

Leevi Roine

KUOLEMANJÄLKEINEN IKÄARVIO HAMPAAAN DENTIININ ASPARAGIINIHAPON
RASEMISAATIOREAKTION AVULLA

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Syyslukukausi 2023

Leevi Roine

KUOLEMANJÄLKEINEN IKÄARVIO HAMPAAAN DENTIININ ASPARAGIINIHAPON
RASEMISAATIOREAKTION AVULLA

Turun yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen laitos

Suupatologia ja suurradiologia, Oikeushammaslääketiede

Syyslukukausi 2023

Ohjaajat: LL, EHL, HLT, oikeushammaslääkäri Vivian Reinhold, HLT, EHL, yliopistonlehtori
Jaana Willberg

Asiantuntijatarkastaja: LL, EHL, HLT, oikeushammaslääkäri Vivian Reinhold

Laajuus: 20 op

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin
OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen laitos

ROINE, LEEVI: Kuolemanjälkeinen ikäarvio hampaan dentiinin asparagiinihapon rasemisaatioreaktion avulla

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 39 sivua

Suupatologia ja suurradiologia, Oikeushammaslääketiede

Syyslukukausi 2023

Iän arvioiminen on aina ollut ihmisille tärkeää. Esimerkiksi tuntemattoman vainajan tai henkilöllisyydestä puuttavan pakolaisen iän arvioiminen on keskeistä. Iän selvittämisellä on monia oikeusvaikutuksia ja siksi se on oleellista yhteiskunnan toimivuuden kannalta. Hampaiston avulla tehtävät iänarvioinnit voidaan jakaa morfologisiin, radiologisiin ja biokemiallisiin.

Tämän syventävien opintojen opinnäytetyön tavoitteena on perehtyä hampaan dentiinin asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon perustuvan biokemiallisen iänarviointimenetelmän toimintaan ja käyttökelpoisuuteen. Opinnäyte on kirjallisuuskatsaus, jossa aineistona on käytetty PubMed-, Embase-, Cochrane Library-, Web of Science-, Scopus-tietokannoista ja Google Scholar -hakujen avulla löydettyjä artikkeleita sekä aiheeseen liittyvää kirjallisuutta.

Rasemisaatioreaktio on spontaani entsyymitoiminnasta riippumaton reaktio, jossa optisesti aktiivinen yhdiste muuttuu peilikuvaisomeerikseen. Reaktion nopeutta kiihdyttää lämpötila, kosteus sekä emäksinen pH. Asparagiinihappo on ihmiskehosta löytyvä aminohappo, jonka rasemisaationopeus on suuri, mikä mahdollistaa sen kertymisen ja mittaamisen erityisesti metabolisesti hitaissa kudoksissa, kuten hampaissa. Ihmiskehossa asparagiinihappoa syntetisoidaan L-enatiomeerinä, josta se muuttuu lineaarisesti ajan kuluessa D-enatiomeeriksi. Ihmisen kuollessa lämpötila laskee, mikä käytännössä pysäyttää rasemisaatioreaktion etenemisen. Laskemalla enatiomeerien välinen suhde voidaan arvioida henkilön ikä kuolinhetkellä.

Hampaan rakenteista juuren dentiiniä pidetään parhaimpana lähtömateriaalina menetelmälle, koska se on suojassa degeneratiivisilta muutoksilta. Vaikka rasemisaatioasteet vaihtelevat eri hampaiden välillä, näytehampaan valinta ei silti ole vakiintunutta. Yksijuurisia hampaita kuitenkin suositellaan, koska lähtömateriaalin kerääminen niistä on helppoa. Lähtökohtaisesti menetelmässä tulisi käyttää vain normaaleja ja terveitä hampaita, koska esimerkiksi karieshampaat tai epämuodostuneet hampaat antavat epäluotettavia tuloksia. Menetelmään vaikuttavat lisäksi näytteen preparointi, suoritettavat työvaiheet, enatiomeerien erottelun onnistuminen ja tulosten analysointiin tehdyt mallinnukset.

Asparagiinihapon rasemisaatioon perustuvan menetelmän yleistymistä rajoittaa muun muassa sen korkea hinta, kansainvälisen standardoinnin puute ja haasteet kontrollihampaiden saamisessa. Haitoistaan huolimatta menetelmä on tällä hetkellä yksi tarkimmista ja objektiivisimmista iänarviointityökaluista, jota voidaan soveltaa niin kuolleille kuin elävillekin henkilön iästä riippumatta. Iänarviointitarkkuus on usein noin ± 3 vuotta.

Asiasanat: iän arvioiminen, henkilöllisyyden varmistaminen, asparagiinihapon rasemisaatioreaktio, oikeushammaslääketiede

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 YLEISTÄ OIKEUSHAMMASLÄÄKETIETEEN IÄNMÄÄRITYSMENETELMISTÄ	3
2.1 Morfologiset menetelmät	4
2.2 Radiologiset menetelmät	6
2.3 Biokemialliset menetelmät	8
3 ASPARAGIINIHAPPO	11
4 RASEMISAATIOREAKTIO	13
5 MENETELMÄN SUORITTAMINEN	15
5.1 Fiksatiivit	16
5.2 Puhdistus	16
5.3 Pesu	16
5.4 Pulverisaatio	17
5.5 Demineralisointi	17
5.6 Hydrolyysi	17
5.7 Kaasukromatografia (GC) verrattuna korkean erotuskyvynnestekromatografiaan (HPLC)	18
5.8 Tulosten analysointi ja verrannollisuus	19
6 MENETELMÄN SUORITTAMINEN HAMPAASTA	22
6.1 Dentiini verrattuna hampaan muihin rakenteisiin	23
6.2 Erot eri hampaiden välillä	24
6.3 Dentiininäytealueen valinta	24
6.4 Menetelmän soveltuvuus epänormaaleille hampaille	25
6.4.1 Karioituneet hampaat	26
6.4.2 Maitohampaat	26
6.4.3 Ylilukuiset hampaat	26
6.4.4 Pinkit hampaat	27
6.5.5 Palaneet hampaat	27
7 MENETELMÄN KÄYTTÖ MAAILMALLA SEKÄ ETNISYYDEN VAIKUTUS	28
8 POHDINTAA	30
8.1 Hakujen onnistuminen ja laajuus	30
8.2 Menetelmän hyvät ja huonot puolet	31
LÄHTEET	35

1 JOHDANTO

Vainajien henkilöllisyyden varmistaminen on ollut ihmisille tärkeää varhaisista ajoista lähtien. Ikä on yksi keskeinen tieto, joka ohjaa vainajan tunnistamista. Kuolleiden lisäksi elävienkin ihmisten ikää joudutaan toisinaan arvioimaan. Kenties yksi varhaisimmista iänarvioinneista hampaiston avulla tapahtui Englannissa 1800-luvun alussa. Taloudellisen laman takia lapsityövoiman käyttö oli yhteiskunnassa tavallista. Säädösten mukaan alle 9-vuotiaita lapsia ei saa työllistää, ja alle 13-vuotiaiden ei tulisi tehdä yli yhdeksän tuntia töitä päivässä. Alle 7-vuotiaden lapsien työllistamisestä seurasi rangaistuksia. Siihen aikaan syntymätodistuksia ei ollut, joten ikää arvioitiin lähinnä pituuden avulla. Vuonna 1836 A.T. Thompson esitti, että lapset ovat alle 7-vuotiaita, jos heillä ei ole puhjennut ensimmäisiä pysyviä poskihampaita. Edwin Saundersin tieteellisessä julkaisussa vuonna 1837 todettiin 1049 lapsen hampaiden ja pituuksien tutkimisen jälkeen, että ikää voidaan arvioida hampaiden avulla luotettavammin kuin pituuden. (1,2).

Vainajan henkilöllisyys voi olla epäselvä monestakin syystä, kuten onnettomuuden, suuronnettomuuden, henkirikoksen sekä kuolemaan liittyvän ihmiskudoksen etenevien biologisten prosessien vuoksi. Ihmisen kuolemalla on useita oikeusvaikutuksia, mikä edelleen korostaa vainajan henkilöllisyyden varmistamisen merkitystä. Kun vainajan henkilöllisyys on varmistettu ja kuolinsyy selvitetty, voidaan esimerkiksi kirjoittaa kuolintodistus, antaa hautauslupa ja tehdä ilmoitus väestörekisteritietojärjestelmään. Tämä mahdollistaa edelleen muun muassa vakuutusosoikeudellisten ja perinnönjakoon liittyvien asioiden selvittämisen. Keskeistä on myös se, että omaisten surutyö voi alkaa, kun tiedetään varmasti, että läheinen on kuollut. (3).

Oikeuslääketieteellinen kuolemansyyn selvittäminen on Suomessa poliisin vastuulla. Lain mukaan oikeuslääketieteellinen kuolemansyyn selvittäminen tulee suorittaa, kun kuoleman ei tiedetä johtuneen sairaudesta tai kun vainaja ei viimeisen sairautensa aikana ole ollut lääkärin hoidossa. Myös silloin kun kuoleman on aiheuttanut rikos, tapaturma, itsemurha, myrkytys, ammattitauti tai hoitotoimenpide tai kun on aihetta epäillä kuoleman johtuneen jostakin sellaisesta syystä, suoritetaan oikeuslääketieteellinen kuolemansyyn selvittäminen. Selvitys tehdään lisäksi silloin, jos kuolema on muuten tapahtunut yllättävästi. Laki velvoittaa poliisia käyttämään tarvittaessa apuna lääkäriä kuoleman syyn selvittämisessä. Määräyksen oikeuslääketieteellisen ruumiinavauksen suorittamisesta antaa päällystöön kuuluva poliisimies, syyttäjäviranomainen, tuomioistuin tai Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. (4).

Vainajan voi tunnistaa monella tavalla, kuten visuaalisesti, esineellisesti, pituuden, sukupuolen, lääketieteellisten hoitotoimenpiteiden sekä sairauksien, sormenjälkien tai DNA:n avulla (3). Lisäksi

yksi keskeisistä vainajan tunnistuskeinoista on ikä (2). Iänarviointi silmämääräisesti on vain viitteellistä, joten sen tarkempaa arviointia varten tulee käyttää oikeushammaslääketieteellisiä tai antropologisia tutkimusmenetelmiä (3). Ikää voidaan arvioida esimerkiksi luuston kehityksen ja morfologian perusteella tai hampaiston avulla (5). Tässä kirjallisuuskatsauksessa esitellään muutamia oikeushammaslääketieteellisiä iänmäärittämismenetelmiä, joista eniten keskitytään hampaan dentiinin asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon perustuvaan menetelmään, sen toimintaan ja käyttökelpoisuuteen. Kyseisellä menetelmällä päästään usein jopa ± 3 vuoden tarkkuuteen (6–8).

2 YLEISTÄ OIKEUSHAMMASLÄÄKETIETEEN IÄNMÄÄRITYSMENETELMISTÄ

Oikeushammaslääketiede on oikeuslääketieteen osa-alue. Sen tehtäviin kuuluvat vainajien tunnistaminen, oikeuslääketieteellinen iän arvioiminen, kuolemansyyn ja rikosten selvittämiseen liittyvät suun alueen tutkimukset sekä muut viranomaisten pyynnöstä annettavat asiantuntijalausunnot. Sen lisäksi, että oikeushammaslääkärit avustavat viranomaisia oikeudellisissa ja rikosoikeudellisissa kysymyksissä, he ylläpitävät valmiutta suuronnettomuuksien varalta ja osallistuvat keskusrikospoliisin ylläpitämän uhrintunnistusyksikön (DVI) toimintaan. (9). Esimerkiksi lentotapaturmissa tai merenkulun katastrofeissa hampaiden avulla tapahtuva vainajien tunnistaminen on DNA-analyysin ohella yksi tehokkaimmista keinoista identifioida vainajia (10).

Oikeushammaslääketieteellisessä vainajan tunnistamisessa hyödynnetään muun muassa hampaan kiilteen rakennetta, sukupuolen määrittämistä ja hampaista saatavaa DNA-profiilia. Sukupuolen määrittäminen on mahdollista esimerkiksi hampaiston, kasvojen sekä kallon luiden avulla. (11). Lisäksi tunnistamisessa voidaan tietyissä tilanteissa hyödyntää puremajälkiä. Niiden tulkinta on kuitenkin erittäin vaikeaa, ja asiantuntijoiden näkemykset voivat olla hyvinkin erilaisia toisiinsa nähden. (12). Puremajälkien käyttäminen sopii käytettäväksi lähinnä vain silloin, jos puremajälki selvästi indikoi jotain poikkeavaa tekijän hampaistossa. Esimerkkejä tällaisista tekijöistä ovat suuret lohkeamat, puuttuvat etualueen hampaat tai muut merkittävät epämuodostumat tai poikkeavat muutokset hampaistossa. (10).

Vainajan hampaistoa voidaan myös verrata sen aikaisempiin elinaikaisiin hoitotietoihin, jos niitä on olemassa. Ihmisen hampaisto on hyvin yksilöllinen ja sitä toisinaan verrataan sormenjälkiin (2). Näistä tiedoista esimerkiksi ortopantomografiakuvat ovat arvokkaita (12). Suun terveydenhuollon tiedoista voidaan saada tietoa muun muassa proteettisista rakenteista, poistetuista hampaista tai hampaisiin laitetuista täyteaineista. Tietoja verratessa on hyvä huomioida mahdolliset muutokset aikaisempiin tietoihin nähden. Hampaista on saatettu esimerkiksi hoitaa uusilla täyteaineilla. Poistetut hampaat eivät kuitenkaan tule takaisin implantteja lukuun ottamatta. (10).

Lisäksi vainajan tietojen vertaamista aikaisempiin tietoihin edellyttää se, että vainajan henkilöllisyydestä on jotain tietoa tai rajaavia tekijöitä. Esimerkiksi lento-onnettomuudessa matkustajaluettelo tai onnettomuuspaikalta löydetty tavarat voivat rajata suun terveyden tiedoista tehtävän haun riittävän pieneksi. Hampaistosta saatavien tietojen vertaaminen aikaisempiin tietoihin ilman rajaavia tekijöitä on toistaiseksi hyvin vaikeaa tai mahdotonta. Britanniassa yritettiin siirtää julkisen terveydenhuollon tietoja siten, että laajojen hakujen tekeminen olisi mahdollista.

