A microscopic view of red blood cells (erythrocytes) in a light blue fluid. The cells are biconcave discs, appearing as bright red, slightly irregular shapes. Some are in focus, showing their characteristic shape, while others are blurred in the background. The overall scene is a dense field of these cells.

**АБДУЛЛАЕВ БАХТИЁР САИДОВИЧ  
АМАНОВА ГУЛАФЗАЛ УЗБЕКЪОЕВНА  
ИСМОИЛОВ ЖАСУР МАРДОНОВИЧ**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ХРОМАТОГРАФИИ  
ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
НАЛИЧИЯ И ГРУППЫ КРОВИ В СЛЕДАХ**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
УЗБЕКИСТАН  
САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ИНСТИТУТ**



**АБДУЛЛАЕВ БАХТИЁР САИДОВИЧ  
АМАНОВА ГУЛАФЗАЛ УЗБЕКБОЕВНА  
ИСМОИЛОВ ЖАСУР МАРДОНОВИЧ**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ  
ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ И ГРУППЫ  
КРОВИ В СЛЕДАХ**

***МОНОГРАФИЯ***



**Sam D'TI  
axborot-resurs markazi**

**САМАРКАНД – 2021**

УЎК 612.118.221.2:543.54

ББК 24.4

А 13

Абдуллаев Б.С, Аманова Г.У, Исмоилов Ж.М.

Использование метода хроматографии для одновременного определения наличия и группы крови в следах [текст] /Б. С. Абдуллаев, Г. У. Аманова, Ж. М. Исмоилов. - Самарканд : TIBBIYOT KO'ZGUSI, 2021. - 108 б

#### СОСТАВИТЕЛИ:

*Абдуллаев Бахтиер Саидович* - к.м.н., доцент кафедры Патологической анатомии с секцион биопсии СамМИ

*Аманова Гулафзал Узбекбаевна* - ассистент кафедры Патологической анатомии с секцион биопсии СамМИ

*Исмоилов Жасур Мардонович* - ассистент кафедры Патологической анатомии с секцион биопсии СамМИ

#### РЕЦЕНЗЕНТЫ:

*И.И.Бахриев* – Заведующий кафедрой судебной медицины и медицинского права ТМА, к.м.н., доцент.

*Ф.М.Хамидова* – Заведующий кафедрой патологической анатомии СамМИ, к.м.н., доцент.

*В монографии приводятся изучению использования метода хроматографии для одновременного определения наличия и группы крови в следах. Монография представляет собой научный труд и весьма полезным для судебно-медицинских экспертов, а также врачей всех специальностей и студентов медицинских институтов.*

ISBN 978-9943-7151-8-9

© Б.С АБДУЛЛАЕВ, Г.У АМАНОВА, Ж.М ИСМОИЛОВ.

© TIBBIYOT KO'ZGUSI, 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА I.....	8
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОАНТИГЕННОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ В СУДЕБНО- МЕДИЦИНСКОМ ОТНОШЕНИИ .....	8
ГЛАВА II .....	31
ОБНАРУЖЕНИЕ АГГЛЮТИНОГЕНОВ СИСТЕМЫ АВО МЕТОДОМ АБСОРБЦИИ-ЭЛЮЦИИ В СЛЕДАХ КРОВИ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ .....	31
Характеристика исследуемого материала .....	31
Установление возможности определения группы крови в следах, подвергшихся восходящей хроматографии .....	32
Исследование микроследов крови методом радиальной микрохроматографии.....	46
Исследование следов крови, загрязненных некоторыми горючими и смазочными веществами .....	51
Исследование следов крови, загрязненных некоторыми сыпучими веществами .....	55
Исследование пятен крови, подвергшихся гниению и стирке моющими средствами.....	57
Исследование пятен крови, расположенных на различных текстильных тканях .....	64
ГЛАВА III.....	67
НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ В ПЯТНАХ МЕТОДОМ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ .....	67

Чувствительность метода, оптимальная температура, разведение сывороток и время хроматографирования .....	74
Исследование пятен крови, расположенных на различных текстильных тканях .....	80
Обнаружение агглютиногенов АВО в пятнах крови, смешанных с некоторыми выделениями.....	82
Сравнительная оценка результатов исследования экспертных материалов реакцией абсорбции-элюции и методом аффинной хроматографии .....	86
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>90</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>96</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>96</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>94</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проведенных исследований.** В деятельности органов правосудия, направленной на борьбу с преступностью, большое значение придается судебной медицине, в частности одному из ее разделов – исследованию вещественных доказательств.

