забот се случува помеѓу VI и VIII недела (3,74%). Најголемото намалување на концентрацијата на ДНК добиена од заби оставени во земја се случува помеѓу II и IV недела (59,54%) следуваат IV и VI недела (16,18%) и VI и VIII недела 6% (табела 44).

Табела 44. Темпо на просечно намалување на параметрите на заб ставен во земја

Време на мерење	ЗЕМЈА Темпо на просечно намалување (%)		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
II недела	/	/	/
IV недела	2,494803	59,54507	58,20833
VI недела	2,494803	75,72817	70,45833
VIII недела	6,237008	81,17324	83,50625

### 5.3.5. Споредување на концентрацијата на екстрахирана ДНК од заби во различни средини и временски точки

Во рамките на истражувањето е направена споредба на темпото на просечното намалување на концентрацијата екстрахирана на ДНК од заби во различни средини. Споредбата е правена во четирите анализирани средини (надворешна, внатрешна, вода и земја) и во три временски точки и тоа во IV недела, VI недела и VIII недела (табела 45).

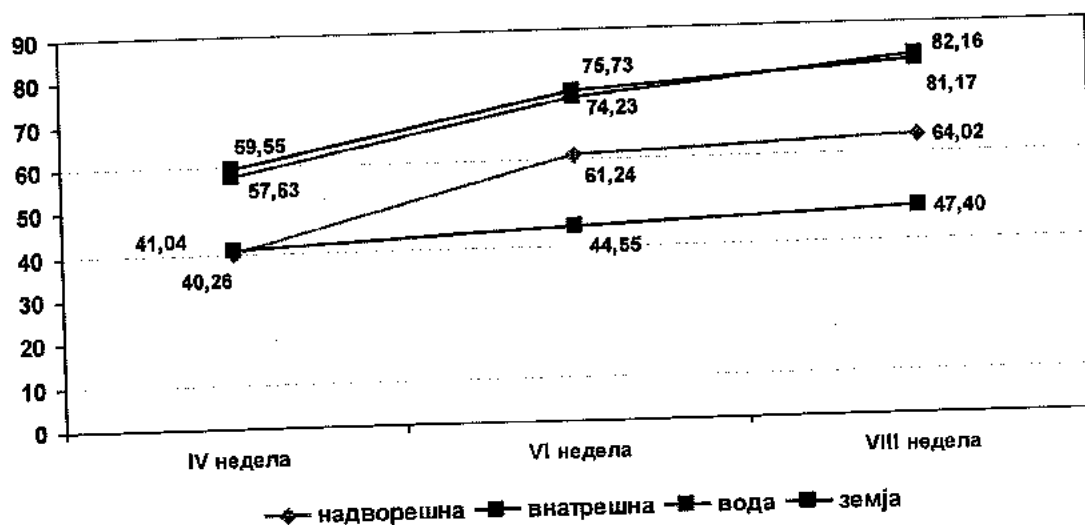
Табела 45. Темпо на просечно намалување на екстрахираната ДНК на заби во различна средина и во три временски точки (%)

Средина	Концентрација на ДНК (ng/μl) Темпо на просечно намалување (%)		
	IV недела	VI недела	VIII недела
Надворешна	40,25746	61,23939	64,02275
Внатрешна	40,04091	44,54814	47,40403
Вода	57,62907	74,2349	82,15903
Земја	59,54507	75,72817	81,17324

Анализата покажа дека најбрзо темпо на просечно намалување на концентрацијата на екстрахирана ДНК, во сите анализирани временски точки има во земјата (IV недела - 59,54%, VI недела - 75,73% и VIII недела - 81,17%) следено со скоро идентично темпо во водата (IV недела - 57,63%, VI недела - 74,23% и VIII недела - 82,16%). Темпото на просечно намалување на концентрацијата на екстрахираната ДНК во надворешната средина е побавно, споредено со земјата и водата и изнесува (IV недела - 40,26%, VI недела - 61,24% и VIII недела - 64,02%). Кај забите во внатрешната средина, согледано е најбавно темпо на просечно

намалување на концентрацијата на екстрахираната ДНК (IV недела - 40,04%, VI недела - 44,55% и VIII недела - 47,40%) т.е. во оваа средина губитокот на ДНК е двојно побавно споредено со земјата и водата и за четвртина побавно, споредено со надворешната средина (табела 45 и график 27).

График 27. Темпо на просечно намалување на екстрахираната ДНК на заби во различна средина и во три временски точки (%)



#### 5.4. Четврт дел на истражувањето

Четвртиот дел од истражувањето се однесува на испитување на можноста за изолација на ДНК од МЛЕЧНИТЕ ЗАБИ. Анализата е спроведена на 45 млечни заби поделени во три групи од по 15 заби и тоа: а) прва група - здрави заби со помала ресорпција; б) втора група - здрави заби со поголема ресорпција и в) трета група - кариозни заби со помал степен на ресорпција.

##### 5.4.1. Анализа на здрави млечни заби со помала ресорпција

Поединечните вредности од мерења на масата на заб, како и концентрацијата на изолираната ДНК од цврстото забно ткиво, на петнаесет ЗДРАВИ ЗАБИ СО ПОМАЛА РЕСОРПЦИЈА (молари и инзививи) се претставени во табелата 46.

Табела 46. Вредности од мерењата на здрави млечни заби со мала ресорпција

Број	ЗДРАВИ ЗАБИ СО МАЛА РЕСОРПЦИЈА		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
1	0,70	0,286	0,409
2	0,56	0,177	0,316
3	0,43	0,062	0,144
4	0,24	0,187	0,779
5	0,13	0,236	1,815
6	0,11	0,009	0,079
7	0,69	7,680	11,13
8	0,55	1,040	1,891
9	0,21	0,091	0,435
10	0,33	0,053	0,162
11	0,18	0,631	3,506
12	0,13	0,045	0,348
13	0,15	1,29	8,600
14	0,12	0,104	0,863
15	0,10	0,002	0,021

Согласно со дескриптивната анализа на примерокот од 15 млечни заби со помала ресорпција (ресорпција која е помала од половина од физиолошката должина на забот), просечната вредност на добиената маса (тежина) на заб изразена во грамови изнесува  $0,309 \pm 0,219$  грама со минимална вредност од 0,1 и максимална вредност од 0,7 грама (табела 47). Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната маса на заб била поголема од 0,29 грама.

Во однос на концентрацијата на добиената ДНК од здрави заби со помала ресорпција, анализата покажа дека нејзината просечната вредност изнесува  $0,793 \pm 1,944$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,002 и максимална вредност од 7,680 ng/ $\mu$ l (табела 47). Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,177 ng/ $\mu$ l.

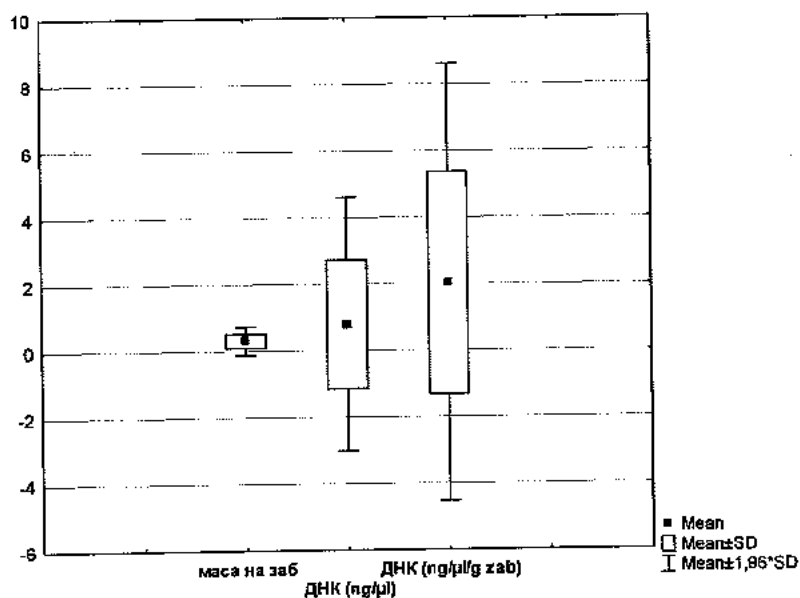
Во однос на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, анализата покажа дека нејзината просечната вредност изнесува  $2,033 \pm 3,348$  (ng/ $\mu$ l/g заб) со минимална вредност од 0,021 и максимална вредност од 11,13 (ng/ $\mu$ l/g заб) (табела 47). Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,435 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Табеларниот и графичкиот приказ на дескриптивната анализа на здрави заби со мала ресорпција се дадени во табелата 47 и графикот 28.

**Табела 47. Дескриптивна анализа на здрави млечни заби со мала ресорпција**

ЗАБИ СО МАЛА РЕСОРПЦИЈА	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
маса на заб (g)	15	0,308667	0,219378	0,290	0,1000	0,700
Концентрација на ДНК од заб (ng/ $\mu$ l)	15	0,792880	1,944370	0,177	0,0021	7,680
Концентрација на ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)	15	2,033200	3,348488	0,435	0,0210	11,130

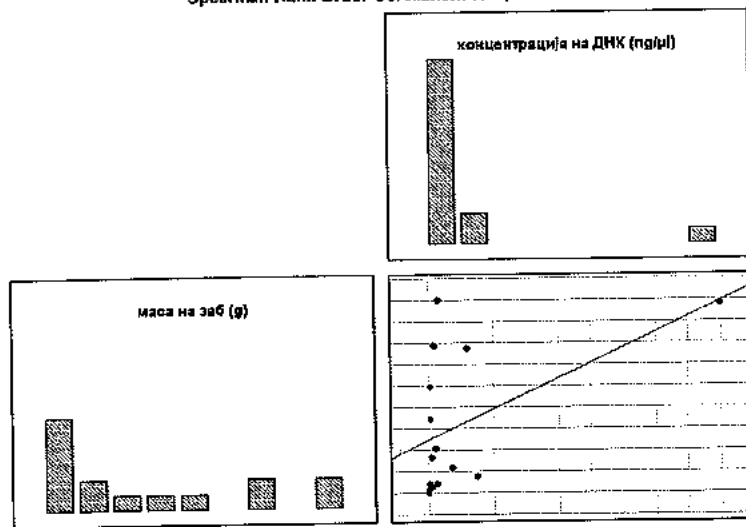
График 28. Дескриптивна анализа на здрави млечни заби со мала ресорпција



Анализата на меѓусебната зависност помеѓу масата на здрави заби со мала ресорпција и концентрацијата на добиената ДНК од заб, укажа на постоење на линеарна позитивна директна умерена корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R=0,542$ ,  $p<0,05$ ). Со зголемувањето на масата на забот, сигнификантно се зголемува концентрацијата на екстрахираната ДНК од забот.

График 29. Непараметарска корелација помеѓу масата на забот и концентрација на екстрахирана ДНК - здрави заби со мала ресорпција

Spearman Rank Order Corellation:  $R=0,541566$





#### 5.4.2. Анализа на здрави млечни заби со поголема ресорпција

Вредностите од мерењата на масата на заб, како и концентрацијата на изолираната ДНК од цврстото забно ткиво, на петнаесет ЗДРАВИ ЗАБИ СО ПОГОЛЕМА РЕСОРПЦИЈА (молари и инзививи со ресорпција на коренот на забот поголема од половина од неговата физиолошка должина) се претставени во табелата 48.

Табела 48. Вредности од мерења на здрави млечни заби со поголема ресорпција

Број	ЗДРАВИ ЗАБИ СО ПОГОЛЕМА РЕСОРПЦИЈА		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/ $\mu$ l)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)
1	0,33	0,00169	0,005
2	0,56	0,03450	0,062
3	0,08	0,03330	0,042
4	0,52	0,12700	0,244
5	0,29	0,00785	0,027
6	0,56	0,04020	0,072
7	0,79	0,01290	0,016
8	0,67	0,02120	0,032
9	0,71	0,23500	0,331
10	0,59	0,11600	0,197
11	0,62	0,03790	0,061
12	0,72	0,02800	0,039
13	0,6	0,02360	0,039
14	0,28	2,61000	9,321
15	0,29	0,04510	0,156

Согласно со дескриптивната анализа, просечната вредност на добиената маса (тежина) на забите со поголема ресорпција изразена во грамови изнесува

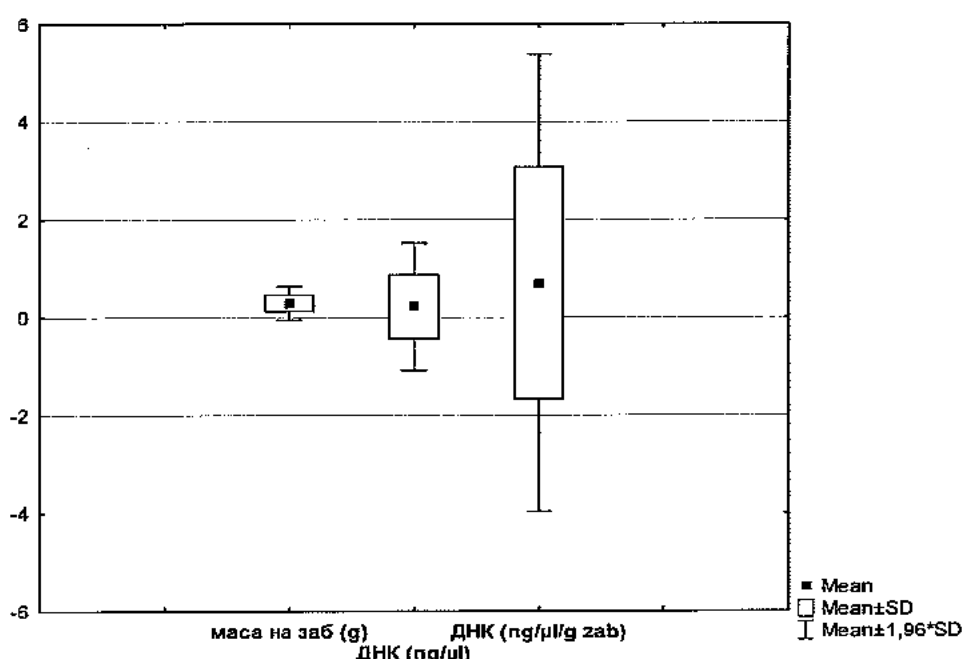
0,555±0,1803 грама со минимална вредност од 0,08 и максимална вредност од 0,7 грама (табела 48 и график 29). Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната маса на заб била поголема од 0,21 грам. Во однос на концентрацијата на добиената ДНК од здрави заби со поголема ресорпција, анализата покажа дека нејзината просечната вредност изнесува 0,225±0,663 ng/µl со минимална вредност 0,002 и максимална вредност од 2,610 ng/µl (табела 48 и график 29). Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,035 ng/µl. Во однос на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, анализата покажа дека нејзината просечна вредност изнесува 0,7096±2,3842 ng/µl/g заб со минимална вредност од 0,00500 и максимална вредност од 9,321 (ng/µl/g заб) (табела 49 и график 29). Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,061 (ng/µl/g заб).