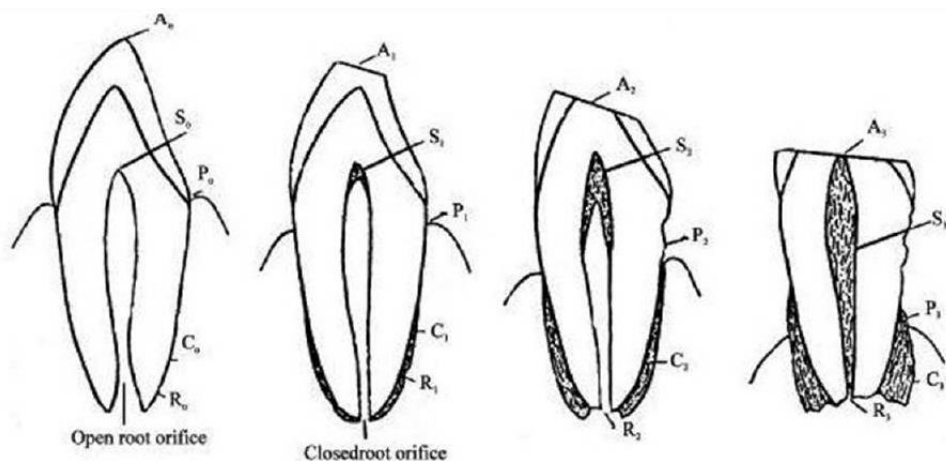
Potilastietojen laatu ja puutteellisuus kuitenkin tekivät niistä epäkäytännöllisiä vainajien tunnistamiseen. (10).

Siinä missä fyysiset tekijät ja muut esitiedot mahdollistavat vainajan tunnistamisen myös ikä on yksi keskeisimmistä vainajan tunnistamista ohjaavista tekijöistä (2). Hampaan kovakudokset ovat erittäin kestäviä ja säilyvät normaaliolosuhteissa hajoamattomina, mikä selittää niiden käyttökelpoisuuden muuten tunnistamattomaksi turmeltuneessa vainajassa. Kuolleiden lisäksi toisinaan myös elävien ihmisten ikä on syytä määrittää esimerkiksi puutteellisten tai epäluotettavien henkilöllisyyspapereiden takia. Lapsilla ja aikuisilla on erilaisia oikeuksia ja velvollisuuksia, jotka vaikuttavat muun muassa adoptointiin, rikoksellisiin seuraamuksiin tai turvapaikkahakemuksiin. Esimerkiksi kansainväliset ihmisoikeussopimukset, perheiden yhdistämiseen liittyvät lapsen oikeudet ja väärinkäytön mahdollisuus ovat nostaneet iänmäärittämiseen liittyvät kysymykset ajankohtaisiksi. (2,12). Oleskelulupaa Suomesta hakevalle ulkomaalaiselle voidaan Suomen lain mukaan tehdä oikeuslääketieteellinen tutkimus iän selvittämiseksi, jos on olemassa ilmeisiä perusteita epäillä hänen iästään antamiensa tietojen luotettavuutta. Tutkimuksen tekee Maahanmuuttoviraston pyynnöstä Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. (13).

Hampaiston avulla tehtävät iänarvioinnit voidaan jakaa kolmeen eri kategoriaan: morfologisiin, radiologisiin sekä biokemiallisiin menetelmiin (2).

2.1 Morfologiset menetelmät

Morfologiset menetelmät iänarvioinnissa perustuvat hampaan muotoihin sekä rakenteellisiin ominaisuuksiin. Hampaan kehitysvaiheissa ja yksilön ikääntyessä hampaistossa tapahtuu muutoksia, joita voidaan arvioida. Gustafsonin menetelmä on yksi vanhimmista ja ensimmäisistä keinoista arvioida ikää hampaiston avulla. Menetelmä on yksi yleisimmin käytetyistä iänarviointitekniikoista yli 21-vuotiailla. (11). Tämä Gosta Gustafsonin 1950-luvun alussa kehittämä morfohistologinen menetelmä perustuu yksijuuristen hampaiden kuuden eri muutoksen tai ominaisuuden arviointiin (2).



A_0 = no attrition	A_1 = attrition within enamel	A_2 = attrition reaching dentin	A_3 = attrition reaching pulp
S_0 = no secondary dentin	S_1 = secondary dentine has begun to form in upper part of pulp cavity	S_2 = pulp cavity is half filled	S_3 = pulp cavity is nearly or wholly filled with secondary dentin
P_0 = no periodontitis	P_1 = periodontitis just begun	P_2 = periodontitis along first one-third of root	P_3 = periodontitis has passed two-thirds of root
C_0 = normal layer of cementum laid down	C_1 = apposition a little greater than normal	C_2 = great layer of cementum	C_3 = heavy layer of cementum
R_0 = no root resorption visible	R_1 = root resorption only on small isolated spots	R_2 = greater loss of substance	R_3 = great areas of both cementum and dentin affected

Kuva 1. Gustafsonin metodin luokittelukriteerit (2).

Arvioitavia tekijöitä ovat kuvan 1 mukaisesti: kiilteen kuluminen, sekundaarisen dentiinin kertyminen, periodontaaliligamentin laskeutuminen apikaalisesti, sementin määrän kasvaminen, juuren resorptio sekä dentiinin läpinäkyvyys. Kukin kriteeri arvioidaan kokonaisluvuihin väliltä 0–3. Ikä saadaan laskettua seuraavalla kaavalla, jossa X tarkoittaa kriteereistä saatua yhteenlaskettua kokonaispistemäärää:

$$\text{Ikä} = 4,56 * X + 11.43$$

Gustafsonin menetelmää ei kuitenkaan voi käyttää eläville yksilöille, ja kriteerien arviointi on subjektiivista. Lisäksi kuuden kriteerin arviointi on hidasta ja välillä vaikeaa. Esimerkiksi periodontaaliligamentin arvioiminen hajonneessa ruumiissa voi olla mahdotonta. Myöskään aina suun etualueella sijaitsevat yksijuuret hampaat eivät ole säilyneet riittävässä kunnossa. (2). Gustafsonin mukaan menetelmän virhemarginaali on noin ± 3.6 vuotta (14).

Gustafsonin menetelmää soveltaen ja täydentäen on julkaistu useita muita vastaavia iänarviointitekniikoita (2). Tutkimusten pyrkimyksenä on ollut paikata Gustafsonin menetelmän

puutteita ja toisaalta luoda mahdollisimman tarkka ja yksinkertainen menetelmä. Kuitenkaan muihin vastaaviin metodeihin verrattuna mitään ylivoimaista morfologista menetelmää ei vielä ole keksitty.

Hampaan kehitykseen liittyviä muutoksia voidaan myös hyödyntää iän arvioimiseen. Retziuksen viivat antavat viitteitä hampaiden ajallisesta kehityksestä. Retziuksen viivat kuvaavat kehittyvän hampaan kiilteen mineralisoitumisen poikkeavuuksia. Esimerkiksi metaboliset häiriöt tai muu elimistön stressi saattaa johtaa mineralisoitumisviivojen syntymiseen lähemmäs toisiaan. Myös normaaliin kiilteen syntymiseen kuuluva lepojarkso saattaa pidentyä. Näistä syistä Retziuksen viivat näyttävät leveämpinä ja näkyvämpinä juovina hampaassa. Viivoja voidaan hyödyntää hampaiston kehityksen kronologisen iän kartoittamisessa. (11).

Retziuksen viivat päättyvät kiilteen pinnalle, johon muodostuu viivoista johtuva juovainen pintarakenne. Rakennetta kutsutaan perikymataksi. Perikymata antaa tietoa esimerkiksi kruunujen kehityksen aikataulusta. (11).

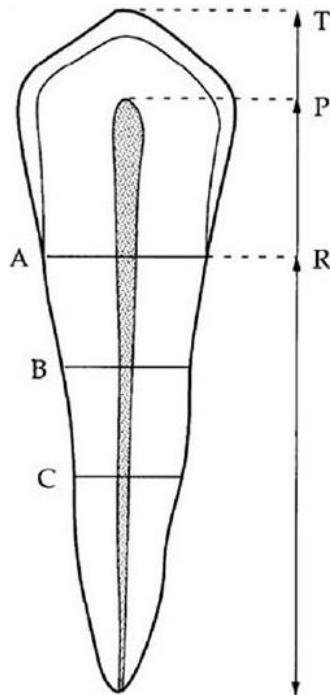
Syntymisestä aiheutuvasta stressistä vauvan hampaaseen syntyy poikkeuksellisen voimakas hypomineralisoitunut ”Retziuksen” viiva, jota kutsutaan neonataliviivaksi (11). Neonataliviivan olemassaolo tarkoittaa sitä, että vauva on syntynyt elävänä. Lisäksi neonataliviivan jälkeen syntyneen kovakudoksen muodostumisen avulla on mahdollista selvittää vauvan syntymän jälkeinen selviytymisaika päivien tarkkuudella. Neonataliviivan tarkastelu on keskeistä erityisesti vauvasurmien analysoinnissa, koska sen avulla voidaan päätellä vauvan elintilanne syntyessä ja mahdollinen elinaika sen jälkeen. (15).

Gustafsonin menetelmästä erilläänkin dentiinin läpinäkyvyys, sementtikerroksen paksuus ja sementin kehitykselliset uurteet ovat yksinään mahdollisia iän arvioimisessa käytettäviä työkaluja (11). Näistä kaksi viimeisintä ovat hyvin harvoin käytettyjä menetelmiä riittämättömän tarkkuuden takia. Tutkimuksessa, jossa analysoitiin 200 hammasta, oli niiden ennustettu ikä ± 12 vuotta, ja vain 1,5 %:ssa tapauksissa ikä arvioitiin täsmälleen oikein. (16).

2.2 Radiologiset menetelmät

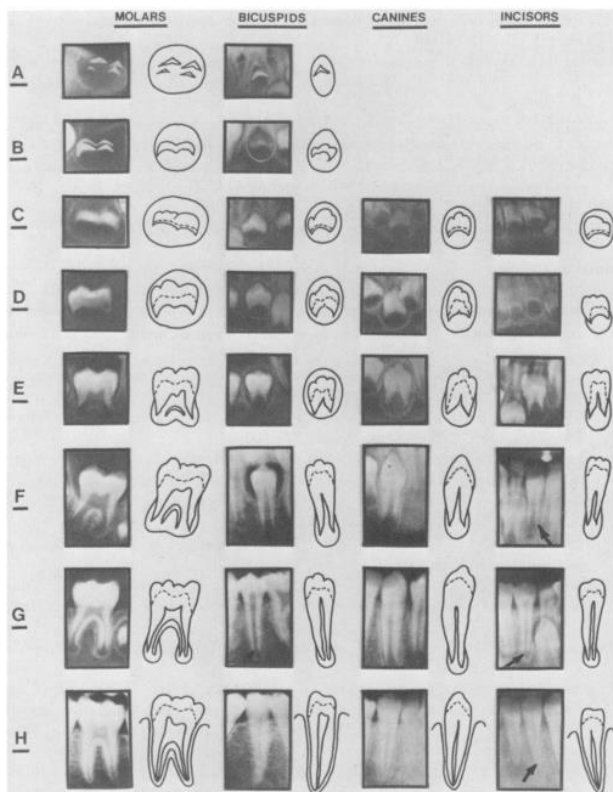
Radiologisissa menetelmissä hampaiden ikää arvioidaan tavallisimmin röntgenkuvien avulla. Etuna on se, että röntgenkuvia voidaan ottaa sekä elossa olevilta että kuolleilta ihmisiltä hampaita avaamatta, poistamatta tai leikkaamatta. Radiologisia ja morfologisia menetelmiä suositellaan käytettäväksi lapsille sekä teiniä-ikäisille. Hampaiden sekä luuston kehittyminen mahdollistaa suhteellisen tarkan iänarvioinnin. (5).

Kvaalin työryhmineen kehittämä menetelmä (17) arvioi sekundaarisen dentiinin kertymistä pulpaonteloon. Arviointi tapahtuu epäsuorasti mittaamalla pulpan radiotiheyttä eli sitä, kuinka hyvin kudokset estää röntgensäteiden kulkua aineen läpi (2). Menetelmässä verrataan pulpan pituutta juuren pituuteen, pulpan pituutta koko hampaan pituuteen, hampaan pituutta juuren pituuteen sekä pulpan ja juuren leveyttä kolmella eri tasolla (18). Menetelmän onnistuminen edellyttää sitä, ettei hammas ole kiertynyt, kulunut tai karioitunut. Tekniikasta on erityisesti hyötyä arvioitaessa, onko henkilö yli vai alle 18-vuotias. (2).



Kuva 2. Kvaalin menetelmän mukaiset hampaan radiologisen iänmäärityksen mitattavat mitat: T = hampaan pituus, R = juuren pituus mesiaaliselta puolelta, P = pulpan maksimaalinen pituus, A = juuren ja pulpan leveys kiillesementtirajalta, B = juuren ja pulpan leveys A:n ja C:n puolivälistä sekä C = juuren ja pulpan leveys apeksin ja kiillesementtirajan puolivälistä (18).

Demirjianin työryhmineen vuonna 1973 kehittämä menetelmä on eräs hyvin laajasti käytetyistä radiologisista iänarviointimenetelmistä, joka soveltuu parhaiten lapsille ja teini-ikäisille. Siinä panoraamaröntgenkuvasta arvioidaan seitsemää vasemman puolen alaleuan hammasta. Kunkin hampaan kehitysastetta arvioidaan kuvien ja sanallisten selitysten avulla. Kehitysasteelle annetaan arvo väliltä A-H. Kuvallisen indikaation lisäksi kunkin kirjaimen kehitysastetta kuvaavien ehtojen on täyttyttävä, jotta hammas voidaan luokitella tiettyyn kehitysasteeseen. Menetelmässä arvioidaan muun muassa hampaan mineralisoitumisastetta, kruunun kehitystä ja juuren kärjen sulkeutumista. (19).



		Boys								
		Stage								
Tooth	0	A	B	C	D	E	F	G	H	
M ₂	0.0	2.1	3.5	5.9	10.1	12.5	13.2	13.6	15.4	
M ₁				0.0	8.0	9.6	12.3	17.0	19.3	
PM ₂	0.0	1.7	3.1	5.4	9.7	12.0	12.8	13.2	14.4	
PM ₁			0.0	3.4	7.0	11.0	12.3	12.7	13.5	
C				0.0	3.5	7.9	10.0	11.0	11.9	
I ₂				0.0	3.2	5.2	7.8	11.7	13.7	
I ₁					0.0	1.9	4.1	8.2	11.8	

		Girls								
		Stage								
Tooth	0	A	B	C	D	E	F	G	H	
M ₂	0.0	2.7	3.9	6.9	11.1	13.5	14.2	14.5	15.6	
M ₁				0.0	4.5	6.2	9.0	14.0	16.2	
PM ₂	0.0	1.8	3.4	6.5	10.6	12.7	13.5	13.8	14.6	
PM ₁			0.0	3.7	7.5	11.8	13.1	13.4	14.1	
C				0.0	3.8	7.3	10.3	11.6	12.4	
I ₂				0.0	3.2	5.6	8.0	12.2	14.2	
I ₁					0.0	2.4	5.1	9.3	12.9	

NB: Stage 0 is no calcification

Kuva 3. Demirjianin menetelmän kuvalliset hampaan kehitysasteen tulkitsemisohjeet sekä taulukko hammaskohtaisen pistemäärän saamiseksi (19).