Экспертиза следов крови составляет основную часть работы судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. Она может явиться объективным подтверждением совершенного преступления. Следы крови, или, как их называют «Немые свидетели преступления», содержат информацию о преступнике или жертве и способствуют установлению виновных.

В практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств проблема групповой идентификации малых пятен крови и в настоящее время является одной из наиболее актуальных проблем. Метод абсорбции агглютининов в количественной модификации, широко применяемый для обнаружения групповых антигенов в пятнах крови, из-за своей сравнительно низкой чувствительности, не может быть использован при исследовании небольших пятен, содержащих малое количество антигенного материала.

Среди существующих иммунологических методов исследования реакция абсорбции-элюции (РАЭ), предложенная в 1923 году V. Siracuza и реакция смешанной агглютинации (РСА), было предложена А. Wiener, M. Herman в 1939 году и они являются наиболее перспективными (Лапенков М.И., Гуртовая С.В., Александрова В.Ю. Капинос Т.А 2009 г). Чувствительность этих методов позволяет исследовать кровяные пятна, в которых содержится до 0,001 мг сухой крови (Karger B, Rand S, Fracasso T, Pfeiffer H 2008). Оба метода не требуют большого количества исследуемого материала и в большинстве случаев установление ими групповой принадлежности крови не представляется затруднительным. Однако, в ряде случаев, из-за наличия малого объема исследуемого объекта (когда весь материал идет на

установление наличия и видовой принадлежности крови), а также из-за влияния предметов-носителей, их групповая принадлежность не определяется. Кроме того, для этих общепринятых методик характерен ряд недостатков, а именно: трудоемкость технического выполнения, необходимость цельных сывороток, большого количества лабораторной посуды, трудность промывания неспецифических связанных агглютининов или возможность вымывания комплекса антиген-антитело, что влечет за собой снижение чувствительности метода, либо даже возможность получения отрицательных результатов (А. Busuttill 2003; Carter AL, Forsythe Eгman J, Hawkes V 2006; Герасимова Н.Д, 2002; Л.О. Барсегянц, 2004 и др.). Хотя для устранения этих недостатков был предложен ряд модификаций реакций абсорбции агглютининов и абсорбции-элюции, тем не менее получить желаемые результаты не удалось.

Для установления наличия крови в следах в настоящее время широко используется метод хроматографии, обладающий рядом преимуществ перед другими способами, особенно при исследовании пятен крови, загрязненных и измененных под воздействием ряда внешних факторов. А. П. Громов с соавт. считают, что хроматографические методы исследования отвечают современным требованиям и повышают доказательность экспертных заключений. Однако попыток использования хроматографии для определения групповой принадлежности крови в следах, как видно из доступной литературы, не делалось. Между тем, имеются все основания считать возможным ее применение в этих целях.

Для решения этих задач и одновременного определения наличия и группы крови в следах в 1982 году был предложен и внедрен новый метод – Биоспецифическая адсорбционная хроматография (Аффинная хроматография) С учетом изложенного, нами поставлена цель изучить возможности различных методов для последовательного определения наличия и групповой принадлежности (системы АВО) крови в микроследах при изучении одного объекта и для этого:

Сопоставить возможности использования объекта после установления наличия крови методом радиальной микрохроматографии на бумаге для последующего определения группы крови РАЭ;

Сопоставить возможности РАЭ в общепринятой модификации с предлагаемой при исследовании пятен крови, расположенных на различных текстильных тканях, измененных воздействием высокой температуры, солнечных лучей, загрязненных различными сыпучими веществами, горюче-смазочными веществами, и пятен крови, подвергшихся гниению и стирке моющими средствами;

Сопоставить возможности последовательного определения наличия и групповой принадлежности (системы АВО) крови в микроследах методом биоспецифической адсорбционной (аффинной) хроматографии и другими общепринятыми методами;

Изучить возможность применения аффинной хроматографии для установления наличия и групповой принадлежности (системы АВО) крови с микроследах, расположенных на различных текстильных тканях и смешанных с выделениями человека.