Табела 49. Дескриптивна анализа на здрави млечни заби со поголема ресорпција

ЗАБИ СО ПОГОЛЕМА РЕСОРПЦИЈА	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
Маса на заб (g)	15	0,295333	0,176225	0,210000	0,110000	0,800000
Концентрација на ДНК од заб (ng/µl)	15	0,224949	0,662640	0,0345	0,001690	2,610
Концентрација на ДНК на грам заб (ng/µl/g заб)	15	0,709600	2,384172	0,06100	0,00500	9,321

Табеларниот и графичкиот приказ на дескриптивната анализа на здрави заби со поголема ресорпција се дадени во табелата 49 и графикот 30.

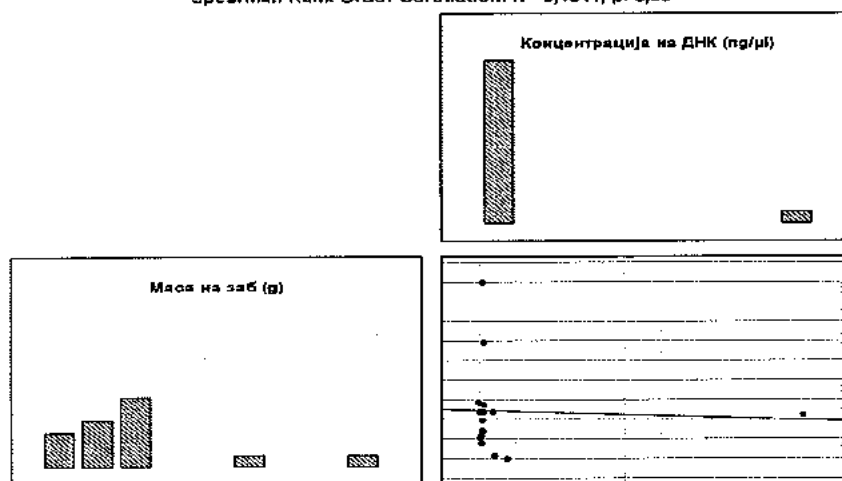
График 30. Дескриптивна анализа на здрави заби со поголема ресорпција



Анализата на меѓусебната зависност помеѓу масата на здрави заби со поголема ресорпција и концентрацијата на добиената ДНК од заб, укажа на постоење на линеарна позитивна индиректна незначајна корелација (Spearman Rank Order Correlation:  $R=-0,1541$ ,  $p>0,05$ ) (График 31).

График 31. Непараметарска корелација помеѓу масата на забот и концентрацијата на екстрахирана ДНК - здрави млечни заби со поголема ресорпција

Spearman Rank Order Correlation:  $R=-0,1641$ ,  $p>0,05$



### 5.4.3. Анализа на млечни кариозни заби

Вредностите од мерењата на масата на заб, како и концентрацијата на изолираната ДНК од цврстото забно ткиво, на петнаесет МЛЕЧНИ КАРИОЗНИ ЗАБИ (молари и инцизиви со помал степен на ресорпција) се претставени во табелата 50.

Табела 50. Вредности од мерења на млечни кариозни заби

Број	МЛЕЧНИ КАРИОЗНИ ЗАБИ		
	Маса на заб (g)	Концентрација на ДНК (ng/μl)	Концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб)
1	0,26	0,0209	0,080
2	0,28	0,0755	0,270
3	0,69	0,1400	0,203
4	0,32	1,1600	3,625
5	0,48	0,0103	0,021
6	0,35	0,4830	1,380
7	0,26	0,0491	0,189
8	0,26	0,0241	0,093
9	0,27	0,3870	1,433
10	0,30	0,0204	0,068
11	0,28	0,0371	0,133
12	0,10	0,0390	0,390
13	0,11	0,0174	0,158
14	0,22	0,0543	0,247
15	0,35	0,0461	0,132

Просечната добиена маса (тежина) од испитуваните млечни кариозни заби изразена во грамови изнесува  $0,302 \pm 0,141$  грама со минимална вредност од 0,1 и максимална вредност од 0,69 грама (табела 51 и график 32). Анализата покажа

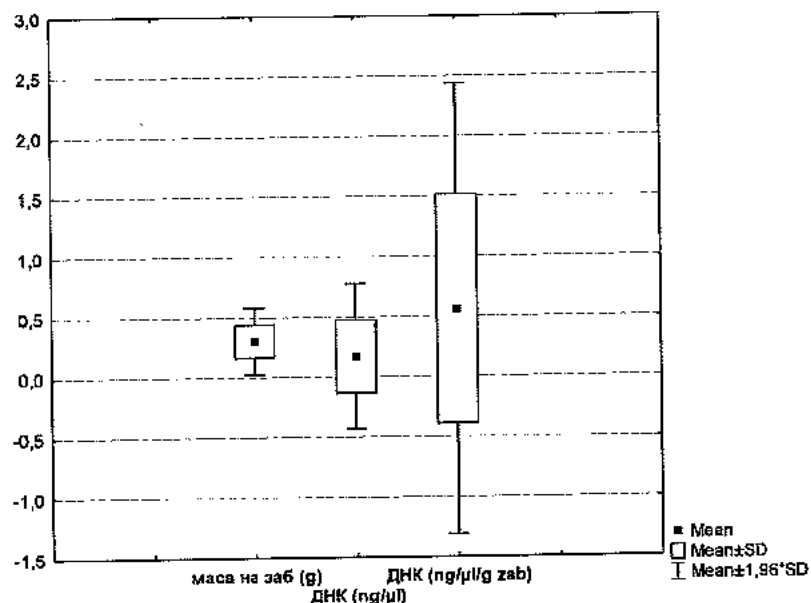
дека кај 50% од забите во примерокот, просечната маса на заб била поголема од 0,28 грама. Во однос на концентрацијата на добиената ДНК од млечни кариозни заби, анализата покажа дека нејзината просечната вредност изнесува  $0,171 \pm 0,308$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност 0,01 и максимална вредност од 1,16 ng/ $\mu$ l (табела 51 и график 32). Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,046 ng/ $\mu$ l. Во однос на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, анализата покажа дека нејзината просечна вредност изнесува  $0,5615 \pm 0,9567$  ng/ $\mu$ l/g заб со минимална вредност од 0,02 и максимална вредност од 3,62 (ng/ $\mu$ l/g заб) (табела 47 и график 32). Кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,189 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Табела 51. Дескриптивна анализа на млечни кариозни заби

МЛЕЧНИ КАРИОЗНИ ЗАБИ	Број	Просек (Means)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медиана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
маса на заб (g)	15	0,302000	0,141128	0,280000	0,100000	0,690000
Концентрација на ДНК од заб (ng/ $\mu$ l)	15	0,170947	0,307970	0,046100	0,010300	1,160000
Концентрација на ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)	15	0,561467	0,956667	0,189000	0,021000	3,625000

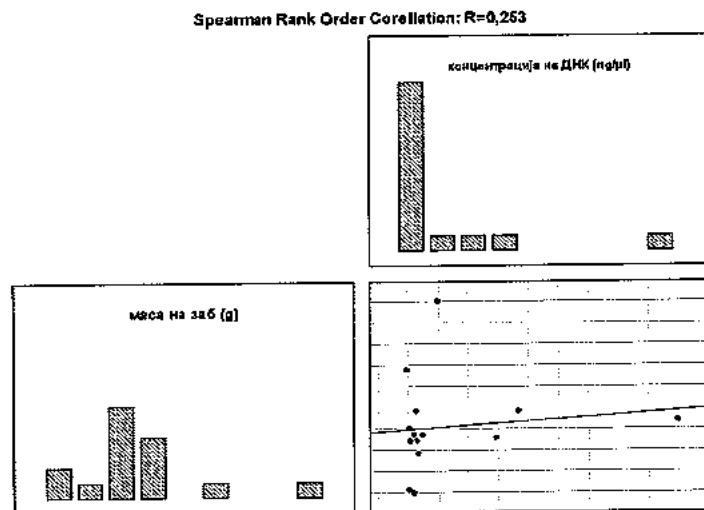
Табеларниот и графичкиот приказ на дескриптивната анализа на млечните кариозни заби се дадени во табелата 51 и графикот 32.

График 32. Дескриптивна анализа на млечни кариозни заби



Анализата на меѓусебната зависност помеѓу масата на млечни кариозни заби и концентрацијата на добиената ДНК од заб, укажа на постоење на линеарна позитивна директна слаба корелација (Spearman Rank Order Correlation:  $R=0,253$ ,  $p>0,05$ ). Со зголемувањето на масата на забот, несигнификантно се намалува концентрацијата на екстрахираната ДНК од заб (график 33).

**График 33. Непараметарска корелација помеѓу масата на забот и концентрацијата на екстрахирана ДНК – млечни кариозни заби**



**5.4.4. Концентрација на добиената ДНК од заб и ДНК од грам заб – споредба помеѓу различни типови млечни заби**

Трите групи млечни заби, и тоа здрави заби со помала ресорпција, здрави заби со поголема ресорпција и кариозни заби се споредувани и во однос на просечната концентрација на добиената ДНК од заб (табела 52).

**Табела 52. Мултипекс споредба на добиена ДНК од заб – групи млечни заби**

Концентрација на добиена ДНК од заб (ng/μl)			
ГРУПИ МЛЕЧНИ ЗАБИ	број	Просек (Means)	p
Помала ресорпција	15	0,792880	Kruskal-Wallis test: H=6,131014 p=0,0466*
Поголема ресорпција	15	0,224949	
Кариозни	15	0,170947	

\*сигнификантно за p<0,05

За  $p < 0,05$ , мултиплекс споредбата на просекот на рангови укажа на статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи во однос на просечната концентрација на добиената ДНК од заб (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=6,13$ ;  $df=2$ ,  $p=0,046$ ) во прилог на најголема добиена концентрација од групата здрави млечни заби со помала ресорпција (табела 53).

Табела 53. Мултиплекс споредба на добиената ДНК од грам заб – групи млечни заби

Концентрација на добиената ДНК на грам заб (ng/ $\mu$ l/g заб)			
ГРУПИ МЛЕЧНИ ЗАБИ	број	Просек (Means)	p
Помала ресорпција	15	2,033200	Kruskal-Wal.is test: $H=11,987$ $p=0,0025^*$
Поголема ресорпција	15	0,709600	
Кариозни	15	0,561467	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

За  $p < 0,05$ , мултиплекс споредбата на просекот на рангови укажа на статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи во однос на просечната концентрација на добиена ДНК на грам заб (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=11,987$ ;  $df=2$ ,  $p=0,002$ ) во прилог на најголема концентрација на ДНК од грам заб од групата здрави млечни заби со помала ресорпција, односно заби со степен на ресорпција помал од половината од физиолошката должина од коренот на забот (табела 53).



## **6. ДИСКУСИЈА**

## 6. Дискусија:

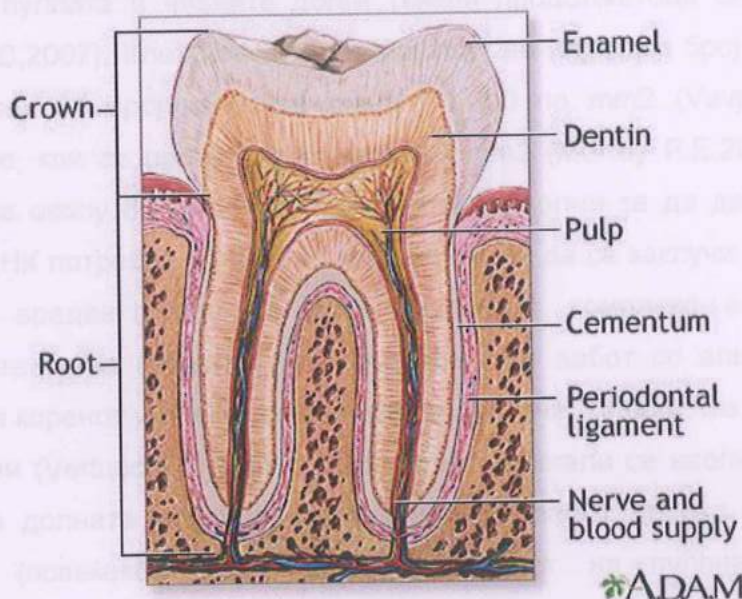
Форензичката идентификација се заснова врз пронаоѓање на разлики помеѓу различни лица. Овие разлики се јавуваат во различни форми, како: разлики во изгледот на лицето, во структурата на ушната школка, во структурата на ретиналните артерии, во бојата на косата, разлики во висината, итн. Некои варијации се уникатни, а некои не се. Забалото се користи за идентификација токму поради тоа што тоа е различно и строго индивидуално за секој поединец. Исто така, ДНК молекулата е уникатна за секоја индивидуа, освен кај еднојајчаните близнаци.