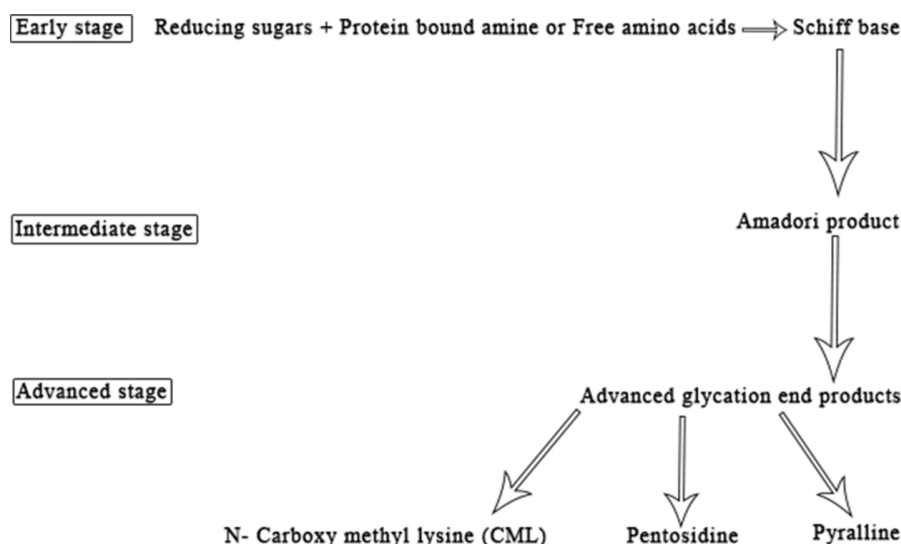
Kehitysasteen arvioinnin jälkeen katsotaan taulukosta kuvan 3 mukaisesti sukupuolijaotellusti kullekin hampaalle kirjainta vastaava pistemäärä. Hampaiden kehitysasteiden pistemäärät lasketaan yhteen. Yhteenlasketulla pistemäärällä voidaan arvioida populaatiokohtaisesti yksilön hampaistoikää. Tulkinta tapahtuu käyrää tulkitsemalla populaatiospesifisestä kuvaajasta. Hampaistoian avulla voidaan arvioida kronologista ikää. (19). Hampaan kehitysasteen arviointi on luotettava, koska esimerkiksi muutokset kehon ravitsemuksessa tai endokrinologiassa eivät merkittävästi vaikuta hampaan mineralisoitumiseen. Ongelmana on menetelmän suuri populaatiospesifisyys, joka on johtanut vaihtelevan suuruisiin virheisiin yksilön ikää arvioitaessa. (20). Menetelmän edellytyksenä lieneekin juuri kyseiselle tutkittavalle populaatiolle sovitettu iän ja hampaan kehitysastetta kuvaavan kuvaajan rakentaminen.

2.3 Biokemialliset menetelmät

Biokemialliset menetelmät perustuvat hampaan rakenteiden kemiallisten ominaisuuksien ja muutosten tulkitsemiseen. Niitä voidaan pitää objektiivisempina verrattuna morfologisiin ja radiologisiin metodeihin. (6).

Kollageenia löytyy runsaasti hampaan dentiinin orgaanisesta osasta (21). Tyypin I kollageeni koostuu kolmesta helikaalisesta ketjusta. Ketjuja stabiloi niiden väliset kovalenttiset sidokset. Vastasyntetisoidussa kollageenissa nämä kovalenttiset ristisidokset ovat pelkistettävissä. Kollageenin muodostumisen päätyttyä näiden pelkistettävissä olevien ristisidosten määrä vähenee iän myötä, jolloin muodostuu kypsiä ei-pelkistettävissä olevia ristisidoksia. Luusta ja dentiinistä löytyy hydroksipyridiniumin kahta eri ei-pelkistettävissä olevaa ristisidososaa: pyridinoliinia ja deoksyriidoliiniä. Näiden ei-pelkistettävissä olevien ristisidosten määrä lisääntyy iän myötä. Deoksyriidoliinin ristisidoksia on tutkittu hampaan dentiinistä. Tutkimuksissa menetelmän virhemarginaali oli 15 vuotta. Menetelmän ongelmana onkin juuri sen suuri epätarkkuus. (6).

Kehittynyt glykaation lopputuote (advanced glycation end-products, AGEs) syntyy, kun pelkistävät sokerit (glukoosi, fruktoosi, mannoosi) reagoivat ei-entsyymaattisesti esimerkiksi proteiinien, nukleiinihappojen ja rasvojen kanssa muodostaen yhdisteen, jota kutsutaan Amadorin yhdisteeksi. Amadorin yhdiste muuttuu edelleen irreversiibelien välivaiheiden kautta vakaiksi yhdisteiksi, joita kutsutaan kehittyneiksi glykaation lopputuotteiksi. Näitä lopputuotteita kertyy pitkäikäisiin proteiineihin. Ne saattavat aiheuttaa kudosisvaurioita ja edesauttaa eräiden tautien, kuten diabeteksen, syntyä. (6).



Kuva 4. Kehittyneiden glykaation lopputuotteiden muodostuminen (6).

AGE:t tarttuvat helposti kollageeniin toimien ristisiltana kollageenisäikeiden välillä kollageenirikkaissa kudoksissa. Dentiiniin AGE:t kulkeutuvat verenkierron kautta. Ne saavat kollageenin ristiinsidonnalla aikaan muun muassa rusehtavan värin kehittymisen hampaalle muiden morfologisten ja mekaanisten muutosten ohella. Kehittyneistä glykaation lopputuotteista esimerkiksi

karboksimeetyylilyysiinin ja pentosidiinin määrän avulla voidaan arvioida eliön ikää. Menetelmä saattaa antaa normaalia korkeamman ennusteen, mikäli henkilöllä on kohonnut verensokeri. Lisäksi kariotuneet hampaat yliarvioivat henkilön ikää AGE:hen perustuvaa menetelmää käytettäessä. (6).

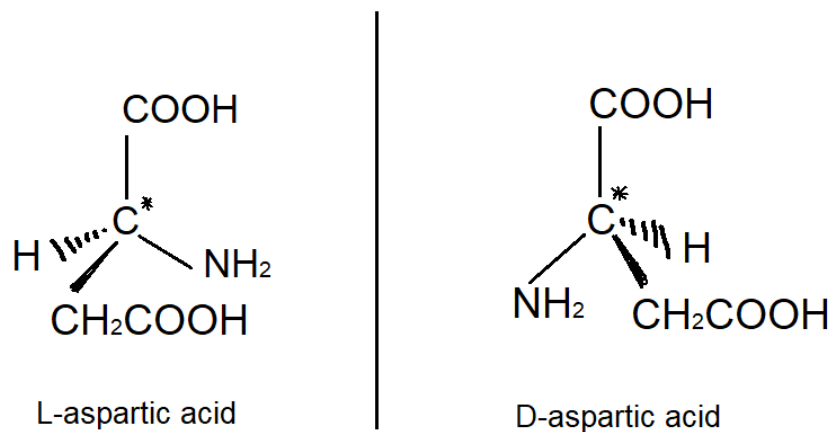
Lyijy on yksi pahimmista ympäristömyrkyistä. Lyijyn lähteitä on muun muassa tietyt teollisuudenalat, eräät polttoaineet, lyijymaalit ja liikenne. Lähes kaikki elimistöön kertyvästä lyijystä varastoituu luustoon. Kuitenkin esimerkiksi hampaista, verestä ja pehmytkudoksista voi myös löytyä lyijyä. Erona on se, että hampaisiin päätyneet lyijy ei pääse enää poistumaan, koska hydroksiapatiittikiteitä ei enää pilkota ja rakenneta uudelleen. Sen sijaan esimerkiksi luustossa luun uudismuodostumisen kautta varastoituneen lyijyn määrä vaihtelee. Veren lyijypitoisuus puolestaan korreloi lähinnä välittömään lyijyaltistukseen. Näin ollen hampaat sopivat parhaiten kokonaislyijyaltistuksen arvioimiseen. Lyijyn määrä arvioimalla voidaan päätellä, kuinka kauan sen kertymiseen on kulunut aikaa ja siten voidaan arvioida eliön ikää. Hampaan rakenteista dentiinin on todettu olevan lyijyn pääasiallinen kertymispaikka. Lyijyn pohjautuvan iänarvioinnin suuri heikkous on se, että ympäristöstä tuleva lyijyaltistus on erittäin populaatio- ja aluekohtaista. Näin ollen menetelmän yleistettävyys ei ole mahdollista. (6).

Myös mitokondriaalisen DNA:n avulla voidaan arvioida henkilön ikää. Mitokondriaalinen DNA sijaitsee mitokondrioiden sisäkalvon lähettyvillä. Kehossa normaalistikin syntyvät happiradikaalit aiheuttavat vahinkoa ja mutaatioita muun muassa mitokondrioiden DNA:lle. Mitokondrioiden DNA:n vauriot kertyvät iän mukana ja saattavat aiheuttaa kliinisesti havaittavia toiminnan poikkeavuuksia. On havaittu, että hampaan dentiinin mitokondriaalisen DNA:n määrä vähenee dentiinin iän kasvaessa. Mitokondriaaliseen DNA:han perustuva menetelmä on kuitenkin kallis ja aikaavievä. (6).

Merkittävin ja tarkin biokemiallinen iänarviointimenetelmä on asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon pohjautuva tekniikka. Lähes kaikki aminohapot ovat optisesti aktiivisia. Tässä menetelmässä hyödynnetään lähinnä asparagiinihappoa. Ihmiskehossa asparagiinihappo syntetisoidaan vain L-enatiomeerinä ja sitä löytyy muun muassa hampaan rakenteista. Ajan kuluessa L-enatiomeeri muuttuu spontaanisti suhteellisen lineaarisesti D-enatiomeeriksi. Selvittämällä aminohapon L- ja D-enatiomeerin suhde voidaan laskea proteiinin ikä. Proteiinin iästä puolestaan voidaan tehdä päätelmiä ja arvioita eliön iästä. Menetelmän toimintaa selvitetään yksityiskohtaisesti seuraavissa luvuissa.

3 ASPARAGIINIHAPPO

Asparagiinihappo, lyhenteeltään Asp, on proteiinien biosynteesissä käytettävä aminohappo. Asparagiinihappo ei ole essentiaali aminohappo, joten ihmiskeho pystyy syntetisoimaan sitä itse. Kyseessä on optisesti aktiivinen aminohappo eli siinä on kiraliakeskus. Optisesti aktiivisesta proteiinista on olemassa kaksi eri muotoa: L- ja D-enatiomeerit kuvan numero 5 mukaisesti. Optisesti aktiivisen aineen ominaisuuksiin kuuluu kyky kääntää tasopolarisoitua valoa eri suuntiin riippuen siitä, kumpaa enatiomeeriä tutkitaan. Ionimuodossaan asparagiinihappoa kutsutaan aspartaattiksi. Asparagiinihapon alfahiileen kiinnittyneen karboksyyliiryhmän pKa on 1.92, sivuketjun karboksyyliiryhmän pKa on 3.83 ja amiiniosan pKa 9.87. (22). Näin ollen kehon fysiologisessa pH:ssa (noin 7,4) asparagiinihappo on ionisoituneessa muodossa.



Kuva 5. Asparagiinihapon L- ja D-enatiomeerit (molemmat peilikuvaisomeerit).

Ihmiskehossa proteiinit syntetisoidaan kuitenkin ainoastaan L-muodossa, johtuen muun muassa ihmiskehon entsyymikoneiston spesifisyydestä (23). Tästä on olemassa muutamia poikkeuksia, mutta asparagiinihappo syntetisoidaan kuitenkin L-enatiomeerinä (24). Tämä tieto luo pohjan tässä kirjallisuuskatsauksessa käsiteltävälle menetelmälle. Ihmiskehon proteiinit muokkautuvat ja vaurioituvat syntetisoitumisensa jälkeen ajan kuluessa. Yksi näistä vaurioitumiskeinoista on rasemisaatio, jonka toiminnasta selitetään tarkemmin seuraavassa luvussa. Rasemisaation avulla kehon syntetisoimat aminohapot muuttuvat automaattisesti sekä hitaasti L-enatiomeeristä D-enatiomeeriksi spontaanisti tapahtuvan reaktion avulla. Täten asparagiinihapon D-enatiomeeriä kertyy ajan kuluessa kudoksiin. D-enatiomeerin määrä suhteessa L-enatiomeeriin korreloi vahvasti proteiinin ikään. (25).

Koska menetelmässä tutkitaan L- ja D-enatiomeerien suhdetta ja rasemisaatioreaktio on hidas, on järkevää valita aminohappo, jonka rasemisaationopeus on mahdollisimman suuri. Hidas

reaktionopeus tarkoittaisi sitä, että toista enantiomeeriä ehtisi syntyä vain vähän, jolloin sen mittaaminen ja luotettavien tulosten saaminen on vaikeampaa. Asparagiinihapon rasemisaatioreaktion nopeus on yksi nopeimmista vakaiden aminohappojen kesken. (23). Tämän jälkeen seuraavaksi nopeimmat muista mahdollisista aminohapoista olivat glutamiini (Glu) ja alaniini (Ala) edellä mainitussa järjestyksessä (26). Ohtani työryhmineen vertasivat tutkimuksessaan asparagiinia, glutamiinia ja alaniinia. Kuumennuskokeissa he havaitsivat D/L-suhteen ja iän välisen kertoimen olevan asparagiinille 0.986–0.994, glutamiinille 0.522–0.806 ja alaniinille 0.577–0.737. Tulokset puoltavat asparagiinin soveltuvuutta menetelmään ja toisaalta osoittavat, että glutamiini ja alaniini toimivat menetelmässä, mutta eivät niin tarkasti kuin asparagiini (27).

Proteiineja, joissa on asparagiinihappoa, löytyy ympäri kehoa. Esimerkiksi hampaat, luut, rusto ja aivosolut sisältävät proteiineja, joissa on asparagiinihappoa (24). Luvussa 6 käsitellään, miksi juuri hampaan dentiini on valittu menetelmän lähtömateriaaliksi. Dentiini voidaan jakaa sekä orgaaniseen että epäorgaaniseen osuuteen. Epäorgaaninen osuus dentiinistä sisältää mineraalia ja vettä. Mineraalia on dentiinin painosta noin 70 % ja vettä noin 10 %. (28). Mineraali on lähinnä hydroksiapatiittia, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Orgaaninen osuus on noin 20 massaprosenttia dentiinistä ja se koostuu lähinnä tyypin I kollageenistä sekä ei-kollageenisistä proteiineista. Asparagiinihappoa löytyy runsaasti juuri dentiinin ei-kollageenisistä proteiineista. (21).