## ГЛАВА I. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОАНТИГЕННОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ В СУДЕБНО- МЕДИЦИНСКОМ ОТНОШЕНИИ

Развитие судебно-медицинской гематологии связано с достижениями ряда наук: иммунологии, гематологии, биохимии и др. Большое значение в ее успехах имеет исследование биохимического состава крови, особенно дифференциации групповых антигенов человеческого организма. В настоящее время число изоантигенов исчисляется многими десятками, далеко не исчерпывая всего антигенного и биохимического разнообразия генетических маркеров, характеризующих антигенный полиморфизм эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и сывороточных белков крови человека.

Н.М.Михайлова (2003) считает, что антигенное разнообразие внутри вида свидетельствует о продолжении развития биохимической антигенной структуры, создании огромного разнообразия внутривидовых свойств. Вместе с тем, по мнению автора, причиной возникновения и развития внутривидовых признаков являются факторы внешней среды, под влиянием которых изменялись биохимические, антигенные структуры и, закрепляясь, передавались потомству. Это позволяет констатировать наличие неразрывной связи между движением и материей и переход количественных изменений в новые качественные.

Современное состояние вопроса о группах крови свидетельствует, что изосерологические факторы в своих различных состояниях постоянно переключаются от категории групповых биологических признаков в категорию индивидуальных особенностей.

В судебно-медицинских лабораториях исследуется как жидкая кровь, так и ее пятна (следы). В жидком виде кровь исследуется в случаях спорного отцовства, подмены детей, а также при сопоставлении результатов обнаруженных антигенов крови на

вещественных доказательствах с кровью потерпевших или обвиняемых.

Работу судебно-медицинских лабораторий по исследованию вещественных доказательств в основном составляет экспертиза крови. Следы крови могут служить объективным показателем совершенного преступления. Они содержат информацию о преступнике или жертве и способствуют отысканию и установлению виновных.

Круг вопросов, стоящих перед экспертом, определяется, с одной стороны, потребностями суда и следствия, и, с другой, возможностями экспертизы. С успехами медицины, биологии и ряда других наук расширяется информация, совершенствуется техника и методика исследования крови, а вместе с тем растет и круг вопросов, которые судебно-медицинская экспертиза способна разрешить. Если в 20-е годы XX века активно накапливалась информация об изосерологической системе и применение ее в практике экспертизы, а в 30-е годы совершенствовались методы исследования и только со второй половины 50-х годов началось углубленное изучение групповой дифференциации человеческого организма с целью установления возможного происхождения крови в пятне от определенного лица (Г.П.Колоколова 2006). В настоящее время возможно выявление в следах не только ряда эритроцитарных, но и сывороточных систем. Однако определение группы крови системы АВО все еще остается одним из первостепенных и постоянных вопросов судебно-медицинской экспертизы следов крови.

Определение классической группы крови в пятне основано на обнаружении в нем агглютиногенов и агглютининов. Такое, так называемое двойное определение группы крови в следах впервые было предложено Н.В. Поповым в 1926 году. Однако в судебно-медицинской практике основное внимание уделяется агглютиногенам, поскольку агглютинины нестойки к воздействию внешних факторов. Существует много методов и их модификаций для обнаружения агглютиногенов в следах. Так, Гуртовая С.В., Первушина Е.А., Первушина Ю.В. (1997) предложили реакцию

