DOI: <https://doi.org/10.32353/khrife.1.2021.31>
УДК 340.6

К. В. Мосіюк,

завідувач сектору біологічних досліджень та обліку
Черкаського НДЕКЦ МВС України, м. Черкаси, Україна,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7298-5086>,
e-mail: ekaterinamosiuk@gmail.com

О. А. Карасьова,

судовий експерт сектору біологічних досліджень та обліку
Черкаського НДЕКЦ МВС України, м. Черкаси, Україна,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1859-7936>,
e-mail: olgha.karasiova@gmail.com

Особливості визначення наявності крові в застарілих плямах методом тонкошарової вертикальної хроматографії

Розглянуто варіанти екстрагування застарілих плям крові з метою визначити наявність крові методом тонкошарової вертикальної хроматографії. Це питання є актуальним, оскільки біологічний матеріал має здатність змінюватися під впливом чинників зовнішнього середовища й часу, що може стати на заваді виявленню його наявності на речовому доказі, а також якості проведеного дослідження та правильності зроблених у результаті дослідження висновків. Із метою добору речовин, які б могли забезпечити швидке екстрагування застарілих слідів крові, проведено дослідження з використанням слабких розчинів лугів і кислот та подальшим визначенням наявності крові методом тонкошарової вертикальної хроматографії.

Ключові слова: застарілі сліди крові, тонкошарова вертикальна хроматографія, судова експертиза, гемоглобін, екстрагування.

Постановка наукової проблеми. Щороку значно збільшується кількість злочинів проти особи. Відповідно, виникає потреба у швидкому та якісному дослідженні речових доказів і об'єктів на основі сукупного застосування даних науки, криміналістики й інших напрямів експертних досліджень.

Сліди біологічного походження є вагомими речовими доказами не тільки у кримінальних провадженнях про вбивства, нанесення тяжких тілесних ушкоджень, розбійні напади, зґвалтування, грабежі, а й у решті злочинів, скоєних за участі людини¹. У зв'язку з тим, що експертиза слідів крові

¹ Фурман Я. В., Юсупов В. В., Котляренко Л. Т., Дмитрук Р. С. Особливості збирання у досудовому провадженні біологічних слідів людини : метод. рек. Київ, 2016. 44 с.

посідає перше місце в структурі дослідження біологічних об'єктів, саме питання дослідження слідів крові є сьогодні вельми актуальним ¹.

Основне завдання (яке дасть змогу вирішувати питання, що ставить слідство перед експертами) — це довести, що в поданих на експертизу слідах є кров (незалежно від давності таких слідів і/або спроби знищити їх) та встановити її видову належність або спростувати наявність крові у слідах. Якщо кров належить людині, то встановити можливість її походження від конкретної особи, що передусім вирішується визначенням групової належності за системою АВ0 ².

Якщо експертові не вдалося довести наявність крові, то він має відмовитися від вирішення наступних питань. В іншому разі експерт може отримати результати, які в остаточному підсумку приведуть його до помилково-го висновку ³.

Тому експерт повинен чітко, а головне — обґрунтовано, застосовуючи сучасні методи, вирішувати питання про наявність чи відсутність крові на наданих на дослідження об'єктах ⁴.

Будь-який біологічний матеріал, вилучений на місці події чи місці злочину (зокрема, і кров), може бути зміненим або навіть зруйнованим у разі неправильного вилучення або недотримання умов пакування. Важливим при цьому є зберігання вилучених біологічних слідів, для чого вживають заходів зі створенням штучних умов, які запобігають дії природних чинників, здатних зруйнувати структуру біологічних об'єктів ⁵.

Аналіз основних досліджень і публікацій. Визначення наявності крові методом тонкошарової вертикальної хроматографії є одним з найбільш поширених і зручних методів. Інформація про особливості екстрагування й подальшого дослідження застарілих слідів крові, які через різні причини погано піддаються екстрагуванню, у літературних джерелах відсутня.

Мета статті: відшукати речовини, які б могли забезпечити швидке екстрагування застарілих слідів крові для подальшого використання екстрактів для визначення наявності крові методом тонкошарової вертикальної хроматографії.

¹ Кривда Р. Г., Ющук К. М., Стоєва М. І. Дослідження можливості використання імунохроматографічного тесту «Cito Test Fecal Occult Blood» для встановлення наявності та видової приналежності слідів крові на речових доказах при проведенні комплексної судово-медичної експертизи. *Молодий вчений*. 2017. № 4. С. 44.