4 RASEMISAATIOREAKTIO

Rasemisaatio on kemiallinen reaktio, jossa optisesti aktiivinen aine muuttuu sen peilikuvaksi eli aineen toiseksi enantiomeeriksi. Enantiomeerit alun perin tunnustettiin sen perusteella, mihin suuntaan ne käänsivät tasopolarisoitua valoa. L-enantiomeereiksi kutsutaan enantiomeerejä, jotka kääntävät valoa vasemmalle. Vastaavasti D-enantiomeerit kääntävät valoa oikealle. (29). Optisella aineella on kiraliakeskus, johon on kiinnittyneenä vähintään neljä erilaista atomia tai atomiryhmää mahdollista epäsymmetrisyyden. Eri aineilla rasemisaatioreaktion nopeus on erilainen. Mikäli seoksessa on aineen kumpaakin enantiomeeriä yhtä paljon, kutsutaan seosta raseemiseksi seokseksi.

Glysiiniä lukuun ottamatta kaikki aminohapot ovat optisesti aktiivisia. Ne sisältävät aminoryhmän ($-NH_3$), karboksyyliiryhmän ($-COOH_2$) ja vaihtelevan sivuketjun ($-R$). Proteiineissa tapahtuu ajan myötä erilaisia muutoksia ja vaurioita kuten hapettumista, isomerisaatiota ja rasemisaatiota. Näistä rasemisaatio korreloi proteiinin ikään parhaiten, sillä enantiomeerien muuttuminen toisikseen on spontaania ja entsyymitoiminnasta riippumatonta. Ihmiskehossa proteiinit syntetisoidaan L-enantiomeereinä, jotka muuttuvat ajan kuluessa D-enantiomeereiksi. Tähän rasemisaatioreaktioon vaikuttaa esimerkiksi lämpötila, kosteus sekä pH. (24).

Lämpötilan laskeminen pysäyttää lähes täydellisesti rasemisaatioreaktion. Kuollessa ihmisen kehon lämpötila laskee, mikä puolestaan pysäyttää rasemisaatioreaktion mahdollistaen iänarvioinnin menetelmään pohjautuen. Eräiden arvioiden mukaan menetelmän avulla henkilön kuolinikä voidaan arvioida jopa 10 vuotta kuoleman jälkeen. (8). Tähän vaikuttaa kuitenkin muut ympäristöolosuhteet, jotka mahdollisesti voivat muuttaa rasemisaation nopeutta. Vedessä reaktio etenee nopeammin kuin kuivassa ympäristössä. Kosteus siis kiihdyttää reaktionopeutta. Vastaavasti emäksinen pH kiihdyttää rasemisaatioreaktion nopeutta ja voi johtaa virheellisesti tulkitsemaan proteiinin todellista vanhemmaksi. Mitä pidempi altistus korkealle pH:lle on sitä vanhemmaksi menetelmä tulkitsee proteiinin. (30).

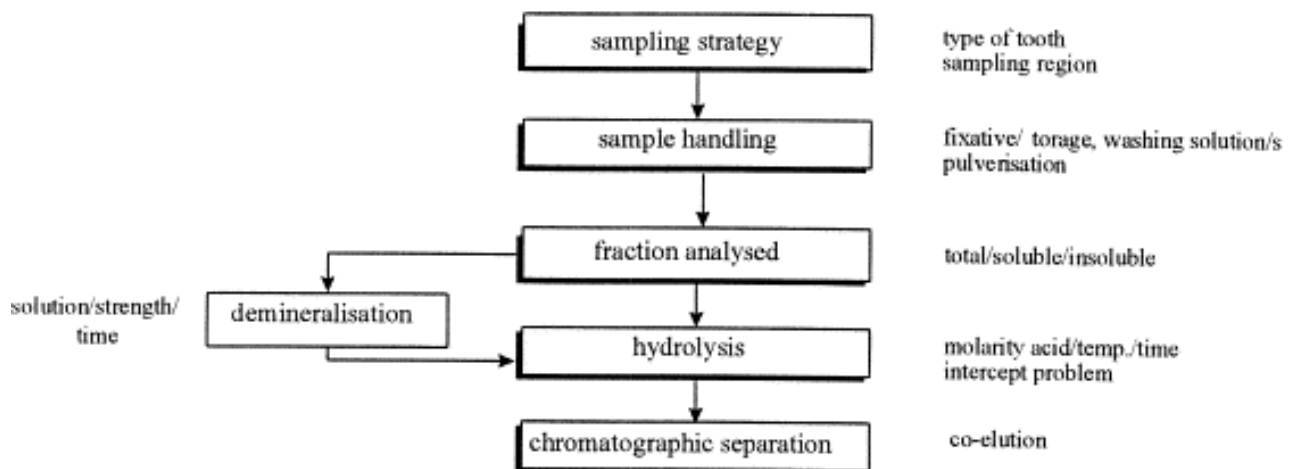
Edellisessä luvussa on selitetty, miksi juuri asparagiinihappo on soveltuvin aminohappo rasemisaatioreaktiota hyödyntäviin iänmääritysmenetelmiin. Asparagiinihapon spontaanin rasemisaatioreaktion seurauksena ihmiskehossa syntetisoitumatonta D-enantiomeeriä alkaa kertymään kudoksiin ajan kuluessa suurin piirtein vakionopeudella. Vertailemalla L- ja D-enantiomeerin suhdetta voidaan luoda päätelmiä proteiinin iästä. Proteiinin iästä puolestaan voidaan, erityisesti matalan metabolian kudoksissa, tehdä arvioita eliön iästä. (25). Matalan metabolian kudoksissa syntyneitä proteiinia ei poisteta tai tehdä lisää, jolloin D-enantiomeerin kertyminen ja mittaaminen on mahdollista. Rasemisaation ja iän välinen yhteys oivallettiin vasta noin 1970-luvun alussa. Aluksi

sitä hyödynnettiin lähinnä geokemiassa, mutta pian menetelmää alettiin soveltamaan esimerkiksi arkeologissa iänmäärytyksissä. Asparagiinihapon nopean rasemisaationopeuden takia D-enatiomeerejä pystytään havaitsemaan myös nuoremmissa kudoksissa ja siksi menetelmä soveltuu myös elävälle ihmiskudokselle. (25). Vuonna 1975 julkaistussa tutkimuksessa Helfman ja Bada havaitsivat asparagiinihapon D-enatiomeerikertymiä ihmisen hampaan kiilteestä ja dentiinistä. Näistä erityisesti dentiinin asparagiinihappo korreloi merkittävästi ikään. (23). Luvussa kuusi käsitellään hampaan rakenteiden ja kehon muiden kudosten käyttöä menetelmässä.

5 MENETELMÄN SUORITTAMINEN

Asparagiinihapon rasemisaatioon perustuvan iänarviointimenetelmä on monimutkainen ja monivaiheinen. Hammas on tavallisesti poistettava, jotta se voidaan valmistella menetelmää varten. Tutkimuksesta riippuen usein riittävä määrä dentiiniä on noin 5–10 mg, mutta jopa noin 2–3 mg voi olla riittävä määrä. (31).

Dentiinin orgaaninen matriksi koostuu 91 %:sesti happoihin liukenemattomasta kollageenisesta ja 9 %:sesti happoihin liukenevasta ei-kollageenisesta osasta. Menetelmässä voidaan hyödyntää joko dentiiniä kokonaisuudessaan, dentiinin happoihin liukenevaa ei-kollageenista osuutta tai dentiinin happoihin liukenematonta kollageenista osuutta. Julkaisuissa on eroja siinä, mitä osaa dentiinistä hyödynnetään, mutta eniten on tutkittu dentiinin käyttämistä kokonaisuudessaan menetelmää varten. Happoihin liukenevassa ei-kollageenisessä osuudessa on suurimmat D-asparagiinihapon pitoisuudet, joten teoriassa sen avulla iän saisi arvioitua tarkimmin. Kuitenkin sen eristäminen ja tarkka analysoiminen työvaiheidensa puolesta on haastavaa. Happoihin liukenematonta dentiinin osaa ei suositella yksinään käytettäväksi menetelmään, koska sen rasemisaatioaste on liian pieni. (32,33).



Kuva 6. Kaavio menetelmän työvaiheista (34). Hampaan ja dentiinialueen valintaa käsitellään luvussa kuusi.

Menetelmän suorittaminen tarkasti sekä tiettyjen työvaiheiden noudattaminen on tärkeää, koska osa työvaiheista saattaa vaikuttaa rasemisaatioasteeseen ja sitä kautta ikäarvioon. Menetelmän kriittisin vaihe lienee D- ja L-enatiomeerin erottaminen toisistaan, sillä D-enatiomeeriä on hyvin vähän verrattuna L-enatiomeeriin. (35). Kaikissa tutkimuksissa ei noudateta jokaista seuraavista työvaiheista tai sitten kaikkia työvaiheita ei ole kerrottu julkaisuissa niin yksityiskohtaisesti. Alla olevat työvaiheet toimivat peruspilareina menetelmän suorittamiselle. Vaiheet 5.1–5.5 kuuluvat

valmisteleisiin vaiheisiin, vaiheet 5.6–5.7 laboratoriovaiheisiin ja vaiheessa 5.8 suoritetaan analysointi.

5.1 Fiksatiivit

Ikäarviointia suoritettaessa asparagiinihapon rasemisaatioreaktion avulla voidaan hyödyntää niin sanottuja kontrollihampaita. Menetelmän avulla tutkitun hampaan rasemisaatioastetta verrataan saman leuan samaan hampaan verrokkeihin. Näitä verrokkihampaita säilytetään usein fiksatiiveissa, kuten etanolissa tai formaliinissa. Toisaalta myös tutkittavaa hammasta voidaan säilyttää fiksatiivissa, mikäli tutkimusta ei kyetä suorittamaan välittömästi. Ohtanin työryhmineen julkaisemassa tutkimuksessa fiksatiivien aiheuttamaa rasemisaatiota tutkittiin 95-prosenttisessa etanolissa, 10-prosenttisessä formaliinissa ja 10-prosenttisessä neutraalissa formaliinissa. Näistä aineista rasemisaatioreaktiota eniten kiihdytti 10-prosenttinen neutraali formaliini ja vähiten 95-prosenttinen etanoli. Kuitenkin näistä fiksatiiveista aiheutuva rasemisaatio on hyvin pientä. Tutkimuksen mukaan 10 vuoden ajan näissä fiksatiiveissa säilytyistä hampaista sai edelleen erittäin tarkasti arvioitua henkilön iän. Tutkimus suosittelee fiksatiiveista etanolin ja formaliinin käyttöä. (36).

Lisäksi formaldehydin käyttöä fiksatiivina on ehdotettu, mutta sen on arvioitu vaikuttavan rasemisaatioon liian merkittävästi, jotta sen käyttö olisi suositeltavaa (24).

5.2 Puhdistus

Tutkimuksesta riippuen näytteen puhdistamiseen on käytetty erilaisia keinoja. Puhdistamisella halutaan poistaa näytehampaasta ylimääräinen kudospaino, kuten mahdolliset verijäämät ja erilaiset pehmytkudosjäämät (24). Eräässä tutkimuksessa mainitaan vain nopea vesihuuhtelu (37), kun taas toisessa desinfiointiin käytetään fiksatiivia (10-prosenttista formaliinia) (31). Puhdistukseen on myös mahdollista käyttää natriumhypokloriittia (NaOCl). Se läpäisee kuitenkin dentiinin ja siksi pitkittynyt altistus sille saattaa vaikuttaa D- ja L-enantiomeerien suhteeseen. (24).

5.3 Pesu

Edellisen puhdistusvaiheen lisäksi näytteet saatetaan pestä asetonilla, jonka jälkeen pesua jatketaan 0,2 molaarisella suolahapolla (HCl) (24). Tosin on myös esitetty suosituksia siitä, että pesuvaiheessa vältettäisiin happoja, jottei lähtömateriaalista irtoaisi happoihin liukenevia proteiineja. Tällaisia ovat

esimerkiksi juuri ei-kollageeniset proteiinit, jotka sisältävät asparagiinihappoa ja siten niiden liukeneminen saattaisi vaikuttaa rasemisaatioasteen määritykseen. (32). Lähes kaikissa julkaisuissa puhdistus- tai pesuvaiheen jälkeen hampaat kuivataan varovasti.

5.4 Pulverisaatio

Kalkkeutuneita kudoksia valmistellessa ne usein pulverisoidaan eli jauhetaan hienoksi jauhoksi. Pulverisaatiolla voidaan lisätä eristetyn, liukoista kollageeniä sisältävän, orgaanisen materiaalin määrää. Proteiineja voidaan poistaa kelatoivilla aineilla kuten etyleenidiamiinitetraetikkahapolla eli EDTA:lla. (24).

Pulverisaatiota ennen näytteestä poistetaan kiille timanttikoralla vesijähdytteisesti, mikäli määrittäminen halutaan tehdä dentiinin asparagiinihaposta. Myös muunlaisia timanttikoraa ja sahoja käytetään tutkimuksesta riippuen. Eroja on myös itse pulverisaatiossa: se voidaan tehdä joko koneellisesti tai manuaalisesti. (31,37).

5.5 Demineralisointi

Demineralisointia tarvitaan, jotta dentiinin proteiineista saadaan eristettyä haluttu osa. Tavallisimmin demineralisointi suoritetaan suolahapolla tai EDTA:lla. Suolahappoa suositellaan käytettäväksi, koska sen käyttö on nopeampaa. Lisäksi suolahappoa käytettäessä ei tarvita samanaikaista proteaasi-inhibiittorien käyttöä. Demineralisaatiota varten käytetään esimerkiksi 0,6 molaarista suolahappoliuosta samalla jatkuvasti sekoittaen 4 °C:een lämpötilassa. Matalan lämpötilan käyttäminen on suotavaa, sillä korkeat lämpötilat aiheuttavat peptidisidosten hydrolyysiä ja toisaalta voivat vaikuttaa rasemisaatioasteeseen. (24).