абсорбции агглютининов в качественной модификации. Позднее Сахаров Р. С., Федулова М.В., Гуреева Н.Б. и соавторы (1999) разработал количественную модификацию реакции абсорбции агглютининов, при использовании которой гемагглютинирующая сыворотка группы О заменяется сыворотками альфа и бета. Данный способ основан на поглощающем свойстве агглютиногенов пятен крови одноименных агглютининов из изогемагглютинирующих сывороток. Поглощенные (абсорбированные) агглютинины определяются проверкой титра исходных сывороток. Следует отметить, что на протяжении многих лет с момента открытия метода обнаружения агглютиногенов в пятнах определялись лишь агглютиногены А и В, тогда как агглютиноген О не исследовался. Его обнаружение в пятнах связано с изготовлением F. Schiffetal и P. M. Уринсоном агглютинирующей сыворотки анти-О путем иммунизации коз бациллами Григорьева-Шига. Получение гетероиммунных гемагглютинирующих сывороток анти-А и анти-В путем иммунизации животных в СССР разработано М. Н. Резниковой (1949). В дальнейшем появились новые возможности получения иммунных сывороток (ChiaroniJ., LegrandD, Dettoril., FerreraV. 2004; Сахаров Р.С., Федулова М.В., 1999; ChoD., KimS.-H., JeonM. etal. 2004 и др.). Большую роль в повышении качества обнаружения антигена О сыграло введение в практику фитоагглютина анти-Н, полученного М. И. Потаповым из семян бобовника Ватетера.

Известно, что наиболее удовлетворительные результаты реакции абсорбции агглютининов в количественной модификации получаются при соотношении 50 мг вырезки из пятна и 0,3 мл сыворотки. К. А. Hamada (2002) установила возможность реакции абсорбции агглютининов в количественной модификации и при наличии очень малого количества высушенной крови. Причем при использовании иммунных сывороток анти-А и анти-В минимальным соотношением является 5 мг корочки и 0,05 мл сыворотки, а при использовании сыворотки анти-О даже 1 мг крови и 0,005 мл сыворотки, т.е. меньшее количество, чем изосыворотки (15мг на 0,05 мл). Однако в практике судебно-медицинской экспертизы

встречаются случаи, когда в распоряжении эксперта поступает весьма незначительное количество материала. В таких случаях Н.Н. Ажицкая., Н.Б. Голубинская., С.В. Тищенко., Н.В.Смуглова (2013) предлагает последовательное определение антигенов крови А и В, М и N в одной и той же вырезке из пятна (Т. Е. Чукавина., С. В. Гуртовая., А. Д. Рамишвили 2006.) По такому же принципу В.Л. Сидоров (2010) установила возможность обнаружения агглютиногенов О в той же навеске пятна крови, в которой предварительно определялись агглютиногены А и В.

В ходе проверок предложенных способов исследователями было установлено влияние ряда причин на результаты реакции абсорбции агглютининов, изучение которых имеет существенное значение в практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств.

Выше отмечалось значение определения групповой принадлежности крови в следах при расследовании некоторых преступлений, посягавших на жизнь и здоровье людей. Однако нередки случаи, когда из-за влияния некоторых факторов результаты исследования бывают неудовлетворительными.

Проверочные работы исследователей показали, что качество проводимой реакции абсорбции агглютининов зависит от особенностей исследуемой крови и предмета-носителя, на котором находится данный след. Из-за влияния незапятнанных предметов-носителей на сыворотки при реакции абсорбции агглютининов в ряде случаев групповую принадлежность определить невозможно. По данным С.В.Гуртова (1999) и др., процент случаев, когда из-за влияния предмета-носителя на агглютинины сыворотки, применяемые для абсорбции, не представляется возможным определить группы крови в пятне, достигает 25-30%. Контрольные незапятнанные предметы-носители воздействуют на сыворотки в основном своими свойствами (красители и пр.), неспецифическими и специфическими загрязнителями, такими как выделения человеческого организма, содержащими агглютинины А, В и О.

Возможность отрицательного влияния предмета-носителя пятна крови на реакции абсорбции агглютининов давно известна. Первые сообщения по данному вопросу встречаются в работах П. В. Серебренникова, Е. В. Чучмарева и др (Л.О.Барсегянц 2005). Авторы установили, что определение группы крови в пятнах, расположенных на текстильных тканях весьма затруднительно и что сами предметы-носители влияют на ход реакции абсорбции агглютининов. Одним из таких факторов являются различные красители текстильных тканей.