² Бурчинський В. Г., Дем'янчук А. П., Хохолєва Т. В. Дослідження рідкої крові та її слідів на речових доказах : метод. рек. Київ, 2010. 32 с.

³ Туманов А. К. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. Москва, 1961. 580 с.

⁴ Дяченко Н. М., Єрмолаєва А. О., Чепіга С. М. Судово-медичні імунологічні дослідження слідів крові та виділень : зб. метод. рек. Київ, 2005. 70 с.

⁵ Фурман Я. В., Юсупов В. В., Котляренко Л. Т., Дмитрук Р. С. Зазнач. твір.

Викладення основного матеріалу дослідження. Під час проведення імунологічних досліджень траплялися випадки, коли скоринки крові на негігроскопічних поверхнях під впливом природних чинників (таких, як високі температури та прямі сонячні промені) не піддавалися екстрагуванню у фізіологічному розчині й дистильованій воді протягом декількох діб.

Крім того, під час використання наявних у лабораторії відомих зразків крові в реакціях виявлено залежність насиченості екстрактів від давності зразків і часу їх екстрагування.

Ці спостереження спонукали співробітників сектору біологічних досліджень та обліку Черкаського НДЕКЦ МВС України дослідити способи екстрагування застарілих плям крові, які б давали змогу виявити кров у найкоротший термін методом тонкошарової вертикальної хроматографії.

Метод тонкошарової хроматографії є доказовим методом виявлення гемоглобіну або його похідних. Цей метод має низку переваг, оскільки сприяє максимальному збереженню інформації про виявлену кров для подальшого дослідження (визначення виду білка крові, виявлення групових антигенів, ДНК-аналізу тощо) та раціональному використанню цього матеріалу ¹.

Гемоглобін є обов'язковою складовою строми еритроцитів. Він належить до білкових сполук, містить білок глобін та забарвлену простатичну групу — гем ².

Визначення наявності крові базується на пероксидазних властивостях гемоглобіну, який (аналогічно ферментам групи пероксидаз) має здатність каталізувати окислювально-відновні реакції. Гемоглобін розкладає перекис водню з виділенням атомарного кисню, який, зі свого боку, окислює бензидин, що супроводжується зміною кольору проявників ³. Про позитивний результат реакції свідчить виникнення на пластинці зон синього кольору з $R_f = 0,82 - 0,9$.

У методиках із підготовки матеріалу до дослідження рекомендовано екстрагувати об'єкти дистильованою водою або фізіологічним розчином хлориду натрію за температури від +4 до +8 °С. Час екстрагування залежить від розчинності речовини плям і може тривати від 1 години до 2—3 діб (найоптимальніший час екстрагування — 18—20 год).

Якщо плями крові на речових доказах мають значну давність утворення (3—6 місяців і більше) або підлягали фіксуєчій дії сонячних променів, хімічних речовин, спиртів тощо, то екстрагування може відбуватися за кімнатної температури, але не вище ніж 22 °С ⁴.

Під час дослідження застарілих зразків крові, виявлено, що за допомогою згаданих вище рекомендацій досягти насиченості екстракту й отримати

¹ Бурчинський В. Г., Дем'янчук А. П., Хохолєва Т. В. Зазнач. твір.

² Кривда Г. Ф., Дем'янчук А. П., Котельникова В. О., Старовойтова Р. О., Кривда Р. Г. Судово-медичне дослідження речових доказів : навч.-метод. посіб. Херсон, 2014. 460 с.

³ Дяченко Н. М., Єрмолаєва А. О., Чепіга С. М. Зазнач. твір.

⁴ Кривда Г. Ф., Дем'янчук А. П., Котельникова В. О., Старовойтова Р. О., Кривда Р. Г. Зазнач. твір.

на хроматографічній пластинці сферичні плями синього кольору з $R_f = 0,82 - 0,9$, що відповідає R_f крові, не вдалося.

Враховуючи білкову природу гемоглобіну, розглянули можливість впливу на його структуру розчинів слабких кислот (оцтової кислоти) і слабких лугів (10 %-го розчину аміаку).

Матеріали й методи дослідження. Дослідження проводили 2020—2021 рр. на базі лабораторії сектору біологічних досліджень та обліку Черкаського НДЕКЦ МВС України. Для вирішення поставленої мети використали зразки крові, відібрані 2011 р. У живих людей, без додавання антикоагулянтів, активаторів згустку тощо, вилиті на стерильні марлеві серветки та висушені в стерильних лабораторних умовах із дотриманням температурного режиму й вологості, що відповідає вимогам біологічної лабораторії, без потрапляння прямих сонячних променів. Надалі висушені на стерильних марлевих серветках зразки крові помістили до паперових згортків, запакованих у паперові конверти. Підготовлені зразки зберігали в шафах у лабораторних умовах.