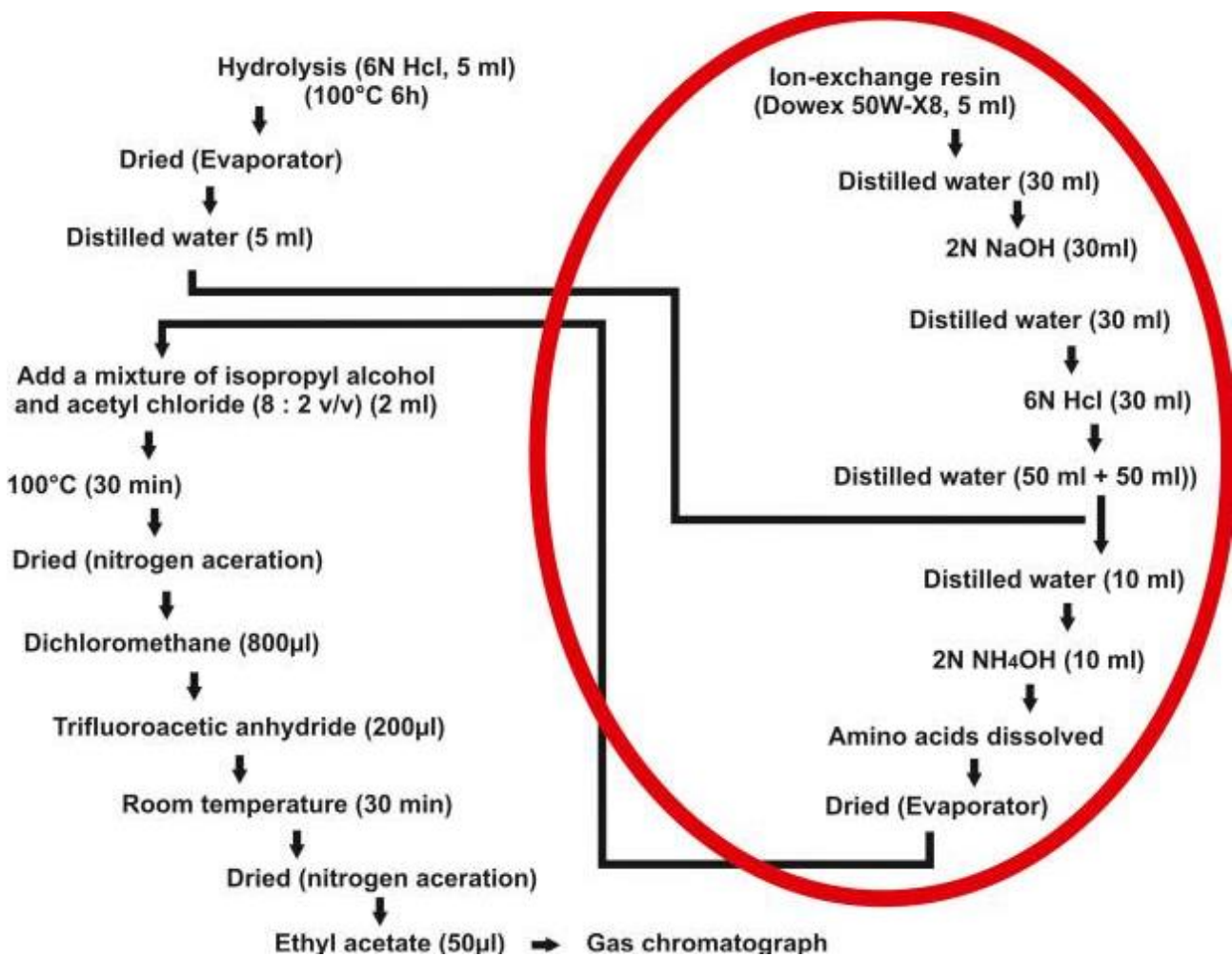
5.6 Hydrolyysi

Hydrolyysissä proteiinien välisiä peptidisidoksia halutaan katkaista yksittäisten aminohappojen erottelemiseksi. Julkaisusta riippuen lämpötilat vaihtelevat 100–110 °C:een välillä. Hydrolyysin kesto on tyypillisimmin kuusi tuntia, mutta siitäkin on variaatioita 20 tuntiin asti. Pitkäkestoiset hydrolyysit nostavat rasemisaatioastetta, sillä korkea lämpötila pitkällä altistusajalla kiihdyttää spontaania rasemisaatioreaktiota. On todettu, että lyhytkestoinen altistus korkeammassa lämpötiloissa aiheuttaa vähemmän rasemisaatiota kuin pitkäkestoiset lämpötila-altistukset. (24).

5.7 Kaasukromatografia (GC) verrattuna korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan (HPLC)

Enantiomeerien erotteluun ja määrän selvittämiseen käytetään useimmiten joko kaasukromatografiaa tai korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa. Kummallakin pyritään erottelemaan asparagiinihappojohdannaiset toisistaan mahdollisimman tarkasti. (38). Näistä kahdesta kaasukromatografia lienee suositumpi erotusmenetelmä, vaikka HPLC:n suosio onkin ollut nousussa.

Hydrolyysiä seuraa Ohtanin työryhmineen kehittämän menetelmän mukaisesti useita työvaiheita kuvan 7 osoittamalla tavalla ennen kaasukromatografiaa. Työvaiheet sisältävät muun muassa näytteen kuivaamista useassa eri kohdassa, aminohapon eristystä ioninvaihtokromatografian avulla ja aminohapon reaktiivisuuden vähentämistä, jotta kaasukromatografia onnistuisi paremmin. (31). Lisäksi tyypillisesti ennen kaasukromatografiaa aminohapot johdetaan N-trifluoroasetaattihapon isopropyylistereiksi. Aminohappojen erottelu ja määrällinen laskeminen tapahtuu kaasukromatografialaitteessa. (24).



Kuva 7. Ohtanin ja kumppanien kehittämän menetelmän työvaiheita hydrolyysistä alkaen (8). Punaisella on merkitty ympyrä kuvaa työvaiheita, jotka Wochna ja kumppanit ohittivat käyttäessään massaspektrometriä kaasukromatografian yhteydessä (31).

D/L-enatiomeerien suhteen määrittäminen on mahdollista myös korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Sitä varten eroteltavat aminohapot muokataan usein o-ftalaldehydi-N-asetyyli-L-kysteini-johdoksiksi (OPA-NAC). Molemmat menetelmät aminohappojen määrittämiseksi ovat tarkkoja sekä luotettavia. HPLC:n etuna on kuitenkin se, että analyysi on kestoaltaan lyhyempi. Lisäksi HLPC on sensitiivisempi, jolloin lähtömateriaalia tarvitaan teoriassa vähemmän kuin GC:tä käytettäessä. Toistaiseksi GC on kuitenkin kokonaisuudessaan tarkempi menetelmä iänarviointiin. (38).

5.8 Tulosten analysointi ja verrannollisuus

Kun D- ja L-enatiomeerien suhde on selvitetty joko kaasukromatografian tai korkean erotuskyvyn nestekromatografialla, verrataan suhdetta kalibraatiokäyrän arvoihin. Kalibraatiokäyrä tehdään kontrollihampailla, jotka ovat ideaalisesti saman tyyppisiä hampaita kuin ne mitä tutkitaan. Esimerkiksi tutkittaessa kulmahammasta, kalibraatiokäyräkin tehdään useista eri-ikäisistä kulmahampaista. Kalibraatiokäyrää suositellaan tehtäväksi jokaiseen tutkimukseen, sillä poistolosuhteet ja muut erinäiset virhelähteet näytettä valmistettaessa saattavat muuten vaikuttaa menetelmän tarkkuuteen. (39).

Kirjallisuudesta käy kuitenkin ilmi myös se, että kaiken tyyppisistä hampaista tehdyllä kalibraatiokäyrällä on saatu arvioitua jopa ± 4 vuoden tarkkuudella henkilön ikää. Kuitenkin samantyyppisistä hampaista tehty kalibraatiokäyrä on luotettavin ja tarkin. (40). Toisaalta käytettäessä samantyyppisiä hampaita ei myöskään tarvita niin sanottua ikäkorjausta hampaille. Rasemisaatioaste kuvaa kunkin hampaan proteiinien ikää, joka ei ole sama kuin eliön ikä. Eri hampaat kehittyvät eri aikaan, joten ikäerot eri hampaiden välillä tulisi korjata arvioimalla keskimääräisiä kehittymisaikatauluja. (34).

Toisinaan kuitenkin useiden samantyyppisten kontrollihampaiden kerääminen voi olla vaikeaa esimerkiksi eettisistä syistä tai yksinkertaisesti sen takia, että niitä poistetaan hyvin harvoin. Siksi on myös tutkittu niin sanottujen standardihampaiden kehittämistä ja kalibraatiokäyrien tekemistä niiden pohjalta. (39). Standardihampaita on yritetty luoda esimerkiksi joko sekoittamalla kaupallista L- ja

D-asparagiinihappoa vastaamaan eri-ikäisiä hampaita (41) tai keinotekoisesti ”vanhentamalla” hampaita kuumentamalla niitä, jolloin niiden rasemisaatioaste kasvaa (39).

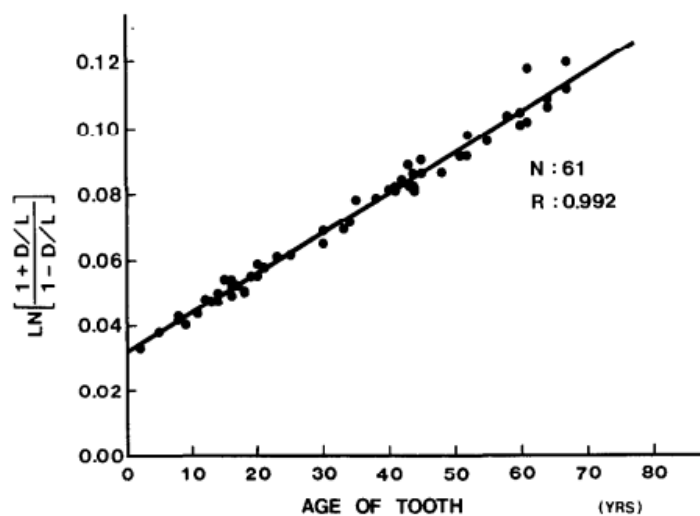
Alla on esitettyä yksi perustavanlaatuisista tavoista mallintaa saatuja tuloksia. L- ja D-asparagiinihapon välistä reaktiota voidaan kuvata alla olevan kuvan 8 yhtälön 1 mukaisesti, jossa k_L ja k_D kuvaavat rasemisaatioreaktion nopeusvakioita kumpaankin suuntaan. Yhtälön ilmentymisnopeus on kuvassa merkitty numerolla 2. Yhtälö 2 integroimalla päästään yhtälöön 3, jossa t:llä kuvataan mitä tahansa aikaa rasemisaation aikana. Logaritminen termi hetkellä $t = 0$ on seurausta hydrolyysin aikaansaamasta D-asparagiinihapon määrästä. Lineaarinen mallinnus saadaan, kun y-akselille sijoitetaan $\ln \left[\frac{(1 + D/L)}{(1 - D/L)} \right]$ ja x-akselille aika vuosina kuvan 9 mukaisesti. Kaikissa julkaisuissa ei käytetä täsmälleen samaa matemaattista mallinnusta. (40).



$$-\frac{d(L)}{dt} = k_L(L) - k_D(D) \quad (2)$$

$$\ln \left(\frac{1 + D/L}{1 - D/L} \right)_t = \ln \left(\frac{1 + D/L}{1 - D/L} \right)_{t=0} + 2k_L t \quad (3)$$

Kuva 8. Matemaattisen mallinuksen johtaminen (40).



Kuva 9. Lineaarinen mallinnus (40).

Menetelmän laadukas ja tarkka suorittaminen vaatii huolellisuutta sekä riittävää osaamista. Iän arvioiminen mahdollisimman tarkasti on tärkeää, koska sillä voi olla merkittävä vaikutus esimerkiksi vainajan tunnistamiseen tai erinäisiin oikeudellisiin tai sosiaalisiin kysymyksiin. Tämän takia useissa julkaisuissa on pyritty kokoamaan erinäisiä seikkoja ja käytäntöjä, joita tulisi noudattaa liittyen laboratoriossa tapahtuviin työvaiheisiin, dokumentointiin ja laadunvalvontaan. (32,34). Kaikkien työvaiheiden tulisi olla standardoituja ja ne olisi suoritettava tietyillä instrumenteilla laitteet oikeaoppisesti kalibroituina. Lisäksi lämpötilan kohoamista tulisi välttää niin säilytyksessä kuin työvaiheissakin rasemisaationopeuden kasvun välttämiseksi. (32).

6 MENETELMÄN SUORITTAMINEN HAMPAASTA

Iän arvioimiseen käytettävä menetelmä perustuu L-asparagiinihapon hitaaseen spontaaniin muuttumiseen kehossa luontaisesti syntetisoitumattomaksi D-asparagiinihappoksi. Tämän takia menetelmän kannalta on olennaista valita tutkittavaksi kudokseksi sellainen, jossa proteiinit ovat pysyviä ja kudoksessa ei ole ollenkaan tai juuri ollenkaan metabolista uustuotantoa. Proteiinit eivät siten itsestään muutu miksikään eivätkä ne pilkkoudu tai rakennu uudestaan. Tämä mahdollistaa D-asparagiinihapon kertymisen kudokseen ja siten sen määrä on yhteydessä proteiinin ikään. Kudoksia, jotka sisältävät pitkäikäisiä proteiineja ja joihin kertyy D-asparagiinihappoa iän myötä, ovat esimerkiksi dentiini, kiille, sementti, välilevyt, nivelrusto, rusto, iho, luu, silmän linssi, aivot, keuhkojen parenkyymi ja valtimon seinämä. (25).

Kovakudoksissa etuna on se, että ne säilyvät hyvin kuoleman jälkeen verrattuna muuhun pehmytkudosmateriaaliin. Lähtömateriaalina käytetyn kudoksen kestävyys on hyödyllinen ominaisuus ajatellen tilannetta, jossa menetelmää sovelletaan esimerkiksi huonossa kunnossa olevaan vainajaan. Tämän takia esimerkiksi hampaat ja luut ovat erinomaisia kudokset valintoja menetelmän lähtömateriaaleiksi. Näistä kahdesta hampaat säilyvät vielä luutakin paremmin. (6). Tämän lisäksi on todettu, että vaikka menetelmä olisi mahdollista suorittaa luun avulla, se ei ole niin tarkka kuin hampaasta suoritettuna. Toisinaan kuitenkin vainajan hampaisto ei ole säilynyt riittävän hyvässä kunnossa ja tällöin luuta voi käyttää kudoslähteenä menetelmän suorittamiseksi. (42). Eroa hampaan dentiinin ja luun välillä selittää luun suurempi metabolinen aktiivisuus. Dentinille rasemisaation nopeusvakio on $2,4850 * 10^{-8}$, kun taas luulle se on $4,1046 * 10^{-9}$. Näin ollen dentiinissä rasemisaationopeus on noin kuusinkertainen. Oletuksena on 15 °C:n lämpötila. (43).

Kovakudoksien lisäksi menetelmän toimivuutta on tutkittu käyttäen muun muassa silmän kovakalvosta ja kurkunpään rustosta otettuja näytteitä. Molemmista kudoksista otetuista näytteistä menetelmä on mahdollista suorittaa, mutta iänarvioinnin tarkkuus on heikompi kuin hampaasta tehtynä. (44,45).

Hammas on kudoksena otollinen menetelmän suorittamiselle, ja sen avulla on mahdollista päästä iänarviointitarkkuudessa jopa alle ± 3 vuoteen (6). Hampaan rakennemateriaaleista eniten lienee tutkittu ja sovellettu dentiiniä, mutta myös muita hampaan kudoksia on tutkittu menetelmän lähtömateriaaleina.