Изложенное побудило ученых к поиску путей устранения указанных недостатков. С этой целью исследовались различные текстильные ткани (шелковые, хлопчатобумажные, шерстяные, искусственные текстильные ткани), промышленные красители, деревянные и металлические изделия и др. При этом установлено определенное влияние этих предметов-носителей, но, наряду с этим, выявлено и значительное влияние предметов-носителей, загрязненных различными веществами и, прежде всего, выделениями человеческого организма, препятствовавшими установлению группы крови.

Следует отметить, что выделения человеческого организма, пропитывающие предмет-носитель, не только способны препятствовать определению группы крови, но и искажают ее изосерологическую характеристику. Это объясняется тем, что антигены выделения (пот, моча, слюна и др.) могут абсорбировать агглютинины крови и при исследовании пятна не определяются и, более того, при исследовании антигенов могут быть обнаружены агглютиногены, свойственные другим группам (В.Ю.Александрова 2008; Л.О.Барсегянц 1999; С.В.Гуртовая 2007).

Учитывая теоретическую и практическую значимость специфических загрязнителей, В.Л.Прошутин, В.Е.Чирков, А.Ю. Вавилов (2005) исследовал экспериментальные пятна крови с примесью различного соотношения слюны. При этом доказал, что примесь слюны в следах крови может служить источником серьезных ошибок в судебно-медицинской практике, так как ее агглютиногены абсорбируют агглютинины крови и препятствуют их выявлению,

извращая тем самым результаты реакции при определении групповой принадлежности крови.

У.Вунгаиета (1999) указывает, что при определении группы крови в пятнах примесь пота в следах может исказить результаты исследования. Для инактивации загрязняющих антигенов автор предлагает пятна предварительно фиксировать метанолом. Особо сильное влияние на результаты исследования имеют предметы-носители из джутовой и бязевой ткани, даже незагрязненные выделениями (М.С. Свирский 1999).

Следы крови могут находиться не только на одежде и постельных принадлежностях потерпевших или обвиняемых, но и на месте происшествия, т.е. на самых разнообразных предметах. Исходя из этого, Е. С. Лутчева исследовала пятна крови, расположенные на 8 породах дерева: березе, липе, сосне, клене, иве, рябине, дубе и осине. Автор выявила не только ослабление абсорбционной способности крови, но и неспецифическое связывание альфа и бета агглютининов древесиной и корой дерева при отсутствии пятен крови. Свойства древесины березы, липы, сосны и особенно дуба значительно изменяли результаты реакции абсорбции агглютининов. На исход реакции влияли свойства коры липы, сосны, клена, ивы и рябины.

Таким образом, даже приведенные немногочисленные данные свидетельствуют, что одной из частых причин неблагоприятного воздействия на результаты реакции абсорбции агглютининов, является влияние предметов-носителей. Наряду с этим установлена и иная причина, а именно: маловыраженная способность агглютиногенов отдельных образцов крови абсорбировать одноименные агглютинины (С.В. Гуртовая, 2005; Н.И. Васильев 2002; Е.Н. Леонова 201 и др.).

Исходя из того, что наиболее частой причиной препятствия к определению группы крови в пятнах являются неблагоприятные воздействия загрязненных предметов-носителей и наличие слабых агглютиногенов в пятне, начались поиски путей устранения этих причин. Так, например, для устранения влияния предмета-носителя на реакцию абсорбции агглютининов П.Л. Иванов (2006) предлагал

метод задержки агглютинации, при котором, по мнению автора, неспецифические антигены не принимают участия в реакции. Методом предусматривается предварительное приготовление вытяжки из пятна (физиологическим раствором), с которой ставится реакция абсорбции агглютининов. Автор считает, что таким путем устраняется неспецифическая абсорбция предмета-носителя. На наш взгляд, удовлетворительные результаты можно получить только при свежих пятнах, т.к. в старых пятнах, подвергшихся воздействию многочисленных факторов, очень скоро группоспецифические вещества крепко фиксируются к предметам-носителям и не растворяются в физиологическом растворе и, следовательно, не выявляются методом задержки агглютинации. Кроме того, на такой вытяжке из пятна, даже из свежего, выделяется только часть антигенов, тогда как основная часть остается на предмете-носителе.