Полиморфизмите можат да бидат стекнати или наследени. Хируршката лузна е очигледен пример на стекнат полиморфизам. Повеќето стекнати карактеристики што се користат за идентификација, може да се променат со текот на времето, на пример стоматолошкиот дентален статус може да се промени со текот на времето. Полиморфизмот во молекулата на ДНК е основа за сите наследени карактеристики и тој не се менува во текот на целиот живот кај индивидуата (Stimson P, 1997).

### 6.1. Дистрибуцијата на ДНК во рамките на забот

Воспоставувањето на оптимални протоколи за земање примероци од забите, бара сеопфатно разбирање на забот, на неговата морфологија, анализа на дистрибуцијата на ДНК во рамките на забот, како и разбирање на промените што настануваат по смртта. Овие сознанија ќе овозможат оптимална селекција на забот од вилицата и земање на примероци од него. Анатомски, човечкиот заб може да се подели на два дела: на коронка, која е изложена во устата, и корени, кои се сместени во алвеоларната коска на вилицата (сл.14). Забните корени, кои се составени од цемент и од дентин/пулпа, даваат поголема количина ДНК отколку забната коронка (Dobberstein R.C, 1998; Higgins D, 2011), бидејќи и покрај присуството на пулпо-денталниот комплекс, главната составна компонента на

забната коронка претставува емајлот. Gaytmenn и Sweet (2003) демонстрираат дека кај забите што имаат пулпа, ДНК извадена од коронката е десет пати помала од онаа извадена од корењата на забот. Presecki Z.и др. (2000) укажуваат дека за успешна идентификација е неопходна минимална количина на примерокот во износ од 20 до 70 pg (пикограми).



Сл.14 Структура на заб (преземено од A.D.A.M. Consumer Health,2015)

Емајлот што ја покрива коронката на забот, е најтврдото ткиво во човечкото тело (Nanci A,2003) и содржи 96% минерали, тоа е ацелуларно ткиво и не содржи ДНК. Ова ткиво претставува физичка бариера што ги заштитува клетките во забот од надворешните услови како што се топлината, ултравиолетовото зрачење, светлината, влагата и патогените микроби (Pinchi V,2011). Иако ин виво емајлот има ограничена пропустливост (Vertacci A,2007), големината на порите помеѓу минералните кристали се екстремно мали спречувајќи ја пенетрацијата на молекулите поголеми од водата. Ова е од особена важност за спречување на влез на микробите и другите загадувачи од средината во забот, како за време на животот така и по смртта.

Пулпо-денталниот комплекс го сочинува најголемиот дел од забот, а за разлика од емајлот, тој е висококлеточен ткивен комплекс. Пулпата е богато васкуларизирана и инервирана и содржи сврзно ткиво во кое се наоѓаат разни видови клетки. Тука спаѓаат: одонтобластите (клетки што го формираат дентинот), фибробластите, одбранбени клетки (хистоцитите и макрофаги), плазма-клетките, нервните клетки и неиздиференцираните мезенхимални клетки (Chiego D.J,2002). Одонтобластите се ориентирани со нивните клеточни тела по должината на границата на пулпата и нивните долги ткивни продолжетоци се протегаат низ дентинот (Yu C,2007). Клетките што се јавуваат во најголем број во пулпата, се одонтобластите, чиј број изнесува околу 11.000 по  $\text{mm}^2$  (Vavpotic M,2009) и фибробластите, кои се проценуваат на 1000  $\text{mm}^2$  (Murray P.E,2002). Знаејќи го податокот дека околу 80 диплоидни клетки се доволни за да дадат минимална количина на ДНК потребна за STR мапирање, може да се заклучи дека пулпата е исклучително вреден извор на ДНК. Пулпниот комплекс е во врска со пародонталните ткива (ткивата што го поврзуваат забот со алвеоларна коска) преку врвот на коренот и преку помошните (акцесорни) канали низ кои поминуваат крвните садови (Vertucci F.J,1998). Акцесорните канали се наоѓаат претежно по должината на долната половина од коренот на забот додека кај моларите и премоларите (повеќекоренските заби), на подот на пулпната комора во фуркациониот предел (зоната помеѓу корењата на забите). Со оглед на релативно високата клеточност на пулпата, може слободно да се каже дека таа претставува најбогат извор на ДНК во забите (Malaver P,2003). Сепак, пулпата во одредени ситуации може да се сретне во ограничени количини, па дури и да е отсутна кај остарени или заболени заби.

Дентинот е составен од 65% минерали во форма на карбонирани хидроксилни апатити, органски макромолекули (главно колаген) и вода. Општо земено, дентинот не содржи клеточни тела, иако одонтобластичните клетки може да останат заробени во дентинот за време на формирањето на терциерен дентин (одговор на кариес) (Nanci A,2003). Дентинот е структурно уникатно ткиво, густо перфорирано од паралелни тубули, опкружено со минерални прстени, протегајќи се низ дентинот од пулпната комора (Zaslansky P,2009). Секој квадратен

милиметар на површина на дентин содржи од 20 000 до 45 000 каналчиња. Во слојот на дентин блиску до пулпата, бројот на каналчињата изнесува 45 000 на  $\text{mm}^2$ , додека на границата поблиску до емајлот, бројот на каналчињата двојно се намалува и изнесува 20 00  $\text{mm}^2$ . Разликата во бројот на каналчињата по  $\text{mm}^2$  на дентин се објаснува со фактот што површинскиот слој на дентин кон пулпата е значително помал отколку на периферијата блиску емајлово-дентинската граница (Karadjov O, 1996). Во овие дентински каналчиња праволиниски и меѓусебно паралелно се протегаат Томасовите влакна кои всушност претставуваат цитоплазматични продолжетоци на одонтобластите. По целата должина на дентинот, Томасовите влакна се разгрануваат и меѓусебно анастомозираат. Одонтобластичните продолжетоци имаат митохондрии по целата нивна должина, до минерализирачкиот дел на дентинот. Митохондриите, исто така, се присутни по целата должина на нервните влакна правејќи ги тубулите богати со mtDNA (Mornstad H, 1999). Освен инцидентните извори од крвните садови во главниот и помошните канали, дентинот е лош извор на јадрената (нуклеарната) ДНК (Vertucci F.J, 1986). Corte-Real и др. (2008) испитуваат 10 ендодонтски третирани заби (забите со целосно отстранета пулпа) и забележуваат количина на ДНК која е доволна за изведување на STR профилирање од осум заби и покрај недостигот на пулпата. Авторите на оваа студија сметаат дека јадрената (нуклеарната) ДНК е обезбедена од дентинот и претпоставуваат дека силниот хидрауличен притисок кој се создава во текот на ендодонтската терапија, ги сместува одонтобластичните клеточни тела во денталните тубули обезбедувајќи извор на нуклеарна ДНК во дентинот. Сепак, како што дентинот не е комплетно изолиран од цементот при постапката на земање примероци, се претпоставува дека успешното пронаоѓање на нуклеарниот ДНК профил е веројатно под влијание на ДНК присутна во цементот на забот. Ендодонтската терапија се изведува на забите со инфективна заболена пулпа и вклучува целосно отстранување на пулпата. Во текот на овој третман, исто така и површината на дентинот се отстранува и коренскиот канал постојано се испира со натриум хипохлорит (Naarasalo M, 2010). Со овој начин на работа тешко се обезбедуваат услови за преживување на органскиот материјал во дентинот.

Цементот ги покрива корените на забите и е аваскуларно минерализирано ткиво со ламинатна структура. Тој е составен од 45 до 50% неоргански минерали (хидроксиапатит), колагени и неколагени матрикс-протеини. Цементот се класифицира во два вида врз основа на присуство или отсуство на клетки (цементоцити) во неговата структура (Avery J.K,2006). Примарниот цемент се нарекува уште и фибриларен, ацелуларен цемент. Целуларниот цемент е извор на ДНК како што содржи цемент во рамките на екстрацелуларниот матрикс, во простори кои може да се споредат со остеоцитните лакуни (Yamamoto T,2010). Целуларниот цемент е сличен и во физичкиот и во хемискиот состав на коските, но е структурно и функционално различен од нив (Bosshardt D,2005). Тој е аваскуларен, нема инервација и содржи помалку неоргански соли (Kvaal S,1996). За разлика од коскениот цемент, не подлежи на континуирано преуредување но се зголемува во дебелина континуирано во текот на животот (Goncalves P.F,2005). Целуларниот цемент главно се гледа на апикалниот (долниот) дел од коренот и во фуркационата регија на моларните заби (58), но може да биде отсутен кај предните заби (Bosshardt D,2005). Цементот е поврзан со каналчиња насочени кон парадонталните лигаменти, што е нивен извор на хранливи материи. Дополнителни извори на ДНК поврзани со цементот се меките ткивните инклузии, остатоците од крв, крвни садови во акцесорните канали, прикременото периодонтално ткиво и фрагменти од коски заробени помеѓу корените на моларите.

Во нашето испитување каде што се врши анализа на различни дентални ткива, односно правиме компарација помеѓу мекото ткиво (пулпата) и цврстото преостана забно ткиво од истиот заб, доаѓаме до заклучок дека пулпата претставува најдобриот извор на ДНК. Притоа, забите беа поделени во три групи: инцизиви, премолари и молари и во секоја од трите групи се изведуваше меѓусебна компарација на добиената количина на ДНК од пулпата и од цврстото забно ткиво. Во првата група, согласно со дескриптивната анализа на масата на пулпата од примерокот од инцизиви, согледано е дека просечната вредност на добиената маса (тежина) на пулпата изразена во грамови изнесува  $0,006766 \pm 0,004642$  грама со минимална вредност од 0,00132 и максимална

вредност од 0,01195 грама. Анализата покажа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната маса на пулпата беше поголема од 0,00725 грама. Во однос на анализата на масата на цврсто забното ткиво, анализата покажа дека просечната вредност на добиената маса од цврстото забно ткиво изнесува  $0,646 \pm 0,5101$  грама со минимална вредност од 0,1 и максимална вредност од 1,23 грама. Испитувањето покажа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната маса на цврстото забно ткиво беше поголема од 0,47 грама. Меѓутоа и покрај тоа што масата на пулпата е многукратно помала од масата на цврстото забно ткиво, таа дава количина на изолирана ДНК неколкукратно поголема отколку цврстите структури на забот. Просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата на примерокот од пет инцизиви, изнесува  $0,1257 \pm 0,1198$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,017 и максимална вредност од 0,306 ng/ $\mu$ l. Анализата покажа дека кај 50% од пулпата од инцизивите во примерокот, просечната изолирана ДНК од пулпата била поголема од 0,061 ng/ $\mu$ l. Во однос на испитувањето на изолираната ДНК од забното ткиво, анализата покажа дека просечната вредност на добиената ДНК изнесува  $0,026 \pm 0,024$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,002 и максимална вредност од 0,057 ng/ $\mu$ l. Анализата покажа дека кај 50% од забното ткиво на инцизивите во примерокот, просечната изолирана ДНК е поголема од 0,015 ng/ $\mu$ l. Резултатите на изолираната ДНК од грам пулпа наспроти забно ткиво на инцизиви, за  $p < 0,05$ , укажаа на сигнификантна разлика помеѓу двете групи во прилог на значително поголема количина на ДНК по грам од пулпата.

И во втората група премолари се забележуваат исти резултати како и кај групата инцизиви, односно количината на изолирана ДНК е значително поголема од пулпата отколку од цврстите забни ткива (цемент и дентин). И тука масата на пулпата е многукратно помала од масата на цврстите забни ткива, но количината на изолирана ДНК е поголема. Дескриптивната анализа на масата на пулпата од примерокот од премоларите, утврдува просечна вредност на добиената маса (тежина) на пулпата која изразена во грамови изнесува  $0,012 \pm 0,005$  грама со минимална вредност од 0,00754 и максимална вредност од 0,017 грама. Анализата покажа дека кај 50% од премоларите во примерокот, просечната маса

на пулпата е поголема од 0,01 грама. Во однос на масата од забното ткиво, анализата покажа дека просечната вредност на добиената маса на забно ткиво изнесува  $0,796 \pm 0,348$  грама со минимална вредност од 0,22 и максимална вредност од 1,03 грама. Испитувањето покажа дека кај 50% од премоларите во примерокот, просечната маса на пулпата била поголема од 1,00 грама. Просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата на анализираните премолари, изнесува  $0,131 \pm 0,082$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,045 и максимална вредност од 0,227 ng/ $\mu$ l. Анализата покажа дека кај 50% од пулпата од премоларите во примерокот, просечната изолирана ДНК е поголема од 0,1008 ng/ $\mu$ l. Анализата на изолираната ДНК од забното ткиво (дентин и цементин) покажа дека просечната вредност на добиената ДНК изнесува  $0,0361 \pm 0,0172$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,011 и максимална вредност од 0,0538 ng/ $\mu$ l. Испитувањето покажа дека кај 50% од забното ткиво на премоларите во примерокот, просечната изолирана ДНК е поголема од 0,0343 ng/ $\mu$ l. Дополнителната анализа на изолираната ДНК од грам пулпа наспроти забно ткиво, на премолари, за  $p < 0,05$ , укажа на сигнификантна разлика помеѓу двете групи во прилог на значително поголема количина ДНК по грам од пулпата.

И кај третата анализирана група, молари, ги добивме приближно истите резултати. Количината на пулпата, во споредба со другите две групи, е значително поголема, што е и очекувано поради поголемиот број корени и коренски канали. Исто така и масата на цврстото забно ткиво е најголема, споредено со претходните две групи. Дескриптивната анализа на масата на пулпата од примерокот на моларите, утврдува просечна вредност на добиената маса од пулпата која изразена во грамови изнесува  $0,0157 \pm 0,0077$  грама со минимална вредност од 0,0099 и максимална вредност од 0,0281 грама. Анализата покажа дека кај 50% од моларите во примерокот, просечно добиената маса на пулпата беше поголема од 0,01098 грама. Во однос на анализата на добиената маса од забното ткиво, согледано е дека нејзината просечната вредност изнесува  $1,774 \pm 0,793$  грама со минимална вредност од 0,55 и максимална вредност од 2,61 грама. Анализата покажа дека кај 50% од моларите во примерокот, просечната маса на пулпата беше поголема од 1,92 грама.



Просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата на примерокот на моларите, изнесува  $3,1169 \pm 4,3842$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,1998 и максимална вредност од 10,6056 ng/ $\mu$ l. Анализата покажа дека кај 50% од пулпата од моларите во примерокот, просечната изолирана ДНК од пулпата била поголема од 1,0195 ng/ $\mu$ l. Анализата на изолираната ДНК од забното ткиво (дентин и цементин) покажа дека просечната вредност на добиената ДНК од моларите изнесува  $0,26782 \pm 0,422202$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност од 0,0116 и максимална вредност од 1,01 ng/ $\mu$ l. Исто така, кај 50% од забното ткиво на инцизивите во примерокот, просечната изолирана ДНК била поголема од 0,0966 ng/ $\mu$ l. Анализата на изолираната ДНК од грам пулпа наспроти забно ткиво, на моларите, за  $p < 0,05$ , покажа на сигнификантна разлика помеѓу двете групи во прилог на значително поголема количина на ДНК по грам од пулпата.

Направена е споредба на трите групи заби (инцизиви, премолари и молари) во однос на просечната вредност на изолираната ДНК од пулпата. Анализата покажа дека, за  $p < 0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи заби во однос на просечната изолирана ДНК од пулпата. Дополнителната мултиплекс споредба на просекот на рангови за изолирана ДНК од пулпата помеѓу трите групи заби, за  $p < 0,05$ , укажа на постоење на сигнификантна разлика. Просечно изолираната ДНК во групата молари, сигнификантно се разликува во однос на групата од инцизиви, а несицификантно се разликува во однос на онаа од премоларите. За  $p < 0,05$ , нема сигнификантна разлика помеѓу инцизивите и премоларите во однос на изолираната ДНК од пулпата.

Сумирано, мекот ткиво (пулпата) претставува највредниот извор на ДНК од забот, а исто така и цементот и дентинот се добар извор на ДНК. Емајлот е важен за зачувување на дентинот и пулпата, но е лишен од ДНК. Затоа, ако емајлот се употреби заедно со другите ткива на забот во постапката за изолација на ДНК, ќе има ефект на разредување и ќе ја зголеми концентрацијата на минералите, вклучувајќи го и калциумот, при што може да се компромитира процесот на екстракција на ДНК и да се инхибира постапката PCR амплификацијата. Сепак, одреден број автори тврдат дека и во случаи на целосно мелење на забот се

добива доволна количина ДНК со којашто успешно може да се изведе постапка на идентификација (Alonso A,2001; Milos A,2007; Edson S.M,2004). Меѓутоа, оптималната селекција на забот и соодветната постапка за земање примероци од забите пред екстракција на ДНК, ќе послужат за понатамошно подобрување на успехот на ДНК профилирање.

## 6.2. Фактори што влијаат врз количината на изолирана ДНК

Вкупната количина на ДНК кај забите значително варира помеѓу поединците и, исто така, помеѓу забите од истата индивидуа (Dobberstein R.C,2008; Higgins D,2011; Gaytmenn R,2003). Некои од факторите кои имаат значително влијание врз количината на ДНК се: типот на заб, хронолошката возраст на донорот и здравствената состојба на забот. Секој од овие фактори ќе влијаат врз релативните пропорции на ДНК присутни во коронката и коренот, а исто така и во пулпата, дентинот и цементот.

### 6.2.1. Тип на забот

Постојат четири вида човечки заби: секачи, канини, преткатници (премолари) и катници (молари), кои се разликуваат меѓусебно по формата и големината, но имаат слична хистолошка структура (Malaver P.C,2003).

Нашите испитувања, во кои вршевме споредба помеѓу различните групи заби и количината на изолирана ДНК од забното ткиво, најголема количина на изолирана ДНК добивме од групата на моларите, корелираа со сознанијата на De Leo,2000 и Rubio L, 2009. Просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК од моларите изнесуваше  $0,297403 \pm 0,404199$  (ng/ $\mu$ l) со минимална вредност од 0,012613 и максимална вредност од 1,043592 (ng/ $\mu$ l). Анализата покажа дека кај 50% од групата на моларите во примерокот, просечната концентрацијата на ДНК од заб беше поголема од 0,09515 (ng/ $\mu$ l). Дополнителната анализа на оваа група покажа дека просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК на грам

заб изнесува  $0,159271 \pm 0,221478$  (ng/ $\mu$ l/g заб) со минимална вредност од 0,007316 и максимална вредност од 0,673285 (ng/ $\mu$ l/g заб). Анализата покажа дека кај 50% од моларите во примерокот, просечната концентрацијата на добиената ДНК на грам заб беше поголема од 0,064806 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Анализата на меѓусебната зависност помеѓу масата на моларите и концентрацијата на екстрахираната ДНК, укажа на постоење на линеарна позитивна директна умерена корелација (Spearman Rank Order Correlation:  $R=0,4424$ ,  $p>0,05$ ). Со зголемување на масата на забот, се зголемува и концентрацијата на екстрахираната ДНК од заб.

Просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК од групата премолари, изнесуваше  $0,05517 \pm 0,026823$  (ng/ $\mu$ l) со минимална вредност од 0,0115 и максимална вредност од 0,0971 (ng/ $\mu$ l). Анализата покажа дека кај 50% од премоларите во примерокот, просечната концентрацијата на ДНК од заб беше поголема од 0,0531 (ng/ $\mu$ l). Дополнителната анализа на примерокот на премолари покажа дека просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб изнесува  $0,069943 \pm 0,043455$  (ng/ $\mu$ l/g заб) со минимална вредност од 0,015132 и максимална вредност од 0,153174 (ng/ $\mu$ l/g заб). Резултатите покажаа дека кај 50% од премоларите во примерокот, просечната концентрацијата на добиената ДНК на грам заб беше поголема од 0,062586 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК од групата на инцизивите изнесуваше  $0,029782 \pm 0,023116$  (ng/ $\mu$ l) со минимална вредност од 0,00216 и максимална вредност од 0,0635 (ng/ $\mu$ l). Анализата покажа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната концентрацијата на ДНК од заб беше поголема од 0,0217 (ng/ $\mu$ l). Понатамошните анализи на примероците од групата инцизиви, покажа дека просечната вредност на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб изнесува  $0,064378 \pm 0,058689$  (ng/ $\mu$ l/g заб) со минимална вредност од 0,009323 и максимална вредност од 0,172307 (ng/ $\mu$ l/g заб). Испитувањата покажаа дека кај 50% од инцизивите во примерокот, просечната концентрацијата на добиената ДНК на грам заб беше поголема од 0,042009 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Направивме и споредба на трите групи заби (инцизиви, премолари и молари) во однос на просечната вредност на добиената маса на заб изразена во грамови . Анализата покажа дека, за  $p < 0,05$ , постои статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи заби во однос на просечната добиена маса на заб. Просечно добиената маса на заб во групата молари сигнификантно се разликува во однос на просечно добиената маса на заб во групата инцизиви т.е. во однос на групата премолари. Со тоа директно ја докажавме меѓусебната поврзаност помеѓу тежината на забот и количината на изолирана ДНК од забното ткиво, односно во сите оние случаи каде што имаме поголема маса се очекува и поголема количина на изолирана ДНК.

Испитувањата што ја споредуваат количината на ДНК помеѓу различни видови заби, покажаа дека забите со најголем обем на пулпа се најдобар извор на ДНК (De Leo D, 2000; Rubio L, 2009) и ова се должи на присуството на поголем број клетки во пулпата. Исто така, потврдено е дека поголема количина на ДНК се добива од забите со повеќе корени отколку од забите со еден корен (De Leo D, 2000), и ова се должи на поголемиот волумен на пулпа во повеќекоренските заби и поголемата коренска површина која обезбедува поголема количина на цемент. Забите со повеќе корени не само што имаат поголема површина на коренот туку покажуваат повеќе целуларен цемент на површина, во однос на другите групи заби, кои, во некои случаи, имаат мал или никаков целуларен цемент. Така, изборот на заб за земање примероци треба да биде насочен кон заби со најголем обем на пулпа и најголема површина на коренот, при што може да се заклучи дека катниците се основните кандидати или заби за избор при изведување на изолација на ДНК во случај на постапка на идентификација. Препораката за употреба на моларите како заби што ќе бидат употребени во постапката на идентификација дава Интерпол во нивниот водич за идентификување на жртвите од катастрофи (DVI-Disaster Victim Identification Guide) од 2009 (Interpol, 2009) година како и ДНК Комисијата на Меѓународното здружение за судска генетика (ISFG-International Society of Forensic Genetics)(Prinz M, 2007). Во отсуство на катници, се очекува преткатниците да имаат повеќе целуларен цемент од предните заби, но канините ќе имаат поголем волумен на

пулпа. При изборот на заб, присутните ретинирани, импактирани заби (претежно молари и премолари), исто така, треба да се земат , предвид, бидејќи постои помала веројатност да бидат изгубени од предните заби во периодот по смртта. Забите кои се ретинирани во вилицата имаат заштита од страна на алвеоларната коска и имаат помали шанси за контаминација (Alvarez Garsia A, 1996).

### 6.2.2. Хронолошка (старосна) возраст

Постојат голем број промени што се јавуваат со зголемување на старосната возраст, а кои влијаат врз количината на ДНК во забот. Најочигледна негативна промена е намалувањето на волуменот на пулпата, што се јавува како резултат на нормалното континуирано депонирање на дентинот. Пулпата не само што се намалува во обем со текот на времето, но, исто така, се намалува и бројот на клетките (Trivedi R, 2002) и станува сè повеќе фиброзна (Bernick S, 1975). Како дел од процесот на стареење, дентинот се зголемува во обем и исто така, станува прогресивно склеротичен. Процесот на склероза вклучува оклузија на тубули со кристали на калциум фосфат, а потоа и дегенерација на одонтобластичните продолжетоци и присутните нервни влакна (Kinney J.H, 2005). Се претпоставува дека, дури и по затворањето (оклузија) на тубулите и дегенерација на нивната содржина, одредена количина на mtDNA останува заробена во дентинот, така што е документиран случај на пронајдена mtDNA во сосема склеротичен дентин (Mornstad H, 1999). Позитивна промена е дека количината на целуларниот цемент се зголемува со возраста (Gustafson G, 1950), иако е забележано дека цементот се гледа на лимитирана длабочина (околу 60µm) бидејќи се потпира на периодонталниот лигамент за обезбедување на хранливи материи што мора да дифундираат низ цементот во клетката (Avery J.K, 2006).

Другите промени што се случуваат со зголемување на возраста не може да влијаат врз количината на ДНК, но може да влијае на посмртното зачувување на молекулата на ДНК. На пример, емајлот станува силно минерализиран со текот на времето (Bertacci A, 2007) и се намалува количински преку процесот на атриција, а исто така и дентинот ја губи порозноста поради оклузија на тубулите (Senawongse P, 2008). Оттука, зголемувањето на возраста доведува до намалување на

содржината на ДНК (Higgins D,2011; Momstag H,1999) и до промена во дистрибуција на ДНК на забот. Фактори како што се степенот на абразија на забот и изобилството на цемент треба да се земат во обзир при изборот на примерокот за анализа. Кај постарите лица може да бидеме лимитирани при избор на заб за изолација, поради зголемената изложеност на стоматолошки болести, стоматолошки третмани и зголемениот губиток на забите.

### 6.3. Посмртна деградација

Деградацијата на ДНК молекулата во забите е временски зависна појава, но врската помеѓу времето и деградацијата е комплексна и е во голема мера под влијание на факторите на животната средина (Rubio L,2009; Rubio L,2012). Деградацијата на ДНК молекулата во периодот по смртта е започната преку ослободување на ендогени интрацелуларни ензими (липази, нуклеази и протеази) и продолжува со егзогени ензими продуцирани од навлегувањето на микроорганизмите и другите фактори на средината (Alaeddini R.2010). Ограничената порозност на забите и нивната цврста градба физички ги ограничува активностите на егзогените организмите врз структурните елементи во забите. Сепак, дејствата на ендогените ензими и процесите на спонтан хидролиза и оксидација кои сè уште се случуваат, доведуваат до деградација на ДНК молекулата со побавно темпо од активностите на егзогените организми. Како и кај другите ткива така и кај забите, воочено е дека најголемиот дел од деградацијата на ДНК молекулата се случува во првите две години, при што треба да се земат предвид надворешните и личните фактори (O'Rourke D.H,2000).

Повеќето методи за изолација на ДНК се дизајнирани за свежи ткива и биолошки материјали каде што има интактни клетки и голема количина на ДНК (Roland N,2007). Сите хемиски реакции на распаѓање на ДНК молекулата зависат од условите во околината и изминатото време. Најновите публикации укажуваат дека надворешната околина има поголемо влијание врз ДНК молекулата отколку изминатото време, и дека нема генерална поврзаност помеѓу годините на

примерокот и презервирање на ДНК молекулата (Burger J,1999). Фактори што влијаат врз физичкото, хемиското и биохемиското распаѓање на ДНК молекулата се: зголемената температура, рН вредноста на почвата, односно количината на хумусната и фулвичната киселина, бактериската и габичната контаминација, влажноста и светлината (Burger J,1999; Sneider P.M,2004; Rompler H,2006; Rubio L,2009). Кога средната вредност на ДНК фрагментите ќе се намали до 300 bp, може да настане загуба на генетската информација поради малата количина погодна ДНК за најчесто користени методи за STR (Sneider P.M,2004).