6.1 Dentiini verrattuna hampaan muihin rakenteisiin

Tällä hetkellä iänarvioinnin tarkkuuden, menetelmän helppouden, ajankäytön ja toistettavuuden suhteen hampaan dentiini on paras lähtökudos asparagiinihapon rasemisaatioon pohjautuvan menetelmän suorittamiseen (46). Dentiinin avulla metodi voidaan suorittaa tarkasti vainajalle, jonka kuolemasta on korkeintaan 20 vuotta. Tämä ajallinen raja on seurausta dentiinin kuolemanjälkeisistä muutoksista. (47).

Kiilteen on ajateltu olevan dentiiniä tai sementtiä kestävämpi kuolemanjälkeisille muutoksille, jotka vaikuttavat L- ja D-enantiomeerien rasemisaatioasteeseen. Ongelmana kiilteen hyödyntämisessä on se, että kiilteessä on hyvin vähän proteiinia, jolloin myös rasemisaatioasteen mittaaminen on vaikeaa. Lisäksi rasemisaatioasteen ja iän välinen korrelaatio on kiilteestä pienempi kuin dentiinissä. (47).

Myös hampaan sementtiä on tutkittu menetelmän lähtömateriaaliksi. Tutkimuksessa verrattiin eroja D/L-suhteen ja todellisen iän välillä käyttäen lähtömateriaalina saman yksilön premolaarista valmistettuja kiille-, sementti- ja dentiininäytteitä. Suurin korrelaatio oli dentiinillä ($r = 0,992$), sitten sementillä ($r = 0,988$) ja viimeisenä kiilteellä ($r = 0,961$). Menetelmä on siis mahdollista suorittaa myös hampaan sementistä. Tutkittaessa yläleuan etuhampaita ja premolaareja tarkimmin ikä saatiin arvioitua etuhampaista, kun menetelmän suorittamiseen käytettiin hampaan sementti kokonaisuudessaan. (48). Rasemisaationopeus on kuitenkin suurimmillaan sementissä, sitten dentiinissä ja viimeisenä kiilteessä. Nopeuserojen on arvioitu johtuvan ympäröivistä lämpötilaeroista. (49). Sementti ei kuitenkaan ole ideaalisin lähtömateriaali, koska sen kerääminen on vaikeaa ja kerätyn sementin määrä voi olla riittämätön menetelmän suorittamiseksi (50).

Dentiinin rasemisaatioaste on tarkemmin yhteydessä ikään kuin sementillä ja kiilteellä. Eroa on selitetty muun muassa sillä, että dentiini on suojassa kiilteen ja sementin ympäröimänä. Tämän lisäksi myös dentiinitubulukset auttavat pitämään dentiinin vesipitoisuutta vakiona. (49).

Lisäksi hampaan käyttämistä kokonaisuudessaan menetelmään on tutkittu. Tällöin näyttemateriaali sisältää dentiinin, sementin sekä kiilteen. Käytettäessä hammas kokonaisuudessaan menetelmä olisi teknisesti helpompi suorittaa. Koko hampaasta tehdyssä näytteessä D/L-suhde oli suurempi kuin pelkästä dentiinistä tehdyssä näytteessä. Kuitenkin dentiinin korrelaatio ($r = 0,98$) D/L-suhteen ja todellisen iän välillä oli suurempi kuin koko hampaan ($r = 0,93$). (51).

6.2 Erot eri hampaiden välillä

Hampaan valinnalla voi olla myös vaikutusta menetelmästä saataviin tuloksiin. Dentiinin ikä ei ole sama asia kuin henkilön todellinen ikä (24). Pysyvä dentiini muodostuu kuhunkin hampaaseen niiden puhkeamisjärjestyksessä seuraavalla tavalla ensimmäisestä viimeiseen: ensimmäisiin molaareihin, ensimmäisiin etuhampaisiin, toisiin etuhampaisiin, kulmahampaisiin, ensimmäisiin välihampaisiin, toisiin välihampaisiin ja viimeisenä toisiin molaareihin (49). Puolieroa vasemman ja oikean puolen hampailla samassa leuassa ei ole havaittu (52).

Mikäli suuontelo olisi ympäristöltään täysin homogeeninen, olisi hampaista mitattavat D/L-suhteet suurimmasta pienempään samassa järjestyksessä kuin dentiinin muodostuminenkin. Tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että iäkkäillä ryhmillä rasemisaatioaste oli suurin toisesta molaarista eikä ensimmäisestä molaarista mitattuna. Iäkkäiden ryhmään tutkimuksessa kuului 76–88-vuotiaita henkilöitä. Tulosta on selitetty sillä, että suuontelossa lämpötila nousisi syvemmälle mentäessä. Lämpötila nopeuttaa rasemisaatioreaktiota, ja näin ollen ajan kuluessa rasemisaatioaste molaareissa ohittaa etualueen hampaat, vaikka etualueen dentiini onkin muodostunut ajallisesti aikaisemmin. Ajan kuluessa ympäristöolosuhteet, erityisesti lämpötila, vaikuttanee hampaiden rasemisaatioasteeseen enemmän kuin niiden ajallinen kehittyminen toisiinsa nähden. (49).

Vaikka rasemisaatioaste määräytyneekin hampaan kehittymisen ja lämpöaltistuksen summautumana, ei sen avulla välttämättä silti voi päätellä parasta hammasta, josta menetelmä kannattaisi suorittaa parhaan tarkkuuden saamiseksi. Yleensä ottaen suurempi D/L-suhde helpottaa mittaamista sekä analysointia, ja siksi menetelmään kannattaisi valita hammas, jossa D-enatiomeeriä on ehtinyt jo kertyä. Kuitenkin esimerkiksi Wochnan työryhmineen julkaisemassa tutkimuksessa paras korrelaatio todellisen iän ja D/L-suhteen välille saatiin ensimmäisistä etuhampaista (31), vaikka niiden dentiini ei kehity ensimmäisenä muihin hampaisiin verrattuna eikä niihin vaikuta suuri lämpöaltistus sijaintinsa takia.

Yleistä linjaa tai standardihammasta menetelmän suorittamiselle ei liene olemassa. Toisaalta yksijuuristen hampaiden käyttöä suositellaan. Dentiininäyte on tällöin helppo kerätä ja yksijuuristen hampaan dentiinistä kerätyn näytteen ajatellaan edustavan luotettavasti koko dentiiniä. (53).

6.3 Dentiininäytealueen valinta

Dentiini ei ole täysin homogeenistä. Esimerkiksi hampaan kehittyessä kruunun dentiini syntyy ajallisesti ennen juuren dentiiniä. Lisäksi myöhemmin hampaaseen muodostuu sekundaarista ja vielä

mahdollisesti tertiääristakin dentiiniä, joiden iät ovat luonnollisesti matalammat kuin primaarisen dentiinin. (33).

Koska dentiini muodostuu kruunusta kohti juurta, D/L-suhteen tulisi olla korkeampi kruunussa ja laskea kohti juuren kärkeä (24). Nuorilla henkilöillä D/L-suhde onkin suurempi kruunussa kuin juuressa. Sen sijaan iäkkäimmillä D/L-suhteen havaittiin olevan suuri sekä kruunussa että lähellä juuren kärkeä. (54). Lisäksi bukkaalisessa ja labiaalisessa kruunun dentiinissä rasemisaatioaste on huomattavasti pienempi kuin kruunun dentiinin linguaalisella puolella. Tätä eroa ei ole havaittu juuren dentiinissä. Eroja kruunun ja juuren dentiin sekä kruunun bukkaalisen ja linguaalisen dentiinin välillä on pyritty selittämään rasemisaatioreaktioon vaikuttavilla tekijöillä, joista erityisesti lämpötilalla lienee suuri vaikutus. (52).

Ohtani työryhmineen ovat myös tutkineet pitkittäisen ja poikittaisen dentiininäytteen soveltuvuutta metodiin. Pitkittäisessä näytteessä dentiinistä otetaan hampaan keskeltä vertikaaliakselin suuntainen näytelevy ja poikittaisessa vertikaalitasoon nähden kohtisuora näytelevy. Tutkimuksessa D/L-suhde analysoitiin kaasukromatografisesti. Pitkittäisen näytteen rasemisaatioasteen ja todellisen iän korrelaatio oli $r = 0,995$ ja poikittaisen näytteen $r = 0,984-0,987$. Näin ollen tutkimus suosittelee pitkittäistä dentiininäytettä suuremman tarkkuuden saamiseksi. (54).

Suuri osa aikaisemmista julkaisuista on käyttänyt kruunun dentiiniä, mutta tällöinkin käytössä on ollut erilaisia näytteen preparointimenetelmiä. Tutkimuksissa on käytetty esimerkiksi joko pitkittäistä leikkausta tai ei leikkausta laisinkaan. Toisaalta osa julkaisuista pohjautuu juuren dentiiniin, jonka ajatellaan olevan kruunun dentiiniä vähemmän altis sairauksille tai elimistön korjausprosesseille. Hampaan valinnan lisäksi yhtenäistä universaalia linjausta näytedentiinin alueen valintaan ei liene olemassa. (33). Toisaalta keräämällä yhden millimetrin paksuisesta pituussuuntaisesta dentiininäyttestä 5–10 mg dentiiniä, on tulosten todettu olevan luotettavia. (53).

6.4 Menetelmän soveltuvuus epänormaaleille hampaille

Lähtökohtaisesti asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon perustuvan iänmääritysmenetelmän lähtömateriaalina kannattaa käyttää vain tervettä, eli intaktia hammaskudosta. Terveen hammaskudoksen käyttäminen lisää menetelmän laadullista luotettavuutta. Aina kuitenkin esimerkiksi vainajan ikää määritettäessä ei ole saatavilla täysin tervettä hammasta menetelmän suorittamiseksi. (55).

6.4.1 Karioituneet hampaat

Kariesvaurion seurauksena hampaan kudokset vaurioituvat. Vaurio rikkoo edetessään myös dentiinin proteiinirakenteita vaikuttaen menetelmässä mitattavaan D/L-asparagiinihappojen suhteeseen ja sitä kautta ikäarvioon. Kariesvaurio tekee kyseisen hampaan dentiinin asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon perustuvasta iänmääritysmenetelmästä erittäin epäluotettavan. Vaikka kariesvaurioituneesta hampaasta valittaisiin alue, jossa silmämääräisesti ei ole kariesta, voi menetelmä silti tuottaa huomattavan väärän tuloksen. Toisaalta välillä analysoitaessa pelkästään dentiinikariesaluetta saadaan tarkkoja tuloksia. (55).

Karieksen aiheuttaman epävarmuuden takia menetelmää ei suositella suoritettavan karioituneesta hampaasta. Mikäli muita vaihtoehtoja kuin karioituneita hampaita ei ole, kannattaa analysoida vähintään kahta eri hammasta. Tulosten ollessa lähellä toisiaan, voidaan niitä pitää jossain määrin luotettavina. (55).

6.4.2 Maitohampaat

Menetelmän lähtöaineena on tutkittu pysyvien hampaiden lisäksi myös maitohampaiden dentiiniä. Ohtani työryhmineen tutkivat 40 poistettua maitohammasta, jotka olivat peräisin 1–15-vuotiailta lapsilta. Tutkimuksessa maitohampaiden rasemisaatioasteen ja todellisen iän välinen korrelaatio oli hampaasta riippuen 0,824–0,981. Tulosten tarkkuuteen vaikutti mahdollisesti maitohampaiden juurten resorboituminen. Kuitenkin julkaisun mukaan asparagiinihapon rasemisaatioon perustuvaa iänarviointimenetelmää voidaan soveltaa myös maitohampaille. Menetelmän avulla ikä voidaan arvioida tarkemmin kuin puhkeamisaikatauluilla. (56).

6.4.3 Ylilukuiset tai puhkeamattomat hampaat

Oginon työryhmineen tutkivat eräiden ylilukuisten ja puhkeamattomien hampaiden soveltuvuutta menetelmän lähtöaineeksi. Tutkimuksessa osoittautui, että joidenkin puhkeamattomien pysyvien hampaiden dentiinistä voidaan arvioida henkilön ikää jopa ± 4 vuoden tarkkuudella. Tällaisilla puhkeamattomilla hampailla tulee olla normaalin kokoinen ja muotoinen kruunu. Esimerkiksi impaktoituneet viisaudenhampaat, kulmahampaat tai etuhampaat sopivat menetelmän suorittamiseen. Sen sijaan ylilukuisista hampaista erittäin pienikruunuiset tai epämuodostuneet kruunut aiheuttavat

suurta vääristymää iän arvioinnissa. Tällaisia hampaita ovat usein esimerkiksi mesiodens tai paramolaarit. Erityisesti ylilukuisten epämuodostuneiden hampaiden kohdalla on syytä valita jokin muu iänarviointimenetelmä. (57).

6.4.4 Pinkit hampaat

Pinkillä hampaalla tarkoitetaan ilmiötä, jossa hampaan dentiini värjäytyy pinkiksi kuoleman jälkeen. Ilmiötä selittää kohonnut kallonsisäinen verenpaine, mikä johtaa verenvuotoon pulpassa. Muuten hampaan rakenne säilyy ehjänä. Verenvuodon lisäksi hemoglobiinia ja sen hajoamistuotteita päätyy dentiinitubuluksiin. Pinkkejä hampaita tavataan toisinaan hukkuneilla, kuristetuilla tai tukehtuneilla. (58).

Ikää arvioitaessa asparagiinihapon rasemisaatioreaktion avulla ongelmana pinkeissä hampaissa on hampaan rakenteiden kontaminaatio. Esimerkiksi veren komponenttien mukanaan tuoma asparagiinihappo vääristää hampaasta laskettavaa D/L-suhdetta ja siten iänarviointia. Ratkaisuksi on ehdotettu ylimääräistä pesua suolahapossa näytettä valmistettaessa, joka poistaisi muun muassa veren komponentteja. (59). Ylimääräistä suolahappopesua ei kuitenkaan pidetä riittävänä ratkaisuna pinkkien hampaiden kontaminaatioon (60,61). Pelkän dentiinin analysoimisen sijaan on tutkittu myös pinkin hampaan käyttämistä kokonaisuudessaan lähtömateriaalina, jolloin päästiin ± 3 vuoden tarkkuuteen iänarvioinnissa (61).

6.4.5 Palaneet hampaat

Lämpötilan kiihdyttävä vaikutus asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon tunnetaan. Ohtanin työryhmineen julkaisemassa tutkimuksessa selvitettiin palaneen vainajan iänarvioimisen mahdollisuutta hampaiden avulla hyödyntäen asparagiinihapon rasemisaatioreaktiota. Tilanteessa, jossa etuhammas oli selvästi palanut värjäytyen mustaksi, menetelmän avulla arvioitu ikä oli huomattavasti henkilön todellista ikää suurempi. Kuitenkin saman vainajan taka-alueen hammas, joka ei ollut palanut, tuotti tarkan ikäarvion ± 3 vuoden tarkkuudella. Toisessa tapauksessa palaneen vainajan hampaat eivät olleet altistuneet juurikaan palamiselle, jolloin niistä kaikista sai arvioitua iän tarkasti. Palaneiden vainajien iän arvioiminen lienee mahdollista, jos arvio suoritetaan hampaasta, joka ei ole palanut. (62).