Методика виявлення слідів крові містить такі етапи:

- підготовка вирізок із застарілих зразків крові;
- підготовка вирізок із контролів предметів-носіїв і марлі;
- підготовка вирізок зі свіжих зразків крові;
- приготування 0,01 %-го розчину еритроцитів — «свідок»;
- приготування 10 %-го розчину аміаку;
- приготування 10 %-го розчину оцтової кислоти;
- екстрагування вирізок;
- дослідження методом тонкошарової вертикальної хроматографії.

Результати дослідження

Метод екстракції

Для екстрагування підготували по чотири вирізки із застарілих слідів крові, зі свіжих зразків крові та контролів предметів-носіїв до них, які помістили до пробірок та окремо залили (із незначним надлишком) дистильованою водою, фізіологічним розчином, 10 %-м розчином аміаку та 10 %-м розчином оцтової кислоти. Пробірки закривали й екстрагували впродовж 18 годин в умовах побутового холодильника за температури $+6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Дослідження методом тонкошарової вертикальної хроматографії

Отримані екстракти центрифугували 5 хв при 1500 об/хв і досліджували методом тонкошарової вертикальної хроматографії. Розподіл проводили на пластині «Сорбфіл ПТСХ-П-А-УФ» завдовжки 100 мм у системі розчинників н-бутанол — льодяна оцтова кислота — дистильована вода (4 : 1 : 2) із використанням як «свідка» 0,01 % розчину заздалегідь відомої крові.

По краплі кожного екстракту пошарово наносили на пластину. Додатково для контролю на пластину наносили 10 %-й розчин аміаку, 10 %-й розчин оцтової кислоти та фізіологічний розчин. Потім пластини прогрівали 15 хв

за температури 100 °C і вмішували до камери із системою розчинників. Пластину виймали за умови, коли рівень розчинників не досягав 10 мм до її верхнього краю, висушували за кімнатної температури до усунення запаху оцтової кислоти, а потім обробляли послідовно 1 %-м спиртовим розчином бензидину і 3 %-м розчином перекису водню та визначали R_f «свідка» і екстрактів.

У результаті дії проявників сині плями сферичної форми з $R_f = 0,89$, які відповідали R_f «свідка», спостерігали:

- з екстрактами зі свіжого зразка крові, які екстрагували в дистильованій воді, у фізіологічному розчині, 10 %-му розчині аміаку й 10 %-му розчині оцтової кислоти;
- з екстрактами із застарілих зразків крові, які екстрагували в 10 %-му розчині аміаку й 10 %-му розчині оцтової кислоти.

Із контролями предметів-носіїв, які екстрагували в дистильованій воді, у фізіологічному розчині, 10 %-му розчині аміаку й 10 %-му розчині оцтової кислоти отримано негативний результат реакції. Також негативний результат реакції отримано із застарілими зразками крові, які екстрагували в дистильованій воді й у фізіологічному розчині.

Екстракцію досліджуваних зразків подовжили ще на 24 год, після чого екстракти знову центрифугували та проводили дослідження методом тонкошарової вертикальної хроматографії за викладеними вище умовами. Здобуті результати відповідали попереднім, показники екстрактів застарілих зразків крові в дистильованій воді й у фізіологічному розчині не змінилися, тобто на хроматографічній пластині не спостерігали синіх плям сферичної форми з R_f , який відповідає R_f «свідка».

Екстрагування подовжили до 20 днів — поки застарілі зразки крові не проявилися на хроматографічній пластині у вигляді синіх плям сферичної форми з R_f , який відповідає R_f «свідка». При цьому плями були не виражені: виявлення плям майже на межі детектування.

Результати проведеного дослідження наведено в табл. 1.