Во третиот дел од нашето истражување го испитувавме токму влијанието на факторите на надворешната средина врз степенот на деградација на ДНК молекулата. Забите беа поставени во различни средини како земја, вода, надворешна средина (изложени на сите надворешни температурни промени), како и група заби поставени во фрижидер со константна температура од + 4°C. Секоја од овие групи заби беше анализирана за временски период од два месеца, притоа изведувајќи изолација на ДНК молекулата секоја втора недела. Со ова испитување сакавме да одредиме под кои услови настанува најголема деградација на ДНК молекулата, а воедно да го следиме и временски процесот на деградација. Секоја од четирите групи заби е анализирана, и тоа во однос на добиената маса (g), концентрација на ДНК (ng/μl) и концентрација на ДНК на грам заб (ng/μl/g заб). Анализата на темпото на просечно намалување на вредностите на испитуваните параметри на примерокот на заби во надворешна средина во IV недела, VI недела и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот - 1,097% v.s. 2,376% v.s. 6,764%; б) концентрација на ДНК - 40,257% v.s.61,239% v.s. 64,023% и в) концентрација на ДНК на грам заб - 39,594% v.s. 60,294% v.s. 61,413%. Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај трите испитувани параметри во надворешна средина. Најголемото просечно намалување на добиена маса од забот, при престој во надворешна средина, се случува помеѓу VI и VIII недела од престојот и изнесува 4,39%. Најголемото просечно намалување на концентрација на добиена ДНК од заби оставени во надворешна средина се случува помеѓу II и IV недела (40,26%) и IV и VI недела (20,98%) додека во интервалот од VI до VIII

недела просечното намалување изнесува само 2,78%. Кај групата заби поставени во внатрешна средина (заби поставени во фрижидер со константна температура од +4°C - контролирана деградација), анализата на темпото на просечно намалување на вредностите на испитуваните параметри во IV недела, VI недела и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот - 4,237% v.s. 5,424% v.s. 15,932%; б) концентрација на ДНК - 41,041% v.s. 44,548% v.s. 47,404% и в) концентрација на ДНК на грам заб - 31,357% v.s. 36,595% v.s. 42,837%. Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај трите испитувани параметри на заби поставени во внатрешна средина. Најголемото намалување на концентрацијата на добиена ДНК од заби оставени во внатрешна средина се случува помеѓу II и IV недела (41,04%) додека намалувањето помеѓу IV и VI недела и VI и VIII недела изнесува консеквентно 3,51% и 2,86%. Анализата на темпото на просечното намалување на вредностите на испитуваните параметри на примерокот на заби ставени во водна средина во IV недела, VI недела и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот - 4,21% v.s. 14,4% v.s. 20,47%; б) концентрација на ДНК - 57,63% v.s. 74,23% v.s. 82,16% и в) концентрација на ДНК на грам заб - 52,64% v.s. 76,35% v.s. 86,27%. Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај сите три испитувани параметри на заби поставени во водна средина. Најголемото просечно намалување на добиената маса од забот се случува помеѓу IV и VI недела од престојот во водна средина (10,24%) следено со VI и VIII недела (6,03%). Најголемото намалување на концентрацијата на добиена ДНК од заби оставени во водна средина се случува помеѓу II и IV недела (57,62%) следено со IV и VI недела (16,61%) и VI и VIII недела 7,92%. Кај забите поставени во земја, анализата на темпото на просечно намалување на вредностите на испитуваните параметри во IV недела, VI недела и VIII недела во однос на вредностите во II недела изнесува консеквентно за: а) масата на забот - 2,49% v.s. 2,49% v.s. 6,24%; б) концентрација на ДНК - 59,55% v.s. 75,73% v.s. 81,17% и в) концентрација на ДНК на грам заб - 58,21% v.s. 70,46% v.s. 83,51%. Анализата покажа темпо на намалување на просечните вредности кај сите три испитувани параметри на заби поставени во водна средина. Најголемото



просечно намалување на добиената маса од забот се случува помеѓу VI и VIII недела (3,74%). Најголемото намалување на концентрација на добиена ДНК од заби оставени во водна средина се случува помеѓу II и IV недела (59,54%) следено со IV и VI недела (16,18%) и VI и VIII недела 6%.

Во рамките на истражувањето, направена е споредба на темпото на просечното намалување на концентрацијата на екстрахираната ДНК од заби во различни средини. Споредбата е правена во четирите анализирани средини (надворешна, внатрешна, вода и земја) и во три временски точки и тоа во IV недела, VI недела и VIII недела. Анализата покажа дека најбрзо темпо на просечно намалување на концентрацијата на екстрахирана ДНК, во сите анализирани временски точки има во земјата (IV недела - 59,54%, VI недела - 75,73% и VIII недела - 81,17%) следено со скоро идентично темпо во водата (IV недела - 57,63%, VI недела - 74,23% и VIII недела - 82,16%). Темпото на просечно намалување на концентрацијата на екстрахираната ДНК во надворешната средина е побавно, споредено со земјата и водата и изнесува (IV недела - 40,26%, VI недела - 61,24% и VIII недела - 64,02%). Кај забите во внатрешната средина, согледано е најбавно темпо на просечно намалување на концентрацијата на екстрахираната ДНК (IV недела - 40,04%, VI недела - 44,55% и VIII недела - 47,40%) т.е. во оваа средина губитокот на ДНК е двојно побавен, споредено со земјата и водата и за четвртина побавен, споредено со надворешната средина.

Овие наши сознанија корелираат со наодите на Rubio L (2012), Duffy J.B (1991), и Potch L (1992). Rubio и др. (2012) испитуваат заби чувани на собна температура за временски период од 1 до 18 месеци и тие забележуваат пад од 50% во количината на јадрената ДНК во првиот месец, по што следува период на стабилизација на деградациските процеси, и повторно намалување на количината на ДНК во 18 месец. Просечните приноси на ДНК во 18 месец се само 10% од оние добиени од свежи заби. Намалувањето на количеството во 18 месеци беше придружувано со намалување на квалитетот, којшто е неопходен за изведување на STR мапирањето. Авторот претпоставува дека периодот на стабилизација на деградациските процеси се должи на заштитата на дел од ДНК во рамките на

забите, сè до настанување на структурните промени, овозможувајќи навлегување на микроорганизмите и започнување на процесите на оксидација и хидролиза. За жал, авторот не приложува никакви докази за поддршка на структурните промени што беа презентирани. Сепак, овој ефект на брзо губење следено со фаза на стабилизација беше исто така, истакнато во студијата на Campos и др. (Campos P.F,2011) при испитување на mtDNA извлечен од распадната коска. Авторот верува дека првичното губење на ДНК се должи на брзо распаѓање на органски компоненти на коската, оставајќи повеќе отпорна ДНК во коскените лакуни.

Испитувањата на посмртната деградација на пулпата покажаа дека пулпата се разградува во побавно темпо отколку другите меки ткива (Boy S.C,2003), веројатно поради нејзината локација и заштита од егзогени организми и, исто така, поради уникатната природа на клетките во ова ткиво. Пулпата е биолошки функционална (има најмалку 50% функционални клетки) повеќе од 12 часа по настапување на смртта, а во период до 24 часа сè уште може да се најдат функционални клетки (Caviedes-Bucheli J,2006). Сувата средина ќе го забрза сушењето на пулпата, заштитувајќи ја ДНК од хидролитичките оштетувања, додека влажната средина ќе предизвика распаѓање (путрефакција) и целосно уништување на пулпата (Duffy J.B,1991; Pötsch L,1992). Распаѓањето на пулпните клетки за време на путрефакцијата доведува до создавање на течност, која може да содржи распадни продукти на хемоглобинот и серумските протеини. Забележано е дека оваа течност навлегува низ многубројните дентални тубули предизвикувајќи розово или црвено обојување на забите. (Stavrianos C,2011; Kirkham W.R,1977). Бројни записи на „розови заби“ се појавија во форензичката литература вклучувајќи голем број случаи кои произлегуваат од цунамито во Индискиот Океан во 2004 год. Исто така, испитувана е издржливоста на пулпата во забите изложени на високи температури (над 100°C) (Alvares Garsia A,1996). Оваа отпорност на пулпата на уништување од страна на топлина е презентирана во извештајот на Sweet и др. во кој неизникнат трет молар земен од речиси целосно согорено тело дава доволна количина на јадрена ДНК со доволно квалитет за да се изведе STR профилирање и да се олесни идентификацијата (Sweet D.J,1995).

Нуклеинската киселина постепено се распаѓа со текот на времето преку процесите на хидролиза и оксидација. Хидролизата претставува раскинување на N-гликозил врската помеѓу шеќерот и базата во присуство на вода. Гванин и Аденин се 20-пати почувствителни на депуринизацијата отколку цитозинот и тиминот (депириминизација), при што брзината зависи од температурата и pH вредноста. И обратно, хидролитичката деаминација на базите влијае врз пиримидините (30 000 години полуживот *ин vivo*), за 40 пати повеќе во однос на пурините. Оксидацијата е процес во кој водените хидроксил или суперхидроксил радикали ја модифицираат базата или ја извртуваат спиралата. Бидејќи митохондриите се центар на кислородниот метаболизам, оксидацијата примарно ги зафаќа митохондриите, отколку нуклеарниот геном. Оксидираните пиримидини прават најголема штета врз ДНК молекулата. Нивното присуство негативно корелира со успешната изолација и амплификација на ДНК, најмногу поради фактот што тие ја блокираат екстензијата за време на PCR (Jakjovski Z, 2011). Овој деградациски процес се одвива постојано *ин vivo*, но во јадрото под строга контрола од ДНК механизмите за корекција. Посмртно, овој и другите механизми продолжуваат да се случуваат (O'Rourke D.H, 2000; Paabo S, 2004). Најголемиот дел од ДНК деградацијата се случува со автолиза во првите часови и денови од смртта на организмот. Понатамошните хемиски реакции кои влијаат врз ДНК молекулата во подолг период се, главно, оксидацијата и хидролизата (Burger J, 1999).

Минералната компонента на забите ја сочувува човечката ДНК од физичко навлегување на микробите и другите загадувачи од средината (Milos A, 2007). Исто така, забележано е дека презервацијата на ДНК е подобрена со апсорпцијата за хидроксиапатитот (Lindahl T, 1993; Collins M.J, 1995). Студиите што ја испитуваат коската, покажаа присуство на кристални агрегати во празнината меѓу колагените фибрили, и тоа претставува местото каде што ДНК може да се зачува (Salamon m, 2005; Weiner S, 1986). Сепак, не е докажано постоење на слични агрегати во ткивата на забите. Campos и др. (2011) ја испитуваат коската и заклучуваат дека мали фрагменти на ДНК, исто така, може да се инкорпорираат во минерализираните колагенски фибрили за време на ремоделирање на коската *ин vivo*. Како минерализирани ткива на забите не подлежат на ремоделирање,

малку веројатно е дека овој процес може да се случи во забите. Докажано е дека се случува репреципитација на минералното ткиво за време на посмртната диагенеза и во оваа фаза потенцијалната ДНК може да се поврзе со минералите на забот. Јасно е дека ДНК се сочувува во тврдите ткива на забот, но точната природа на поврзувањето на ДНК со минералните ткива сè уште е непозната и не може да се каже во кој период на декомпозицијата настанува интеракцијата на ДНК со минерализираното ткиво. Малку се знае за влијанието на посмртната деградација на цврстото забно ткиво. Collins M.J и др. (1995) утврдуваат дека минерализираниот колаген е заштитен од хидролиза и разредување преку физичка заштита на минерални кристали. Затоа, до губење на колаген може да дојде само по растворање на минералите кои се термодинамички стабилни. Растворливоста на хидроксиапатитот зависи од присуството на вода, вредностите на рН и порозноста на минерализираното ткиво (Turner-Walker G, 2008). Присуството на водата овозможува растворање на минералните соли, каде што растворливоста се зголемува со намалување на рН вредноста. Циклусите на влажнење и сушење или континуираниот проток на вода предизвикуваат поголема штета на минерализираното забно ткиво, отколку потопувањето во водна средина. Степенот на губиток на минералите и деградацијата на колагенот е во директна зависност од условите на средината, многу повеќе отколку периодот по смртта (Dobberstein R.C, 2008; Turner-Walker G, 2008).

Влијанието на факторите на средината на ДНК во забите не е целосно разбрана, иако истражувањата на ДНК во праисториските заби ги истакнаа различните ефекти на факторите на средината за презервација на ДНК молекулата. Burger и др. (1999) испитале 38 заби од остатоците на индивидуи од бронзената доба (1 и 2 милениум п.н.е.), од три различни локации и утврдува дека температурата е најважниот фактор што влијае врз квалитетот на ДНК, т.е. со ниски температури и отсуство на микроорганизми се фаворизира зачувување на ДНК молекулата. Schwartz T.R. (1991) ја испитува количината на јадрена (нуклеарна) ДНК извлечена од пулпа извадена од забите кои се екстрахирани од вилицата. Во оваа студија, забите се подложени на различни варијации во температурата, рН вредноста, влагата, и почвата во временски периоди од една недела до шест

месеци. Авторот заклучува дека условите на надворешната средина кои се испитуваа, не влијаеја на способноста да се добие високомолекуларна човечка ДНК од денталната пулпа. При температура од 4°C може да се добие квалитетна ДНК дури и по 6 недели. На 25°C ДНК може да се изолира дури и по 19 години, а на температура од 37°C високомолекуларна ДНК може да се добие до 6 месеци. Слично на тоа, Alvarez Garsia A (1996) исто така ја испитува количината на нуклеарна ДНК извлечена од забите одделени од вилиците кои се подложени на различни средини. Во оваа втора студија се испитуваа заби кои беа целосно сомелени и заби од коишто беше извадена пулпата. И во двете студии резултатите покажаа дека забите што беа на површината на земјата дадоа поголема количина на изолирана ДНК отколку забите закопани во земја, додека најмала количина на изолирана ДНК се доби од забите потопени во вода. Во овие студии исто така се истакна дека температурата нема сигнификантно значење на количината на изолирана ДНК. Условите на животната средина како што се температурата, влагата, рН и УВ изложеноста влијаат заедно, така што тешко е да се издвои поединечното влијание на овие фактори. Важно е да се забележи дека различни стапки на успех се очекуваат од забите што се изолирани од различни средини и кои имаат различна должина на изложеност на факторите од средината.