7 MENETELMÄN KÄYTTÖ MAAILMALLA JA ETNISYYDEN VAIKUTUS

Asparagiinihapon rasemisaation perustuva iänarviointimenetelmä pohjautuu vahvasti dentiinin biokemialliseen koostumukseen. Tämän takia kirjallisuudessa on pohdittu menetelmän sovellettavuutta geneettisesti tai etnisesti erityyppisille populaatioille. Julkaisuissa on pohdittu muun muassa mahdollisia eroja dentiinin proteiinikoostumuksessa. Esimerkiksi tutkimuksessa, jossa verrattiin turkkilaisia ja saksalaisia yksilöitä, rasemisaation ja iän välinen yhteys oli sama kummassakin ryhmässä. Tutkimuksen ja kirjallisuuden perusteella tutkijat päättelivät, ettei geneettisille tai kulttuurisille eroille dentiinin proteiinikoostumuksessa ole perusteita. Rasemisaatioreaktioon pohjautuvan iänarviointimenetelmän tulisi siten toimia erityyppisissä populaatioissa. (31).

Toisalta erilaisilla populaatioilla on erilaiset elintavat ja tottumukset, joiden vaikutusta asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon on tutkittu. Chaoshanin populaatiolla Etelä-Kiinassa on tapana juoda usein eräänlaista kuumaa teetä. Lämpötilan rasemisaatioreaktiota kiihdyttävä vaikutus tunnetaan, joten sen mahdollista vaikutusta iänarviointiin haluttiin tutkia. Samalla selvitettiin myös menetelmän soveltuvuutta eristyksessä elävään populaatioon. Tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu kuuman teen juonnin vaikuttavan rasemisaatioasteeseen. Tätä selitettiin muun muassa dentiinin sijainnilla hampaan sisällä sekä tutkimuksessa käytettyjen viisaudenhampaiden sijainnilla suun perällä, jonne päästyään nesteen tuomat lämpötilaerot tasoittunevat. (63).

Lähi-idässä tehdyn tutkimuksen mukaan menetelmää voidaan soveltaa kuwaitilaisille populaatioille. Tutkittujen 39 hampaan joukosta todellinen ikä saatiin arvioitua oikein ± 4 vuoden tarkkuudella. (64).

Verrattaessa rasemisaationopeuksia ruotsalaisten ja japanilaisten hampaiden välillä eroa niiden välillä ei juurikaan havaittu, mikä kertoo hammaskudosten samanlaisesta koostumuksesta. Toisaalta tutkimuksessa myös korostettiin tutkittavan hampaan merkitystä. Hampaan valinnalla on menetelmän suorittamisen kannalta enemmän merkitystä kuin etnisillä eroilla. (53).

Menetelmä todettiin myös käyttökelpoiseksi eräässä Etelä-Intian populaatioon kohdistuneessa tutkimuksessa. Todellinen ikä arvioitiin rasemisaatioreaktion avulla keskimäärin oikein ± 3 vuoden tarkkuudella. Tulokset olivat osittain yhtenevät muun kirjallisuuden kanssa, mutta myös eroja D/L-suhteessa löytyi. Tutkijat arvioivat eron johtuvan ensisijaisesti menetelmän suorittamisesta. He eivät kuitenkaan poissulkeneet etnisyyden mahdollista vaikutusta, koska kirjallisuudessa samanlaisia tuloksia oli muualta Aasiasta. Eurooppaan ja USA:han verrattuna tulokset erosivat hieman. (7).

Puolalaisessa tutkimuksessa todettiin menetelmän olevan sovellettavissa puolalaiseen populaatioon. Heidän tutkimuksessaan neljän erityyppisen hampaan avulla saavutettiin keskimäärin alle 5 vuoden tarkkuus rasemisaatioasteen avulla ikää arvioitaessa. Julkaisussa ei poissuljeta etnisyyden mahdollista vaikutusta. Kuitenkin tärkeimmiksi tuloksiin vaikuttaviksi seikoiksi nimetään näytteen valinta, näytteen valmistus sekä menetelmän suorittaminen standardoidusti. (31).

8 POHDINTAA

8.1 Hakujen onnistuminen ja laajuus

Tätä kirjallisuuskatsausta varten julkaisuja kerättiin pääasiassa PubMed-tietokannasta. Lisäksi hakuja tehtiin Embasen, Cochrane Libraryn, Web of Sciencen ja Scopusen tietokannoista. Muutamia yksittäisiä tietoja etsittiin myös Google Scholar:in avulla. Alla on esitetty yksilöidysti muokatut kunkin tietokannan keskeisimmät hakulausekkeet.

PubMed, 77 hakutulosta:

("age estimation*" OR "age determination*" OR "age evaluation*" OR "chronological age*" OR "dental age estimation*" OR "Age Determination by Teeth"[Mesh]) AND ("aspartic acid*" OR "Aspartic Acid"[Mesh] OR "amino acid*") AND ("dentin*" OR "Dentin"[Mesh] OR "human dentin*") AND ("racemization*" OR "racemization reaction*" OR "amino acid racemization*" OR "racemization method*" OR "racemization rate*" OR "D/L ratio*" OR "aspartic acid ratio*")

Embase, 80 hakutulosta:

("age estimation*" OR "age determination*" OR "age evaluation*" OR "chronological age*" OR "dental age estimation*") AND ("aspartic acid*" OR "amino acid*") AND ("dentin*" OR "human dentin*") AND ("racemization*" OR "racemization reaction*" OR "amino acid racemization*" OR "racemization method*" OR "racemization rate*" OR "D/L ratio*" OR "aspartic acid ratio*")

Cochrane Library, 0 hakutulosta:

(age NEXT estimation* OR age NEXT determination* OR age NEXT evaluation* OR chronological NEXT age* OR dental NEXT age NEXT estimation) AND (aspartic NEXT acid* OR amino NEXT acid*) AND (dentin* OR human NEXT dentin*) AND (racemization* OR racemization NEXT reaction* OR amino NEXT acid NEXT racemization* OR racemization NEXT method* OR racemization NEXT rate* OR aspartic NEXT acid NEXT ratio*)

Scopus, 86 hakutulosta:

("age estimation*" OR "age determination*" OR "age evaluation*" OR "chronological age*" OR "dental age estimation*") AND ("aspartic acid*" OR "amino acid*") AND ("dentin*" OR "human dentin*") AND ("racemization*" OR "racemization reaction*" OR "amino acid racemization*" OR "racemization method*" OR "racemization rate*" OR "D/L ratio*" OR "aspartic acid ratio*")

Web of Science, 106 hakutulosta:

("age estimation*" OR "age determination*" OR "age evaluation*" OR "chronological age*" OR "dental age estimation*") AND ("aspartic acid*" OR "amino acid*") AND ("dentin*" OR "human dentin*") AND ("racemization*" OR "racemization reaction*" OR "amino acid racemization*" OR "racemization method*" OR "racemization rate*" OR "D/L ratio*" OR "aspartic acid ratio*")

Hakujen jälkeen julkaisut selattiin läpi. Artikkelit, joissa ei käsitelty rasemisaatioreaktiota iän arvioimisessa, karsittiin pois. Hakutuloksien artikkeleista suuri osa oli sellaisia, jotka löytyivät useammasta eri tietokannasta. Cochrane Library -tietokanta on sen verran pieni, ettei aiheesta löytynyt yhtäkään julkaisua.

Vaikka asparagiinihapon rasemisaatioreaktion hyödyntäminen iän arvioimisessa on suhteellisen tuntematon ja vähän käytetty menetelmä, löytyi siitä silti yllättävän paljon julkaisuja. Tietokantojen lisäksi myös kahta oikeuslääketieteen kirjaa käytettiin lähteinä tuomaan perustavanlaatuisia ymmärrystä oikeuslääketieteestä, jonka päälle oli mahdollista rakentaa tarkempaa käsitystä juuri tämän kirjallisuuskatsauksen aiheesta. Lähteiden hallinta, viittausten tekeminen ja lähdeluettelo toteutettiin Zotero-ohjelmalla.

8.2 Menetelmän hyvät ja huonot puolet

Hampaan dentiinin asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon perustuvalla iänarviointimenetelmällä päästään usein jopa ± 3 vuoden tarkkuuteen (6–8). Menetelmä on siis erittäin tarkka. Lapsilla kehittyvän hampaiston ja luuston avulla ikää on mahdollista arvioida tarkasti myös radiologisin menetelmin. Sen sijaan aikuisilla muut hampaiston ja luuston arviointiin perustuvat menetelmät ovat huomattavasti epätarkempia kuin asparagiinihapon rasemisaation perustuva menetelmä. Esimerkiksi Gustafsonin menetelmässä ja luun histologiaa arvioivissa menetelmissä iänarviointitarkkuus on laaja

±5–12 vuotta. (5). Asparagiinihapon rasemisaation perustuvaa menetelmää pidetään tarkimpana myös biokemiallisten iänarvointimenetelmien kategoriassa (6). Monet muut iänarvointimenetelmät perustuvat degeneratiivisten muutosten arviointiin, mihin vaikuttaa merkittävästi henkilön elintavat, terveys ja ravitsemus (47). Lisäksi niissä iän arvioiminen on subjektiivisempaa (6).

Eräs menetelmän huonoista puolista on, että sen suorittaminen vaatii runsaasti erilaisia kalliita laboratoriovälineitä, joita ei välttämättä aina ole saatavilla. Menetelmän hintavuus voi estää sen käytön tietyissä tilanteissa. (65). Vaikka menetelmän toimintaperiaate on periaatteessa yksinkertainen, on näytteiden käsittely aikaa vievää, monimutkaista ja hankalaa (12).

Rasemisaatioreaktion ollessa spontaani entsyymitoiminnasta riippumaton reaktio ympäröivät olosuhteet vaikuttavat sen nopeuteen. Kuollessa ihmisen keho viilenee, mikä pysäyttää rasemisaatioreaktion etenemisen ja siten L-asparagiinihapon muuttumisen D-asparagiinihapoksi. L- ja D-enatiomeerien suhteen avulla voidaan arvioida proteiinin ja sitä kautta eliön ikää. (8). Lämpötilan lisäksi kosteus ja emäksinen pH kiihdyttävät rasemisaatioreaktiota (30). Verrattaessa aminohappoja toisiinsa asparagiinihapon rasemisaationopeus on yksi nopeimmista, mikä tekee siitä toimivan lähtöaineen (23).

Koska rasemisaatioreaktioon vaikuttaa merkittävästi ympäröivät olosuhteet, on niillä merkitystä myös vainajan ikää arvioitaessa. Näin ollen menetelmän tarkkuuden takia olisi parasta, jos iänarviointi suoritettaisiin mahdollisimman pian henkilön kuoleman jälkeen. Tällöin mahdollista kuoleman jälkeistä rasemisaatiota tapahtuisi mahdollisimman vähän. Kylmässä ympäristössä vainajan rasemisaatioaste säilyy hyvin kuolemaa edeltäneellä tasolla. Lämpötilan vaihtelut ja altistus vedelle muun muassa maan kosteuden ja sateen muodossa saattavat vaikuttaa rasemisaatioasteeseen erityisesti pidemmällä aikavälillä. (66). Ennen rasemisaatioon pohjautuvan menetelmän hyödyntämistä olisikin tärkeää tietää, millaisille olosuhteille vainaja on altistunut (47).

Kuolleiden lisäksi menetelmä on sovellettavissa myös eläville ihmisille. Se voidaan suorittaa esimerkiksi poistetuista hampaista. Etelä-Kiinassa tehdyssä tutkimuksessa eläviltä ihmisiltä poistetuista viisaudenhampaista saatiin arvioitua henkilöiden iät tarkasti. (63). Hampaan poistamisen lisäksi menetelmää on tutkittu myös hampaasta otetusta biopsiasta (50,67). Eräässä intialaisessa tutkimuksessa koehenkilöiltä otettiin hampaan labiaalipinnalta näyte biopsiaa varten suunnitellulla instrumentilla. Ikä saatiin arvioitua biopsianäytteistä ±4 vuoden tarkkuudella. (50).

Vaikka asparagiinihapon rasemisaatioon perustuva menetelmä on tarkka, julkaisujen välillä on hieman eroja saaduissa rasemisaatioasteissa. Yksi selittävä tekijä on se, että menetelmän suorittamiseen ei ole yksinkertaisia yleisiä käytäntöjä, vaan kukin laboratorio toimii omien tapojensa

mukaisesti. Yleensä julkaisuissa noudatetaan menetelmän suorittamisen perustavanlaatuisia kaavia, mutta variaatioitakin löytyy. Menetelmän yleistyminen ja laajempi käyttäminen oikeuslääketieteessä vaatisikin yleistä kansainvälistä standardoimista, koska erot käytännöissä johtavat verrattavuuden, toistettavuuden ja luotettavuuden heikkenemiseen. Haasteita ja variaatiota on muun muassa kalibraatiokäyrän tekemisessä sekä siihen tarvittavien hampaiden saamisessa, lähtömateriaalien valinnoissa, näytteiden leikkauksissa, näytteiden käsittelyssä ja enantiomeerien erottelussa. (34).

Kalibraatiokäyrää suositellaan tehtäväksi jokaiseen tutkimukseen, sillä poisto-olosuhteet ja muut erinäiset virhelähteet näytettä valmistettaessa saattavat muuten vaikuttaa menetelmän tarkkuuteen. (39). Ideaalisesti käyrä tehdään vähintään neljästä samantyyppisestä hampaasta kuin mitä tutkitaan. Toisinaan kontrollihampaiden saaminen on vaikeaa, mikä osaltaan on rajoittanut menetelmän laajempaa käyttöä. (8,51). Vaikka tietyissä tilanteissa on mahdollista käyttää esimerkiksi palaneita, ylilukuisia tai muuten poikkeavia hampaita, lienee turvallisinta hyödyntää lähinnä normaaleja terveitä hampaita.

Hampaan kudospolymeereistä dentini lienee yleisin menetelmässä käytettävä lähtöaine, mutta eroja on esimerkiksi siinä käytetäänkö juuren vai kruunun dentiniä (31). Tosin osa tutkimuksista suosittelee juuren dentiniin käyttämistä, koska se on paremmin suojassa kuin kruunun dentini. Kruunussa syntyy muun muassa sekundaarista dentiniä, karioitumisen riski on suurempi ja hammaslääketieteelliset hoidot ovat useimmin kruunun alueella. (34). Rajoittavana tekijänä dentiniinissä on myös se, että menetelmä on suoritettavissa siitä tarkasti vain noin 20 vuotta kuoleman jälkeen, mikä on seurausta dentiniinissä tapahtuvista kuolemanjälkeisistä muutoksista (47). Lisäksi dentiniin erottelu muista hampaan komponenteista on vaikeaa samoin kuin aminohappojen täydellinen erottelu toisistaan (8). Dentiniin haitoista huolimatta se on tällä hetkellä paras lähtöaine tarkkuutensa, yksinkertaisuutensa, toistettavuutensa ja ajankäyttönsä suhteen (46).