Таблиця 1

№ з/п	Досліджуваний екстракт	День									
		1-й	2-й	3-й	6-й	9-й	10-й	14-й	16-й	18-й	20-й
1	«Свідок» 0,01 %-й $R_f = 0,89$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Застарілий зразок крові з фізіологічним розчином	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—/+

№ з/п	Досліджуваний екстракт	День									
		1-й	2-й	3-й	6-й	9-й	10-й	14-й	16-й	18-й	20-й
3	Застарілий зразок крові з дистильованою водою	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+
4	Застарілий зразок крові з 10 %-м розчином аміаку	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Застарілий зразок крові з 10 %-м розчином оцтової кислоти	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Свіжий зразок крові з фізіологічним розчином	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Свіжий зразок крові з дистильованою водою	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Свіжий зразок крові з 10 %-м розчином аміаку	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Свіжий зразок крові з 10 %-м розчином оцтової кислоти	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Контроль об'єкта-носія з фізіологічним розчином	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Контроль об'єкта-носія з дистильованою водою	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Контроль об'єкта-носія з 10 %-м розчином аміаку	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Контроль об'єкта-носія з 10 %-м розчином оцтової кислоти	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Контроль 10 %-м розчину аміаку	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Контроль 10 %-м розчину оцтової кислоти	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Контроль фізіологічного розчину	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Контроль марлі	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Умовні позначки:

«-» — пляма не виявляється;

«+» — пляма виявляється;

«-/» — пляма виявляється на межі детектування.

Рис. 1. Зображення хроматографічної пластинки з досліджуваними об'єктами після першої доби екстрагування

У результаті проведеного дослідження встановлено, що в разі екстрагування:

- застарілих зразків крові (висушені 9 років тому) дистильованою водою та фізіологічним розчином утворення синіх плям сферичної форми на хроматографічній пластині з $R_f = 0,89$, що відповідає R_f «свідка», отримано лише на 20 день екстрагування;
- застарілих зразків крові (висушені 9 років тому) 10 %-м розчином аміаку та 10 %-м розчином оцтової кислоти утворення синіх плям сферичної форми на хроматографічній пластині з $R_f = 0,89$, що відповідає R_f «свідка», отримано після першої доби екстрагування;
- свіжих зразків крові дистильованою водою та фізіологічним розчином утворення синіх плям сферичної форми на хроматографічній пластині з $R_f = 0,89$, що відповідає R_f «свідка», отримано після першої доби екстрагування;
- контролів предметів-носіїв дистильованою водою, фізіологічним розчином, 10 %-м розчином аміаку та 10 %-м розчином оцтової кислоти отримано негативний результат реакції, тобто сині плями сферичної форми не утворилися.

Висновки. З'ясовано, що визначення наявності крові методом тонкошарової вертикальної хроматографії після загальноприйнятого екстрагування

об'єктів фізіологічним розчином або дистильованою водою в застарілих зразках крові ускладнено довготривалою екстракцією.

У разі використання слабких розчинів лугів і кислот (таких, як 10 %-й розчин аміаку й 10 %-й розчин оцтової кислоти) після першої доби екстрагування здобуто позитивні результати.

Отримані екстракти з 10 %-м розчином аміаку й 10 %-м розчином оцтової кислоти потребують подальшого дослідження — для встановлення їх придатності під час проведення інших імунологічних досліджень, крім визначення наявності крові.

References

- Burchynskiy, V. H., Dem'ianchuk, A. P., Khokholieva, T. V. (2010). *Doslidzhennia ridkoi krovi ta yii slidiv na rechovykh dokazakh* : metod. rek. Kyiv [in Ukrainian].
- Diachenko, N. M., Yermolaieva, A. O., Chepiha, S. M. (2005). *Sudovo-medychni imunologichni doslidzhennia slidiv krovi ta vydilen* : zb. metod. rek. Kyiv [in Ukrainian].
- Furman, Ya. V., Yusupov, V. V., Kotliarenko, L. T., Dmytruk, R. S. (2016). *Osoblyvosti zbyrannia u dosudovomu provadzhenni biolohichnykh slidiv liudyny* : metod. rek. Kyiv [in Ukrainian].
- Kryvda, H. F., Dem'ianchuk, A. P., Kotelnikova, V. O., Starovoitova, R. O., Kryvda, R. H. (2014). *Sudovo-medychne doslidzhennia rechovykh dokaziv* : navch.-metod. posib. Kherson [in Ukrainian].
- Kryvda, R. H., Yushchuk, K. M., Stoieva, M. I. (2017). Doslidzhennia mozhlyvosti vykorystannia imunokhromatohrafiichnoho testu «Cito Test Fecal Occult Blood» dlia vstanovlennia naiavnosti ta vydovoi prynalezhnosti slidiv krovi na rechovykh dokazakh pry provedenni kompleksnoi sudovo-medychnoi ekspertyzy. *Molodyi vchenyi*. № 4. [in Ukrainian].
- Tumanov, A. K. (1961). *Sudebno-meditsinskoe issledovanie veshchestvennykh dokazatelstv*. Moskva [in Russian].