Можеме да заклучиме, дека времето на настанување на смртта и условите на животната средина под кои телото се распаѓа, ќе имаат ефект врз количината на екстрахираната ДНК. Краток PMI (пост-мортем интервал) и / или сувата средина би придонеле на зачувување на ДНК во пулпата, додека при подолг PMI и / или влажна средина би ја редуцирале количината на изолирана ДНК од забните ткива.

#### 6.4. Млечните заби и изолацијата на ДНК

Човечкото забало се состои од две дентиции, млечна или примарна дентиција и постојана или перманентна дентиција. Млечната дентиција се состои од 20 заби

кои почнуваат да се појавуваат во усната шуплина околу шестиот месец од животот. До периодот на шестата година се присутни само млечни заби во усната шуплина. Периодот од 6 до 13-тата година претставува период на мешовита дентиција со присутни и млечни и постојани (трајни) заби, а по 13-тата година во усната шуплина се присутни само постојаните заби.

Цел на нашето испитување беше да се открие квалитетот и количината на ДНК којашто може да се добие со екстракција од млечните заби. Анализата е спроведена на 45 млечни заби поделени во три групи од по 15 заби и тоа: а) прва група - здрави заби со помала ресорпција, односно помала ресорпција од половина од физиолошката должина на коренот на забот; б) втора група - здрави заби со поголема ресорпција, т.е. повеќе од половина од физиолошката должина на забот и в) трета група - кариозни заби со мал степен на ресорпција на коренот на забот. Притоа дојдовме до сознанија дека групата заби со помал степен на ресорпција дава најголема количина на изолирана ДНК и тоа кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,177 ng/ $\mu$ l. Во однос на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, анализата покажа дека нејзината просечната вредност изнесува  $2,033 \pm 3,348$  (ng/ $\mu$ l/g заб) со минимална вредност од 0,021 и максимална вредност од 11,13 (ng/ $\mu$ l/g заб). Испитувањата утврдија дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,435 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Во однос на концентрацијата на добиената ДНК од здрави заби со поголема ресорпција на коренот на забот, анализата покажа дека нејзината просечна вредност изнесува  $0,225 \pm 0,663$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност 0,002 и максимална вредност од 2,610 ng/ $\mu$ l. Испитувањата покажаа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,035 ng/ $\mu$ l. Во однос на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, анализата покажа дека нејзината просечната вредност изнесува  $0,7096 \pm 2,3842$  ng/ $\mu$ l/g заб со минимална вредност од 0,00500 и максимална вредност од 9,321 (ng/ $\mu$ l/g заб). Резултатите покажаа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,061 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Додека кај групата кариозни заби со помал степен на ресорпција, добивме колична на изолирана ДНК која изнесуваше изнесува  $0,171 \pm 0,308$  ng/ $\mu$ l со минимална вредност 0,01 и максимална вредност од 1,16 ng/ $\mu$ l. Анализата покажа дека кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,046 ng/ $\mu$ l. Во однос на концентрацијата на добиената ДНК на грам заб, анализата покажа дека нејзината просечна вредност изнесува  $0,5615 \pm 0,9567$  ng/ $\mu$ l/g заб со минимална вредност од 0,02 и максимална вредност од 3,62 (ng/ $\mu$ l/g заб). Кај 50% од забите во примерокот, просечната концентрација на ДНК е поголема од 0,189 (ng/ $\mu$ l/g заб).

Од резултатите можеме да заклучиме дека физиолошката ресорпција на коренот на забот негативно влијае врз количината на изолирана ДНК. Тоа е и очекувано со оглед на тоа дека и количината што се добива за анализа, квантитативно е помала кај групата заби со поголем степен на ресорпција на коренот на забот.

Коренската ресорпција претставува физиолошки процес на уништување, односно последователна загуба на структурата на коренот од забот. Сè уште не е со сигурност разјаснето дали одонтокластите, клетките кои го ресорбираат цврстото забно ткиво, се разликуваат од остеокластите, клетките кои ја ресорбираат коската. Се смета дека коренската ресорпција е иницирана и регулирана од стелатниот ретикулум и денталниот фоликул на неизникнатиот перманентен заб преку секреција на стимулаторни молекули како што се цитокините и факторите на транскрипција. Оваа ресорпција на коренот може да варира од минимална ресорпција, со појава на микроскопски дупчиња на површината, па сè до негово комплетно ресорбирање. Кога ресорпцијата се протега на целиот заб, тоа се нарекува забна ресорпција. Ресорпцијата на коренот претставува природен процес кој овозможува ексфолијација на млечните заби, со цел да се обезбеди простор за изникнување на трајните заби. Врз основа на степенот на ресорпција на коренот на забот може да се одреди и возраста на пациентот.

Во однос на меѓусебната анализа на првата и третата група, и тоа заби со помал степен на ресорпција на коренот на забот, меѓутоа компарација помеѓу здравите и кариозните заби, добивме сознанија дека кариозните заби даваат сигнификантно помала количина на ДНК во однос на здравите заби. Оттука може да се види

директното влијание на бактериските микроорганизми и нивните ензими врз деградацијата на ДНК молекулата.

Стоматолошките заболувања имаат негативно влијание врз количината на човечката ДНК која се добива од забите (Higgins D,2011). Забниот кариес, микробните болести, доведуваат до локално распаѓање и уништување на калцифицираните ткива на забите. Ова го олеснува влегувањето на бактерии во пулпата, како директно така и преку празните дентински тубули, резултирајќи со смрт на клетките (Yu C,2007). Како одговор на кариес, пулпата се повлекува и се создава терцијарен дентин (Lee Y.I,2006). Овој терцијарен дентин покажува помалку организирана структура отколку примарниот и секундарниот дентин и како што се појавува апозиција на дентинот, голем број одонтбластични клетки може да бидат инкапсулирани во минерализираното ткиво. На крајот, кариесот може да доведе до потполно губење на пулпата или загуба на забот. Целуларниот цемент, исто така, може да биде погоден од кариес ако тој е директно изложен во усната шуплина, кој може да се случи во напредна пародонтална болест. Како што цементот го добива неговото крвоснабдување од периодонциумот, повеќе отколку од пулпата, тоа станува посебно важно ткиво за добивање на ДНК од забите кои се без пулпа, т.е. забите кај кои е извршен ендодонтски третман (Smith B.C,1993).

Пародонтитис или пародонталната болест е една индуцирана воспалителна болест што ги напаѓа потпорните структурите на забот (алвеоларната коска, пародонталните лигаменти и цементот). Акумулацијата на бактерии на површината на забите доведува до хронични воспаленија и создавање на токсини кои го уништуваат потпорното ткивото на забот и ја нарушува врската со забот. За време на развојот на ова заболување, доаѓа до уништување на алвеоларната коска, водејќи до загуба на поврзаноста на забот, намалување на висината на гингивата околу забот и експозицијата на цементот на усната шуплина. Цементот зафатен со пародонталното заболување ја губи поврзаноста со периодонталните влакна и станува обложен со плак и калкулус (Daly C,1979). При развиена пародонтална болест горната половина на коренот е компромитирана, т.е. нападната од голем број бактерии и нивни токсини присутни во усната шуплина, така што целуларниот цемент во поголем дел може да остане неоштетен.



Напреднатата пародонтална болест којашто го опфаќа и целуларниот цемент, може да доведе до намалување на расположливата ДНК како резултат на физички губиток на цементот (како резултат на денталниот третман кој има за цел отстранување на афектираното ткиво) и смрт на цементоцитите.

Стоматолошките болести не само што ја намалуваат количината на расположлива ДНК, но исто така, го зголемуваат потенцијалот за нејзина контаминација. Така, избраните заби за ДНК анализа треба да се интактни и да нема присуство на кариозни лезии. Важно е да се напомене дека, сепак, и болните заби и оние што добиле стоматолошки третман сè уште може да дадат доволна количина на ДНК за анализа и амплификација, но неопходно е внимателно разгледување на степенот на болеста и анализа на специфичните целни ткива кои би биле вклучени во испитувањето. На пример, ако избраниот заб е зафатен со кариес, пулпата сè уште може да биде употребена за изолација, доколку кариесната лезија не е многу раширена и ако цементот не е засегнат (непроменет) и каде што истиот може да биде употребен. Моларите кај кои е изведена стоматолошка интервенција и кои имале благ до умерен кариес, се значајни повеќе отколку интактните предните заби. Стоматолошката радиографска анализа е исклучително корисна постапка за избор на забите за анализа, бидејќи со тоа се добива проценка на застапеноста на кариозните лезии, како и одредување на коренот и големината на пулпната комора (пулпата).

## **7. Заклучоци**

## 7. ЗАКЛУЧОЦИ

Со истражувањето и направената анализа на добиените податоци беа донесени следните заклучоци:

1. Спроведената анализа, за  $p < 0,05$  покажа сигнификантно поголема просечно добиена маса на заб од групата молари споредено со групите инцизиви и премолари (One Way ANOVA:  $F=17,052$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0001$ ). Анализата покажа дека и просечната концентрација на добиената ДНК од заб во групата молари сигнификантно се разликува во однос на истата во групата инцизиви, а несигнификантно се разликува во однос на групата премолари (One Way ANOVA:  $F=3,9769$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0306$ ). Во примерокот на мешаната група заби (инцизиви, премолари и молари), согледана е позитивна линеарна директна умерена корелација (Spearman Rank Order Correlation:  $R=0,5674$ ) помеѓу масата на забите и концентрацијата на екстрахираната ДНК од заб, односно докажана е правопрпорционалната поврзаност помеѓу тежината на забот и количината на изолирана ДНК.

2. Просечно изолираната ДНК од пулпата на моларите сигнификантно се разликува од инцизивите, а несигнификантно се разликува од премоларите (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=7,44$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0242$ ). Нема сигнификантна разлика помеѓу инцизивите и премоларите во однос на изолираната ДНК од пулпата. Во однос на просечно изолирана ДНК од забното ткиво, за  $p < 0,05$  е согледана сигнификантна разлика помеѓу инцизивите, премоларите и моларите (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=5,46$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0452$ ), каде што групата на моларите дава најголема количина на изолирана ДНК.

3. Анализата покажа дека најбрзо темпо на просечно намалување на концентрацијата на екстрахирана ДНК, во сите анализирани временски точки има во ЗЕМЈАТА (IV недела - 59,54%, VI недела - 75,73% и VIII недела - 81,17%)

следено со скоро идентично темпо во ВОДАТА (IV недела - 57,63%, VI недела - 74,23% и VIII недела - 82,16%). Темпото на просечно намалување на концентрацијата на екстрахираната ДНК во надворешната средина е побавно споредено со земјата и водата и изнесува (IV недела - 40,26%, VI недела - 61,24% и VIII недела - 64,02%). Кај забите во внатрешната средина согледано е најбавно темпо на просечно намалување на концентрацијата на екстрахираната ДНК (IV недела - 40,04%, VI недела - 44,55% и VIII недела - 47,40%) т.е. во оваа средина губитокот на ДНК е двојно побавен, споредено со земјата и водата и за четвртина побавен, споредено со надворешната средина, што директно го посочува влијанието на температурата во деградациските процеси (повисока температура-побрза деградација). Деградациските процеси се најинтензивни во првиот месец како резултат на клеточната смрт, по што следува период на стабилизација.

4. За  $p < 0,05$  мултиплекс споредбата на просекот на рангови укажа на статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи во однос на просечната концентрација на добиена ДНК од заб (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=6,13$ ;  $df=2$ ,  $p=0,046$ ) како и во однос на просечната концентрација на добиена ДНК на грам заб (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=11,987$ ;  $df=2$ ,  $p=0,002$ ) во прилог на најголема добиена концентрација од групата здрави млечни заби со помала ресорпција, односно заби со ресорпција која е помала од половина од физиолошката должина на коренот на забот. Процесот на физиолошка ресорпција на млечните заби директно влијае врз количината на изолирана ДНК поради намалување на количината на расположливо забно ткиво за анализа. Микроорганизмите и нивните ензими присутни во кариозните лезии директно влијаат врз количината на изолирана ДНК, редуцирајќи ја истата.

## 8. Литература

## 8. Литература:

1. Adler C.J, Haak W, D. Donlon, A. Cooper, T.G. Consortium, Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones, *Journal of Archaeological Science* 38 (2011) 956–964.
2. Alaeddini R, Walsh S.J, A. Abbas, Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA — a review, *Forensic Science International. Genetics* 4 (2010) 148–157.
3. Alakoc YD, Aka PS. "Orthograde entrance technique" to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure. *Forensic Sci Int.* 2009;188:96–8.
4. Alexander C J, Foote G A. Radiology in forensic identification: the Mt. Erebus disaster. *Australas Radiol* 1998; 42: 321-326.
5. Alonso A, Andelinovic S, Martin P, D. Sutlovic, I. Erceg, E. Huffine, L.F. de Simon, C. Albarran, M. Definis-Gojanovic, A. Fernandez-Rodriguez, P. Garcia, I. Drmic, B.Rezic, S. Kuret, M. Sancho, D. Primorac, DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, *Croatian Medical Journal* 42 (2001) 260–266.
6. Alonso A, P. Martin P, C. Albarran, P. Garcia, L. Fernandez de Simon, M. Jesus Iturralde, A. Fernandez-Rodriguez, I. Atienza, J. Capilla, J. Garcia-Hirschfeld, P. Martinez, G. Val.ejo, O. Garcia, E. Garcia, P. Real, D. Alvarez, A. Leon, M. Sancho, Chal.enges of DNA profiling in mass disaster investigations, *Croatian Medical Journal* 46 (2005) 540–548.
7. Alvares Garsia A, Munoz C, C. Pestoni, M.V. Lareu, M.S. Rodriguez-Calvo, A. Carracedo, Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp, *International Journal of Legal Medicine* 109 (1996) 125–129.
8. American Board of Forensic Odontology. Body identification guidelines. *J Am Dent Assoc* 1994; 125: 1244-1254.