Kirjallisuudesta löytyvien julkaisujen perusteella vaikuttaisi siltä, että etnisyydellä ja geneettisillä eroilla ei liene olevan ainakaan kovin merkittävää roolia hampaan dentiniin rasemisaatioreaktion nopeuteen vaikuttavina tekijöinä. Julkaisuissa korostuu enemmän muut menetelmään vaikuttavat tekijät kuten hampaan ja dentiniin alueen valinta. Toisaalta näytteen valmisteluun liittyviin tekijöihin kiinnitetään huomiota ja menetelmän standardoimista toivotaan.

Hampaan dentiniin asparagiinihapon rasemisaatioreaktioon perustuva biokemiallinen iänarviointimenetelmä on erittäin tarkka ja luotettava. Sen ajatellaan olevan objektiivisempi kuin monet muun iänmäärittämisessä käytettävät menetelmät. Sen avulla voidaan arvioida korkeintaan 20 vuotta kuolleen olleen vainajan ikää kuolinhetkellä. Toisaalta menetelmää voidaan soveltaa myös

eläville ihmisille poistettujen hampaiden tai biopsianäytteiden avulla. Menetelmän yleistymistä eniten rajoittanee puutteellinen kansainvälinen standardoiminen ja puuttuvat yhteiset vakioidut toimintamallit hampaan ja denttiin näytealueen valintaan sekä näytteiden käsittelyyn ja tulosten arviointiin. Lisää tutkimustietoa sekä jo olemassa olevan tiedon yhteen vetämistä tarvitaan, jotta menetelmän käyttö iänarvioimisessa voisi yleistyä.

LÄHTEET

1. Stavrianos C, Mastagas D, Stavrianou I, Karaiskou O. Dental Age Estimation of Adults: A Review of Methods and Principals. *Research Journal of Medical Sciences*. 2008;2(5):258–68.
2. Verma M, Verma N, Sharma R, Sharma A. Dental age estimation methods in adult dentitions: An overview. *J Forensic Dent Sci*. elokuuta 2019;11(2):57–63.
3. Penttilä A, Hirvonen J, Saukko P, Karhunen PJ. *Oikeuslääketiede*. 1. painos. Helsinki: Duodecim; 2000. 444 s.
4. Laki kuolemansyyn selvittämisestä 459/1973 [Internet]. [viitattu 20. joulukuuta 2022]. Saatavissa: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1973/19730459>
5. Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch HJ, ym. Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *Int J Leg Med*. 1. toukokuuta 2000;113(3):129–36.
6. Pillalamarri M, Manyam R, Pasupuleti S, Birajdar S, Akula ST. Biochemical analyses for dental age estimation: a review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 11. tammikuuta 2022;12(1):2.
7. Rajkumari S, Nirmal M, Sunil PM, Smith AA. Estimation of age using aspartic acid racemisation in human dentin in Indian population. *Forensic Sci Int*. 10. toukokuuta 2013;228(1–3):38–41.
8. Ohtani S, Yamamoto T. Age estimation by amino acid racemization in human teeth. *J Forensic Sci*. marraskuuta 2010;55(6):1630–3.
9. Yleistä oikeushammaslääketieteestä [Internet]. *Hammaslääkäriliitto*. [viitattu 9. tammikuuta 2022]. Saatavissa: <https://www.hammaslaakariliitto.fi/fi/yleista-oikeushammaslaaketieteesta>
10. Saukko P, Knight B. *Knight's forensic pathology*. Fourth edition. Boca Raton : CRC Press, 2016 ©2016; 2016. 666 s.
11. Shamim T. Oral Pathology in Forensic Investigation. *J Int Soc Prev Community Dent*. helmikuuta 2018;8(1):1–5.
12. Ranta H. Mitä hampaat voivat kertoa? *Duodecim*. 1999;115(14):1542–4.
13. Ulkomaalaislaki 301/2004 [Internet]. [viitattu 18. joulukuuta 2022]. Saatavissa: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2004/20040301#L1P6>
14. Gustafson G. Age determination on teeth. *J Am Dent Assoc*. heinäkuuta 1950;41(1):45–54.
15. Janardhanan M, Umadethan B, Biniraj K, Kumar RV, Rakesh S. Neonatal line as a linear evidence of live birth: Estimation of postnatal survival of a new born from primary tooth germs. *J Forensic Dent Sci*. tammikuuta 2011;3(1):8–13.
16. Kasetty S, Rammanohar M, Raju Ragavendra T. Dental Cementum in Age Estimation: A Polarized Light and Stereomicroscopic Study. *Journal of Forensic Sciences*. 2010;55(3):779–83.
17. Kvaal SI, Kolltveit KM, Thomsen IO, Solheim T. Age estimation of adults from dental radiographs. *Forensic Sci Int*. 28. heinäkuuta 1995;74(3):175–85.

18. Limdiwala PG, Shah JS. Age estimation by using dental radiographs. *J Forensic Dent Sci.* 2013;5(2):118–22.
19. Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A New System of Dental Age Assessment. *Human Biology.* 1973;45(2):211–27.
20. Quaremba G, Buccelli C, Graziano V, Laino A, Laino L, Paternoster M, ym. Some inconsistencies in Demirjian’s method. *Forensic Sci Int.* helmikuuta 2018;283:190–9.
21. Zhao L, Sun J, Zhang C, Chen C, Chen Y, Zheng B, ym. Effect of aspartic acid on the crystallization kinetics of ACP and dentin remineralization. *J Mech Behav Biomed Mater.* maaliskuuta 2021;115:104226.
22. PubChem. Aspartic acid [Internet]. [viitattu 29. kesäkuuta 2022]. Saatavissa: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5960>
23. Helfman PM, Bada JL. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* elokuuta 1975;72(8):2891–4.
24. Kiran Kumar K. Dental age estimation using amino acid racemization. *Indian J Dent Res.* kesäkuuta 2008;19(2):172–4.
25. Ritz-Timme S, Collins MJ. Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Res Rev.* helmikuuta 2002;1(1):43–59.
26. Yamamoto K. Molecular biological studies on teeth, and inquests. *Forensic Science International.* 28. kesäkuuta 1996;80(1):79–87.
27. Ohtani S, Yamamoto K. Age estimation by amino acid racemization in teeth--a comparison of aspartic acid with glutamic acid and alanine as indicators. *Nihon Hoigaku Zasshi.* huhtikuuta 1991;45(2):119–23.
28. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 1. tammikuuta 2011;3:711–35.
29. Miller GH, Clarke SJ. AMINO-ACID DATING. Teoksessa: Elias SA, toimittaja. *Encyclopedia of Quaternary Science* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2007 [viitattu 3. kesäkuuta 2022]. s. 41–52. Saatavissa: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0444527478000594>
30. Ohtani S. Estimation of age from dentin by utilizing the racemization of aspartic acid: influence of pH. *Forensic Science International.* 30. lokakuuta 1995;75(2):181–7.
31. Wochna K, Bonikowski R, Śmigielski J, Berent J. Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a Polish population sample. *Forensic Sci Med Pathol.* syyskuuta 2018;14(3):285–94.
32. Ritz-Timme S, Rochholz G, Schütz HW, Collins MJ, Waite ER, Cattaneo C, ym. Quality assurance in age estimation based on aspartic acid racemisation. *Int J Legal Med.* 2000;114(1–2):83–6.
33. Yekkala R, Meers C, Van Schepdael A, Hoogmartens J, Lambrichts I, Willems G. Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age. *Forensic Sci Int.* 15. toukokuuta 2006;159 Suppl 1:S89–94.

34. Waite ER, Collins MJ, Ritz-Timme S, Schutz HW, Cattaneo C, Borrman HIM. A review of the methodological aspects of aspartic acid racemization analysis for use in forensic science. *Forensic Science International*. 26. heinäkuuta 1999;103(2):113–24.
35. Yamamoto T, Ohtani S. Estimation of chronological age from the racemization rate of L- and D-aspartic acid: how to completely separate enantiomers from dentin. *Methods Mol Biol*. 2012;794:265–72.
36. Ohtani S, Ohhira H, Watanabe A, Ogasawara A, Sugimoto H. Estimation of age from teeth by amino acid racemization: influence of fixative. *J Forensic Sci*. tammikuuta 1997;42(1):137–9.
37. Sajdok J, Pilin A, Pudil F, Zídková J, Kás J. A new method of age estimation based on the changes in human non-collagenous proteins from dentin. *Forensic Sci Int*. 27. tammikuuta 2006;156(2–3):245–9.
38. Benešová T, Honzátko A, Pilin A, Votruba J, Flieger M. A modified HPLC method for the determination of aspartic acid racemization in collagen from human dentin and its comparison with GC. *Journal of Separation Science*. 2004;27(4):330–4.
39. Minegishi S, Ohtani S, Noritake K, Funakoshi T, Ishii N, Utsuno H, ym. Preparation of dentin standard samples for age estimation based on increased aspartic acid racemization rate by heating. *Legal Medicine*. 1. toukokuuta 2019;38:25–31.
40. Ogino T, Ogino H, Nagy B. Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age at death. *Forensic Sci Int*. joulukuuta 1985;29(3–4):259–67.
41. Ohtani S, Abe I, Yamamoto T. An application of D- and L-aspartic acid mixtures as standard specimens for the chronological age estimation. *J Forensic Sci*. marraskuuta 2005;50(6):1298–302.
42. Monum T, Jaikang C, Sinthubua A, Prasitwattanaseree S, Mahakkanukrauh P. Age estimation using aspartic amino acid racemization from a femur. *Australian Journal of Forensic Sciences*. 4. heinäkuuta 2019;51(4):417–25.
43. Ohtani S. Rate of Aspartic Acid Racemization in Bone. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. syyskuuta 1998;19(3):284–7.
44. Klumb K, Matzenauer C, Reckert A, Lehmann K, Ritz-Timme S. Age estimation based on aspartic acid racemization in human sclera. *Int J Legal Med*. 1. tammikuuta 2016;130(1):207–11.
45. Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S. Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in elastic cartilage of the epiglottis. *Int J Legal Med*. 1. marraskuuta 2014;128(6):995–1000.
46. Ohtani S, Yamamoto T. Strategy for the estimation of chronological age using the aspartic acid racemization method with special reference to coefficient of correlation between D/L ratios and ages. *J Forensic Sci*. syyskuuta 2005;50(5):1020–7.
47. Griffin RC, Moody H, Penkman KEH, Collins MJ. The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth. *Forensic Science International*. 25. helmikuuta 2008;175(1):11–6.
48. Ohtani S, Sugimoto H, Sugeno H, Yamamoto S, Yamamoto K. Racemization of aspartic acid in human cementum with age. *Arch Oral Biol*. helmikuuta 1995;40(2):91–5.
49. Ohtani S, Ito R, Yamamoto T. Differences in the D/L aspartic acid ratios in dentin among different types of teeth from the same individual and estimated age. *Int J Legal Med*. kesäkuuta 2003;117(3):149–52.

50. Rastogi M, Logani A, Shah N, Kumar A, Arora S. Age estimation of living Indian individuals based on aspartic acid racemization from tooth biopsy specimen. *J Forensic Dent Sci.* 2017;9(2):83–90.
51. Sakuma A, Ohtani S, Saitoh H, Iwase H. Comparative analysis of aspartic acid racemization methods using whole-tooth and dentin samples. *Forensic Science International.* 30. marraskuuta 2012;223(1):198–201.
52. Ohtani S. Different racemization ratios in dentin from different locations within a tooth. *Growth Dev Aging.* 1997;61(2):93–9.
53. Ohtani S, Yamamoto T. Comparison of age estimation in Japanese and Scandinavian teeth using amino acid racemization. *J Forensic Sci.* tammikuuta 2011;56(1):244–7.
54. Ohtani S. Estimation of age from dentin by using the racemization reaction of aspartic acid. *Am J Forensic Med Pathol.* kesäkuuta 1995;16(2):158–61.
55. Sirin N, Link to external site this link will open in a new window, Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S. Age estimation based on aspartic acid racemization in dentine: what about caries-affected teeth? *International Journal of Legal Medicine.* maaliskuuta 2018;132(2):623–8.
56. Ohtani S. Age estimation by aspartic acid racemization in dentin of deciduous teeth. *Forensic Sci Int.* 16. syyskuuta 1994;68(2):77–82.
57. Ogino T, Ogino H. Application to forensic odontology of aspartic acid racemization in unerupted and supernumerary teeth. *J Dent Res.* lokakuuta 1988;67(10):1319–22.
58. Soriano EP, Carvalho MVD de, Santos FBD, Mendoza CC de, Araújo M do SD de, Campello RIC. The post-mortem pink teeth phenomenon: a case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 1. heinäkuuta 2009;14(7):E337-339.
59. Ohtani S, Yamada Y, Yamamoto I. Improvement of Age Estimation Using Amino Acid Racemization in a Case of Pink Teeth. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology.* maaliskuuta 1998;19(1):77–9.
60. Ritz-Timme S, Schütz HW, Waite ER, Collins MJ. "Improvement" of Age Estimation Using Amino Acid Racemization in a Case of Pink Teeth. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology.* kesäkuuta 1999;20(2):216–7.
61. Sakuma A, Saitoh H, Ishii N, Iwase H. The Effects of Racemization Rate for Age Estimation of Pink Teeth. *Journal of Forensic Sciences.* 2015;60(2):450–2.
62. Ohtani S, Sugeno H, Marumo T, Yamamoto K. [Two cases of age estimation from teeth of burned body using amino acid racemization]. *Nihon Hoigaku Zasshi.* huhtikuuta 1989;43(2):191–7.
63. Chen S, Lv Y, Wang D, Yu X. Aspartic acid racemization in dentin of the third molar for age estimation of the Chaoshan population in South China. *Forensic Sci Int.* syyskuuta 2016;266:234–8.
64. Elfawal MA, Alqattan SI, Ghallab NA. Racemization of aspartic acid in root dentin as a tool for age estimation in a Kuwaiti population. *Med Sci Law.* tammikuuta 2015;55(1):22–9.
65. Hassan Q, Asward AR, Bashir Z, Ashraf T. Amino acid racemization in human dentine as an indicator of chronological age-A study in Karachi, Pakistan. *European Journal of Molecular and Clinical Medicine.* 2016;3(3):177–8.

66. Masters PM. Age at death determinations for autopsied remains based on aspartic acid racemization in tooth dentin: importance of postmortem conditions. *Forensic Sci Int.* marraskuuta 1986;32(3):179–84.
67. Ritz S, Stock R, Schütz HW, Kaatsch HJ. Age estimation in biopsy specimens of dentin. *Int J Leg Med.* 1. toukokuuta 1995;108(3):135–9.