Е. В. Мосиук, О. А. Карасёва

Особенности установления наличия крови в застарелых пятнах методом тонкослойной вертикальной хроматографии

Поскольку экспертиза следов крови занимает первое место в структуре исследования биологических объектов, в настоящее время актуален вопрос исследования следов крови. Основная задача (позволяющая решить вопросы, которые следствие ставит перед экспертами) — это доказать, что в представленных на экспертизу следах имеется кровь (независимо от их давности и/или попытки их уничтожить) и выяснить её видовую принадлежность или опровергнуть наличие крови в следах. Если эксперту не удастся доказать наличие крови, то он должен отказаться от решения следующих вопросов. В противном случае эксперт может получить результаты, которые в конечном итоге приведут его к ошибочному выводу.

В статье рассмотрены варианты экстрагирования застарелых пятен крови для установления наличия крови методом тонкослойной вертикальной хроматографии. Этот вопрос весьма актуален, поскольку

биологический материал может изменяться под воздействием факторов внешней среды и времени, что может помешать установить факт его наличия на вещественном доказательстве, а также навредить качеству проведённого исследования и правильности сделанных в результате исследования выводов. Для подбора веществ, которые могли бы обеспечить быстрое экстрагирование застарелых следов крови, провели исследование с использованием слабых растворов щелочей и кислот и последующим установлением наличия крови методом тонкослойной вертикальной хроматографии. В ходе иммунологических исследований случилось, что корочки крови на негигроскопичных поверхностях под воздействием природных факторов (таких, как высокие температуры и прямые солнечные лучи) не подвергались экстрагированию в физиологическом растворе и дистиллированной воде в течение нескольких суток. Кроме того, при использовании известных образцов крови в реакциях выявили зависимость насыщенности экстрактов от давности образцов и от времени их экстрагирования. Эти наблюдения сподвигли сотрудников сектора биологических исследований и учёта Черкасского НИЭКЦ МВД Украины исследовать способы экстрагирования застарелых пятен крови, которые позволяли бы выявить кровь в кратчайшие сроки методом тонкослойной вертикальной хроматографии.

Ключевые слова: застарелые следы крови, тонкослойная вертикальная хроматография, судебная экспертиза, гемоглобин, экстрагирование.

E. Mosiuk, O. Karasova

Features of establishing the presence of blood in old stains by the method of thin-layer vertical chromatography

Due to the fact that the bloodstain pattern analysis takes the first place in the structure of the study of biological objects, the question of the study of blood patterns is relevant today. The main task (that will allow to solve the following, which puts the investigation before the experts), is to prove that these patterns, which are examined, contain blood, (regardless of their remoteness, attempts to destroy patterns of blood), find out its types or refute traces of blood. If the expert fails to prove the presence of blood, he must refuse to address the following issues. Otherwise, the expert may obtain results that will ultimately lead him to an erroneous conclusion.

The article considers options for extraction of old blood stains in order to establish the presence of blood by the method of thin-layer vertical chromatography. This question is still relevant, as biological material can change under the influence of environmental factors and time and this can be an obstacle to establishing the fact of its presence on physical evidence, and also it can do harm to the quality of the study and the correctness of the conclusions, made as a result of the study. In order to select substances, that could provide rapid extraction of old blood stains, a study was performed using weak solutions of

alkalis and acids and subsequent determination of the presence of blood by thin layer vertical chromatography. In immunological studies, there have been cases where blood crusts on non-hygroscopic surfaces under the influence of natural factors (such as high temperatures and direct sun rays) have not been extracted in saline and distilled water for several days. In addition, when using known blood samples in the reactions, the dependence of the saturation of the extracts on the age of the samples and the time of their extraction. These observations prompted researches in the sector of biological research and accounting of the Cherkasy NDEKTs of the Ministry of Internal Affairs on methods for extracting old blood stains, which would allow to detect blood in the shortest possible time by the method of thin-layer vertical chromatography.

Keywords: *old blood stains, thin-layer vertical chromatography, forensic expertise, haemoglobin, extracting.*

Надійшла до редколегії 31.03.2021 р.

Мосіюк К. В., Карасьова О. А. Особливості визначення наявності крові в застарілих плямах методом тонкошарової вертикальної хроматографії. *Теорія та практика судової експертизи і криміналістики* : зб. наук. пр. / редкол.: О. М. Ключев, В. Ю. Шепітько та ін. Харків : Право, 2021. Вип. 23. С. 400—409. DOI: <https://doi.org/10.32353/khrife.1.2021.31>.