9. Andelinovic S, Sutlovic D, Skaro V, Rezic B, Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves, *Croatian Medical Journal* 46 (2005) 530-539.
10. Avadhani A, Tupkari J.V, Khambaty A, Sardar M, Cementum annulations and age determination, *J Forensic Dent Sci* 2009; 1:73-6.
11. Avery J.K, Chiego D.J, *Essentials of Oral Histology and Embryology. A Clinical Approach*, 3rd ed. Mosby Elsevier, St Louis, 2006.
12. Azlina A, Zurairah B, S.M. Ros, M.K. Idah, S.A. Rani, Extraction of mitochondrial DNA from tooth dentin: application of two techniques, *Archives of Orofacial Sciences* 6 (2011) 9-14.
13. Baccino E, Ubelaher D.H, Zerilli A, Evaluation of seven methods of estimation age of death from mature human skeletal remains, *J.Forens.Sci*, 44 (1999), 931-936.
14. Battepati M.P, Shodan M, Gender determination using primary teeth:A polymerase chain reaction (PCR) Study, *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*, 2013, Vol. 5 (8), pp.77-82.
15. Bernick S, Nedelman C, Effect of aging on the human pulp, *Journal of Endodontia* 1 (1975) 88-94.
16. Bertacci A, Chersoni S, C.L. Davidson, C. Prati, In vivo enamel fluid movement, *European Journal of Oral Sciences* 115 (2007) 169-173.
17. Boles TC, Snow CC, Stover E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass grave: A pilot project in Guatemala. *JFSCA*. 1995; 45:349-55.
18. Bolnick D.A, Bonine H.M, Mata-Miguez J, B.M. Kemp, M.H. Snow, S.A. Leblanc, Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and

- mitochondrial DNA, *American Journal of Physical Anthropology* 147 (2012) 293–300.
19. Bosshardt D.D, Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype, *Journal of Dental Research* 84 (2005) 390–406.
  20. Boy S.C, Bernitz H, Van Heerden W.F, Flow cytometric evaluation of postmortem pulp DNA degradation, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 24 (2003) 123–127.
  21. Brannon R B, Kessler H P. Problems in mass disaster dental identification: a retrospective review. *J Forensic Sci* 1999; 44: 123-127.
  22. Brkic H.et al., *Forenzična stomatologija*, Skolska knjiga, Zagreb, 2000, p.7.
  23. Buckleton J, Triggs CM, Walsh SJ. *Forensic DNA evidence interpretation*. Washington, D.C: CRC Press; 2005.
  24. Budimlija Z.M, Prinz M.K, Shaler R.C, World trade center human identification project: Experiences with individual body identification cases, *Croatian medical journal* 44 (2003) 259-263.
  25. Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W, DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis* 20 (1999) 1722–1728.
  26. Butler JM. *Forensic DNA typing: Biology, technology and genetics of STR markers*. San Diego: Academic Press; 2005.
  27. Caldas IM, Magalhães T, Afonso A. Establishing identity using cheiloscopy and palatoscopy. *Forensic Sci Int.* 2007; 165:1–9.
  28. Campos P.F, Craig O.E, G. Turner-Walker, E. Peacock, E. Willerslev, M.T. Gilbert, DNA in ancient bone — where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy* 194 (2011) 7–16.



29. Caviedes-Bucheli J, Avendano N, R. Gutierrez, S. Hernandez, G.C. Moreno, M.C. Romero, H.R. Munoz, Quantification of lactate-dehydrogenase and cell viability in postmortem human dental pulp, *Journal of Endodontia* 32 (2006) 183–185.
30. Chapenoire S, Schuliar Y, Corvisier J M. Rapid, efficient dental identification of 92% of 13 train passengers carbonized during a collision with a petrol tanker. *Am J Forensic Med Pathol.* 1998;19:352-355.
31. Chiego D.J, Histology of the pulp, in: J.K. Avery, P.F. Steele, N. Avery (Eds.), *Oral Development and Histology*, Thieme Medical Publishers, New York, 2002, pp. 190–212.
32. Clark D H. An analysis of the value of forensic odontology in ten mass disasters. *Int Dent J* 1994; 44: 241-250.
33. Cobb J.C, Ancient DNA recovered by a non-destructive method, *Ancient Biomolecules* 4 (2002) 169–172.
34. Collins M.J, Riley M, A. Child, G. Turner-Walker, A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen, *Journal of Archaeological Science* 22 (1995) 175–183.
35. Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, et al. Extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *JFSCA.* 1994; 39:1254–69.
36. Corte-Real A, Anjos M.J, L. Andrade, M. Carvalho, A. Serra, A.M. Bento, C. Oliveira, L. Batista, F. Corte-Real, D.N. Vieira, J.J. Gamero, Genetic identification in endodontic treated tooth root, *Forensic Science International* (2008) 457–458, (Genetics supplement series 1).
37. Daata P, Sood S, Role of deoxyribonucleic acid technology in forensic dentistry, *Journal of forensic dental Science*, 2012, vol.4, issue1, p.42-46.

38. Daly C.G, Kieser J.B, E.F. Corbet, G.J. Seymour, Cementum involved in periodontal disease: a review of its features and clinical management, *Journal of Dentistry* 7 (1979) 185-193.
39. Da Silva RH, Sales-Peres A, de Oliveira RN, de Oliveira FT, Sales-Peres SH. Use of DNA technology in forensic dentistry. *J Appl Oral Sci* 2007; 15:156-61.
40. Davoren J, Vanek D, R. Konjhodzic, J. Crews, E. Huffine, T.J. Parsons, Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves, *Croatian Medical Journal* 48 (2007) 478-485.
41. Deguilloux M.F, Ricaud S, Leahy R, M.H. Pemonge, Analysis of ancient human DNA and primer contamination: one step backward one step forward, *Forensic Science International* 210 (2011) 102-109.
42. De Leo D, Turrina S, Marigo M, Effects of individual dental factors on genomic DNA analysis, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 21 (2000) 411-415.
43. Desmyter S, De Greef C, A more efficient extraction method of human bone resulting in improved DNA profiling, *Forensic Science International. Genetics* 1 (2008) 24-25.
44. Dias P.E, Beaini T.L, Melani R.F, Age estimation from dental cementum incremental lines and periodontal disease, *J Forensic Odontostomatol.* 2010; 28:1:13-21.
45. Dobberstein R.C, Huppertz J, N. von Wurmb-Schwark, S. Ritz-Timme, Degradation of biomolecules in artificial.y and natural.y aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis, *Forensic Science International* 179 (2008) 181-191.
46. Duffy J.B, Skinner M.F, J.D. Waterfield, Rates of putrefaction of dental pulp in the northwest coast environment, *Journal of Forensic Sciences* 36 (1991) 1492-1502.

47. Dukes M.J, Williams A.L, C.M. Massey, P.W. Wojtkiewicz, Technical note: bone DNA extraction and purification using silica-coated paramagnetic beads, *American Journal of Physical Anthropology* 148 (2012) 473–482.
48. Edson S.M, Ross J.P, M.D. Coble, T.J. Parson, S.M. Barritt, Naming the dead — confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains, *Forensic Sciences Review* 16 (2004) 63–90.
49. Fisher D.L, Holland M.M, L. Mitchell, P.S. Sledzik, A.W. Wilcox, M. Wadhams, V.W. Weedn, Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone, *Journal of Forensic Sciences* 38 (1993) 60–68.
50. Foti B, Adalian P, Signoli M, Limits of the Lamendins method in age determination, *Forens.Sci.Int*, 2001,122:101-106.
51. Gajendra V, Ashok L, Shiva P.s et al., Determination of sex from human pulp tissue, *Libyan J Med*, 2010, 5:10.
52. Gajendra V, Lingappa A, Shiva P, Mamatha G.P, Determination of sex from tooth pulp tissue, *Libyan J Med*, 2010, 5: 5084.
53. Galdames I.S, Henríquez I.R & Cantín L.M, Sex Chromatin in Dental Pulp. Performance of Diagnosis Test and Gold Standard Generation, *Int. J. Morphol.*, 28(4):1093-1096, 2010.
54. Galdames I.S, Flores A, Roa I, Cantín M & Zavando D, Sex Determination by Observation of Barr Body in Teeth Subjected to High Temperatures, *Int. J. Morphol.*, 29(1):199-203, 2011.
55. Gaytmenn R, Sweet D, Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth, *J Forensic Science* 48 (2003) 622–625.

56. Gilbert M.T, Rudbeck L, Willerslev E, A.J. Hansen, C. Smith, K.E.H. Penkman, K. Prangenberg, C.M. Nielson-Marsh, M.E. Jans, P. Arthur, N. Lynnerup, G. Turner-Walker, M. Biddle, B. Kjolbye-Biddle, M.J. Collins, Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy, *Journal of Archaeological Science* 32 (2005) 785–793.
57. Gilbert M.T, Hansen A.J, E. Willerslev, G. Turner-Walker, M.J. Collins, Insights into the processes behind the contamination of degraded human teeth and bone samples with exogenous sources of DNA, *International Journal of Osteoarchaeology* 16 (2006) 156–164.
58. Ginter C, Issel-Tarvel L, King M. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth, *Nat. Genet.* 1992 Oct; 2(2):135-8.
59. Goncalves P.F, Sal. um E.A, A.W. Sal. um, M.Z. Casati, S. de Toledo, F.H. Nociti, Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions, *Brazilian Dental Journal* 4 (2005).
60. Gu S, Li S. X-chromosome STRs analysis of Ewenke ethnic population. *Forensic Sci Int* 2006; 158:72-5.
61. Gustafson G, Age determination on teeth, *The Journal of the American Dental Association* 41 (1950) 45–54.
62. Gustafson. G, Microscopic examination of the teeth as a means of identification in Forensic medicine *J.A.D.A.*, 1947, 35: 720.
63. Haapasalo M, Shen Y, W. Qian, Y. Gao, Irrigation in endodontics, *Dental Clinics of North America* 54 (2010) 291–312.
64. Hanaoka Y, Inoue M, Tsai TH, Minaguchi K. Fundamental and practical study for DNA analysis using tooth as a source of DNA. *Nihon Hoigaku Zasshi.* 1995; 49(1):1-10.
65. Hauser G, Daponte A, Roberts MJ. Palatal rugae. *J Anat.* 1989; 165:237–49.

66. Hervella M, Maitane G. I, Izagirre N, Anta A, Nondestructive Methods for Recovery of Biological Material from Human Teeth for DNA Extraction, *J Forensic Sci*, 2014, p.1-6.
67. Higgins D, Kaidonis J, J. Austin, G. Townsend, H. James, T. Hughes, Dentine and cementum as sources of nuclear DNA for use in human identification, *Australian Journal of Forensic Sciences* 43 (2011) 287–295.
68. Higgins D, Kaidonis J, Townsend G, Hughes T, Austin J, Targeted sampling of cementum for recovery of nuclear DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures, *Investigative Genetics* 2013, 4:18.
69. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R. Typing of DNA extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci*. 1991; 36:1649–61.
70. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of humans from Vietnam War. *J Forensic Sci*. 1993; 38:542–53.
71. Holland M.M, Cave C.A, Holland C.A, Bille T.W, Development of a quality, high throughput DNA analysis for skeletal samples to assist with the identification of victims from the world trade center attack, *Croatian medical Journal* 44 (2003),264-272.
72. Huel R, Amory S, A. Bilic, S. Vidovic, E. Jasaragic, T.J. Parsons, DNA extraction from aged skeletal samples for STR typing by capillary electrophoresis, *Methods in Molecular Biology* 830 (2012) 185–198.
73. INTERPOL, *Disaster Victim Identification Guide*, 2009.
74. Jakjovski Z, *Primena na analizata na Avtozomnite I Y-hromozomskite kratki povtoruvacki tandem (STR's) vo sudsko-medicinska praktika*, Doktorska disertacija, 2011, p 49.

75. Jakubowska J, Maciejewska A, Pawlowski R, Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation, *International Journal of Legal Medicine* 126 (2012) 173–178.
76. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985; 314:67-73.
77. Jones D.G. Odontology often is final piece to grim puzzle. *J Calif Dent Assoc* 1998; 26: 650-653.
78. Kang L, Li S. X-chromosome STR polymorphism of Luoba ethnic group living in Tibet (SW China). *Forensic Sci Int* 2006; 156:88-90.
79. Karadjov O, Kezele D, Kuburovich D, Markovich D, *Preparacija Kaviteta, Radnicka Stampa, Beograd, 1996, p.29.*
80. Karkhanis S, Bal. J, Franklin D, MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC CHANGES IN INCINERATED DECIDUOUS TEETH, *J Forensic Odontostomatol* 2009;27:2.
81. Kaye N Bal. antyne, Rixun Fang, Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molekular Bases and Forensic implications, *Am.J Human Genetics*, (2010)87(3):341-353.
82. Keiser-Neilsen, S., *Person Identification by Means of Teeth.* John Wright & Sons, Bristol, 1980.
83. Kemp B.M, Smith D.G, Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth, *Forensic Science International* 154 (2005) 53–61.
84. Kinney J.H, Nal.a R.K, J.A. Pople, T.M. Breunig, R.O. Ritchie, Age-related transparent root dentine: mineral concentration, crystal.ite size and mechanical properties, *Biomaterials* 26 (2005) 3363–3376.
85. Kirkham W.R, Andrews E.E, C.C. Snow, P.M. Grape, L. Snyder, Postmortem pink teeth, *Journal of Forensic Sciences* 22 (1977) 120–131.

86. Krausz C, Quintana-Murci L, Forti G. Y chromosome polymorphisms in medicine. *Ann Med* 2004; 36:573-83.
87. Kubo S.I, Great East Japan earthquake – Postmortem examinations and personal identification of victims, *Rechtsmedizin* 22 (2012) 12-16.
88. Kvaal S.I, Solheim T, Bjerketvedt D, Evaluation of preparation, staining and microscopic techniques for counting incremental lines in cementum of human teeth, *Biotechnic and Histochemistry* 71 (1996) 165–172.
89. Lamendin H, Baccino E, Zerilli A, A simple technique for age estimation in adult corpses: the two criteria dental methods, *J.Forens.Sci*, 37 (1992), 1373-1379.
90. Lee Y.L, Liu J, B.H. Clarkson, C.P. Lin, V. Godovikova, H.H. Ritchie, Dentin–pulp complex responses to carious lesions, *Caries Research* 40 (2006) 256–264.
91. Lindahl T, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* 362 (1993) 709–715.
92. Loreille O.M, Diegoli T.M, Irwin J.A, M.D. Coble, T.J. Parsons, High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, *Forensic Science International.Genetics* 1 (2007) 191–195.
93. Lysell L, Plicae palatinae transversae and papilla incisiva in man; a morphologic and genetic study. *Acta Odontol Scand.* 1955; 13:5–137.
94. Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat Med J.* 2003; 44:306–9.
95. Manas B, Age estimation using physiological changes of teeth, *European Journal of Experimental Biology*, 2011, 1 (4):104-108.
96. Manjunath BC, Chandrashekhara BR, Mahesh M, Vatchala Rani RM. DNA profiling and forensic dentistry - A review of the recent concepts and trends. *J Forensic Leg Med* 2011; 18:191-7.

97. Marjanović D, Durmic-Pasic A, Bakal N, S. Haveric, B. Kalamujic, L. Kovacevic, J. Ramic, N. Pojskic, V. Skaro, P. Projic, K. Bajrovic, R. Hadziselimovic, K. Drobic, E. Huffine, J. Davoren, D. Primorac, DNA identification of skeletal remains from World War II mass graves uncovered in Slovenia, *Croatian Medical Journal* 48 (2007) 513–519.
98. Meini A, Huber CD, Tangl S, Gruber GM, Teschler-Nicola M, Watzek G, Comparison of the validity of three dental methods for the estimation of age at death, *Forensic Sci Int.* 2008 Jul 4;178(2-3):96-105.
99. Milos A, Selmanovic A, Smajlovi CL, Huel RL, Katzmarzyk C, Rizvic A, *et al.* Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J* 2007; 48:486-93.
100. Mimura N, Yasuhara K, Yokoki H, Kazama S, Damage from the Great East Japan Earthquake and Tsunami – A quick report. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 16 (2011) 803-808.
101. Mornstad H, Pfeiffer H, C. Yoon, A. Teivens, Demonstration and semiquantification of mtDNA from human dentine and its relation to age, *International Journal of Legal Medicine* 112 (1999) 98–100.
102. Murray J. *Prevention of oral disease.* Oxford: Oxford University Press, 1986.
103. Murray P.E, Stanley H.R, J.B. Matthews, A.J. Sloan, A.J. Smith, Age-related odontometric changes of human teeth, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 93 (2002) 474–482.
104. Muruganandhan J, Sivakumar G, Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry, *J Forensic Dent Sci.* 2011 Jan-Jun; 3(1): 38–45.
105. Nanci A, *Enamel: Composition, Formation and Structure*, 6 ed. Mosby, St Louis, Missouri, 2003.
106. Nayak P, Acharya AB, Padmini AT, Kaveri H. Differences in the palatal rugae shape in two populations of India. *Arch Oral Biol.* 2007; 52:977–82.



107. Nigam P, Grewal P, Singh V.P, Prasad K, Cryogenic Grinding: An Insight into The New Era, INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTAL AND MEDICAL RESEARCH | SEPT - OCT 2014 | VOL 1 | ISSUE 3.
108. Nirmal D,Gorea R.K,Gargi J, Singh J.R, Sex Determination From Pulpal Tissue, JIAFM, 2004; 26(2).Issn. 0971-0973.
109. Ohtani M, Nishida N, Chiba T, Fukuda M, Miyamoto Y, Yoshioka N. Indication and limitations of using palatal rugae for personal identification in edentulous cases. Forensic Sci Int. 2008; 176:178–82.
110. Omar A, Azab S, Applicability of Determination of Gender from Odontometric Measurements of Canine Teeth in a Sample of Adult Egyptian Population, Cairo Dental Journal , vol (2), 167:180, 2009.
111. O'Rourke D.H, Hayes M.G, Ancient DNA studies in physical anthropology, Annu.Rev.Antrop.(2000) 29:217-42.
112. Paabo S, Poinar H, Genetic analyses from ancient DNA, Annu. Rev. Genet. (2004) 38:645-79.
113. Pagan F, Lim C.M, Keglovic, D.McNevin, Comparison of DNA extraction methods for identification of human remains, Australian Journal of Forest Science (2011) 1–11.
114. Panchbhai A.S, Dental radiographic indicators, a key to age estimation, Dentomaxillofacial Radiology (2011) 40, 199–212.
115. Pankaj D, Sonia S.D, Role of deoxyribonucleic acid technology in forensic dentistry, Journal of For Dent Sci, 2012, 4,1:42-46.
116. Parsons T.J, Huel R, J. Davoren, C. Katzmarzyk, A. Milos, A. Selmanovic, L. Smajlovic, M.D. Coble, A. Rizvic, Application of novel "mini-amplicon" STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains, Forensic Science International. Genetics 1 (2007) 175–179.

117. Pfeiffer H, Huhne J, B. Seitz, B. Brinkmann, Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth, *International Journal of Legal Medicine* 112 (1999) 142–144.
118. Pinchi V, Torricelli F, A.L. Nutini, M. Conti, S. Iozzi, G.A. Norelli, Techniques of dental DNA extraction: some operative experiences, *Forensic Science International* 204 (2011) 111–114.
119. Pötsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med.* 1992; 105:139–43.
120. Presecki Z, Brkic H, Primorac D, I. Drmic, Methods of preparing the tooth for DNA isolation, *Acta Stomatologica Croatica* 34 (2000) 21–24.
121. Prinz M, Carracedo A, W.R. Mayr, N. Morling, T.J. Parson, A. Sajantila, R. Scheithauer, H. Schmitter, P.M. Schneider, DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI), *Forensic Science International. Genetics* 1 (2007) 3–12.
122. Remualdo VR. Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes humanos submetidos ao calor [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2004.
123. Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Ludes B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Sci Int* 2005; 151:31-5.
124. Rohland N, DNA extraction of ancient animal hard tissue samples via adsorption to silica particles, *Methods in Molecular Biology* 840 (2012) 21–28.
125. Roland N, Hofreiter M, Ancient DNA extraction from bones and teeth, *Nature Protocols* 2(2007)7:1757-1762.
126. Rompler H, Meyer M, Multiplex amplification of ancient DNA, *Nature Protocols* 1, (2006)2:720-728.

127. Rothwell BR, Principles of dental identification, *Dent Clin North Am.* 2001 Apr; 45(2):253-70.
128. Rubio L, Martinez L.J, Martinez E, S. Martin de las Heras, Study of short- and long-term storage of teeth and its influence on DNA, *Journal of Forensic Sciences* 54 (2009) 1411–1413.
129. Rubio L, Santos I, M.J. Gaitan, S. Martin de las Heras, Time-dependant changes in DNA stability in decomposing teeth over 18 months, *Acta Odontologica Scandinavica* (2012) 1–6.
130. Salamon M, Tuross N, B. Arensburg, S. Weiner, Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones, *PNAS* 102 (2005) 13783–13788.
131. Sampietro M.L, Gilbert M.T, Lao O, D. Caramelli, M. Lari, J. Bertranpetit, C. Lalueza-Fox, Tracking down human contamination in ancient human teeth, *Molecular Biology and Evolution* 23 (2006) 1801–1807.
132. Schwarz C, Debruyne R, Kuch M, E. McNally, H. Schwarcz, A.D. Aubrey, J. Bada, H. Poinar, New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains, *Nucleic Acids Research* 37 (2009) 3215–3229.
133. Schwartz T.R, Schwartz E.A, Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions, *Journal of Forensic Sciences* 36 (1991) 979–990.
134. Schneider P.M, K.Bender, STR analysis of artificialy degraded DNA- result of a collaborative European excersise, *Forensic Sci.Int.* 139 (2004)123-134.
135. Senawongse P, Otsuki M, J. Tagami, I.A. Mjor, Morphological characterization and permeability of attrited human dentine, *Archives of Oral Biology* 53 (2008) 14–19.

136. Sharma P, Saxena S, Rathod V, Comparative reliability of cheiloscropy and palatoscopy in human identification, Indian journal of dental research,2009,vol.20, 4:453-457.
137. Shiroma C.Y, Fielding C.G, J.A. Lewis, M.R. Gleisner, K.N. Dunn, A minimal.y destructive technique for sampling dentine powder for mitochondrial DNA testing, Journal of Forensic Sciences 49 (2004) 1-5.
138. Shukla D, Chowdhry A, Bablani D, Jain P, Thapar R. Establishing the reliability of palatal rugae pattern in individual identification (following orthodontic treatment) J Forensic Odontostomatol. 2011; 29:20-9.
139. Silva LAF, Passos NS. DNA forense: Coleta de amostras biolocas em locais de crime para estudo do DNA. Macei Ed UFAL. 2002.
140. Silverstein H. Comparison of antemortem and postmortem findings. In: Bowers C M Bell G. *Manual of forensic odontology*. 3rd ed. Ontario: Manticore, 1995.
141. Sivapathasundharam B, Prakash PA, Sivakumar G. Lip prints (cheiloscropy) Indian J Dent Res.2001; 12:234-7.
142. Smith B.C, Fisher D.L, V.W. Weedn, G.R. Warnock, M.M. Holland, A systematic approach to the sampling of dental DNA, Journal of Forensic Sciences 38 (1993) 1194-1209.
143. Sowmya K, Sudheendra U.S, Khan S, Nagpal N, Prathamesh S.J, Assessment of morphological changes and DNA quantification: An *in vitro* study, Journal of Forensic Dental Science, 2013,vol: 5 ,issue :1, p : 42-46.
144. Stavrianos C, Vasiliadis L, C. Papadopoulou, O. Pantelidou, K. Tolidis, P. Dagkalis, The post-mortem pink teeth phenomenon, Research Journal of Medical Science 6 (2011) 124-127.
145. Steinlechner M, Berger B, Niederstatter H, Parson W. Rare failures in the amelogenin sex test. Int J Legal Med. 2002; 116:117-20.
146. Stimson P.G, Mertz C.A. Forensic Dentistry,CRC Press LLC,1997,38.

147. Sweet D, Hildebrand D, Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding, *Journal of Forensic Sciences* 43 (1998) 1199–1202.
148. Sweet D.J, Sweet C.H, DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene, *Journal of Forensic Sciences* 40 (1995) 310–314.
149. Sweet D, Di Zinno J A. Personal identification through dental evidence-tooth fragments to DNA. *J Calif Dent Assoc* 1996; 24: 35-42.
150. Thomas CJ, Kotze TJ. The palatal ruga pattern: a new classification. *J Dent Assoc S Afr.* 1983; 38:153–7.
151. Tilotta F, Brousseau P, Lepareur E, K. Yasukawa, P. de Mazancourt, A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting, *Forensic Science International* 202 (2010) e39–e43.
152. Trivedi R, Chattopadhyay P, V.K. Kashyap, A new improved method for extraction of DNA from teeth for the analysis of hypervariable loci, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 23 (2002) 191–196.
153. Tsuchihashi Y. Studies on personal identification by means of lip prints. *Forensic Sci.* 1974; 3:233–48.
154. Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with y- chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002;23(3):268-71.
155. Turner-Walker G, The chemical and microbial degradation of bones and teeth, in: R. Pinhasi, S. Mays (Eds.), *Advances in Human Palaeopathology*, John Wiley and Sons LTD, 2008, pp. 1–29.
156. Vavpotic M, Turk T, D.S. Martincic, J. Balazic, Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem, *Forensic Science International* 193 (2009) 122–126.

157. Vemuri S, Ramya R, Rajkumar K, Rajashree P, Influence of various environmental conditions on DNA isolation from dental pulp for sex determination using polymerase chain reaction, *Journal of research in Dental science*, 2012 ,vol 3, issue 4, p 231-235.
158. Vertucci F.J, Anthony R.L, A scanning electron microscopic investigation of accessory foramina in the furcation and pulp chamber floor of molar teeth, *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 62 (1986) 319-326.
159. Vogel F, Motulsky AG, Motta PA. *Genética humana: problemas e abordagens*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
160. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; 171:737.
161. Weedn V.W. Postmortem identifications of remains. *Clin Lab Med* 1998; 18: 115-137.
162. Weiner S, Price P.A, Disaggregation of bone into crystals, *Calcified Tissue International* 39 (1986) 365-375.
163. Westen A.A, Gerretsen R.R, G.J. Maat, Femur, rib, and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification (DVI): a method to minimize contamination risk, *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 4 (2008) 15-21.
164. Wikipedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Amelogenin>.
165. Woodward S.R, King M.J, N.M. Chiu, M.J. Kuchar, C.W. Griggs, Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues, *PCR Methods and Applications* 3 (1994) 244-247.
166. Yang D.Y, Eng B, J.S. Wayne, J.C. Dudar, S.R. Saunders, Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns, *American Journal of Physical Anthropology* 105 (1998) 539-543.

167. Yamamoto T, Li M, Z. Liu, Y. Guo, T. Hasegawa, H. Masuki, R. Suzuki, N. Amizuka, Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern, *Odontology* 98 (2010) 102–109.
168. Yokoi T, Aoki Y, Sagisawa K, Human identification and sex determination of dental pulp, bone marrow and blood stains with a recombinant DNA probe, *Z.Rechtsmed* (1989)102:323-30.
169. Yu C, Abbott P.V, An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury, *Australian Dental Journal. Supplement* 52 (1Suppl.) (2007) S4–S16.
170. Zaslansky P, Zabler S, P. Fratzl, 3D variations in human crown dentin tubule orientation: a phase-contrast microtomography study, *Dental Materials* 26 (2009) e1–e10.
171. Zehner R, Zimmermann S, Mebs D. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: Methodology and forensic application. *Int J Leg Med* 1998; 1111:323-7.