С целью устранения влияния предметов-носителей на реакции абсорбции агглютининов предложен ряд модификаций. Так, К.Е. Завадинская считает целесообразным уменьшить срок абсорбции. В.И. Чарный рекомендует ставить реакции с более крепкими сыворотками (при наличии влияния предметов-носителей) и более слабыми сыворотками при наличии слабых агглютининов (Г.Н. Назаров, Г.А. Пашиян 2003). По Я.С. Познанскому предмет-носитель следует заливать подходящими разведениями сывороток (предварительно опытным путем, подобранным с учетом влияния на нее предмета-носителя пятна). Модификация Познанского не лишена некоторых недостатков, а именно: выводы о группе крови могут быть ошибочными из-за невозможности выявления слабо выраженных агглютиногенов, поскольку выбор разведений сывороток не дает гарантии получения максимальных показателей абсорбции агглютининов. В результате этого требуются предметы-носители без крови больших размеров, нередко отсутствующие (Ю.И. Пиголкин, Е.Н. Леонова и др 2014).

Г.А. Прейсман указывая на отдельные недостатки реакции абсорбции агглютининов в количественной модификации (потребность относительно большего количества материала

предмета-носителя, частое интенсивное абсорбирование изосывороток, трудоемкость, затрата большего количества времени, потребность большего количества химической посуды), разработал свой метод. Вместо пробирок берутся 14 предметных стекол, на которых готовится рабочее разведение, а затем титрование сыворотки и установление группы (степень поглощения). Автор считает предложенный вариант значительно проще существующих и рациональнее с точки зрения экономии средств и времени исследования.

Для устранения влияния предмета-носителя были также предложены иммунные сыворотки. Первое сообщение, как указывалось, принадлежало Н.Н. Меркулова (2001), исследования которого показали, что иммунные сыворотки анти-А и анти-В менее податливы влиянию предметов-носителей, чем изосыворотки альфа и бета. Иммунные сыворотки агглютиногенами крови абсорбируются лучше, чем изоагглютинины. Это подтверждается и данными М.А. Бронниковой которая для устранения влияния предмета-носителя на реакцию абсорбции агглютининов предлагает их заливать иммунными сыворотками. Такого же мнения придерживается Л. Г. Бирюкова указывающая, что гемагглютинирующие иммунные сыворотки анти-А и анти-В в меньшей степени подвергаются воздействию контрольных участков предмета-носителя по сравнению с нормальными изогемагглютинирующими сыворотками альфа и бета (Н.Н. Меркулова 2004).

Путем сравнительных исследований иммунных и изогемагглютинирующих сывороток Минеева Н.В., Меркулова Н.Н., Хромова Е.А., Боброва И.А. (2003) пришла к выводу, что иммунные сыворотки анти-А и анти-В заслуживают высокой оценки, т.к. успешно устраняют отрицательные влияния предмета-носителя. Следует отметить, что использование иммунных сывороток не всегда эффективно. Помимо трудоемкости их получения и дороговизны, в отдельных случаях их нельзя использовать при экспертизе вещественных доказательств. Так, например, при обнаружении антигенов гнилостно-измененной крови



изогемагглютинирующие сыворотки альфа и бета дают лучшие результаты, чем иммунные сыворотки анти-А и анти-В установила, что сыворотки анти-А и анти-В в меньшей степени подвергаются воздействию контрольных участков древесины и коры дерева, чем изосыворотки. Однако сравнительный анализ древесины иммунными и изогемагглютинирующими сыворотками показал одинаковые результаты. Что касается четвертой группы крови (АВ(IV)), то на древесине она выявлялась только изосыворотками. Группа крови на коре всех пород дерева, напротив, лучше устанавливалась изосыворотками.

Как видно из приведенных выше данных литературы, на сегодня имеется ряд модификаций способа абсорбции агглютининов, направленных на изменение условий проведения реакция и выбор подходящих количественных соотношений исследуемого пятна крови и предмета-носителя. Наряду с этим выясняется количество агглютинирующих сывороток определенного титра в зависимости от конкретных условий каждого отдельного случая. Помимо указанных, существуют и другие причины, отрицательно влияющие на реакцию абсорбции агглютининов в количественной модификации.

Выше указывалось на влияние предметов-носителей и образцов крови на реакцию абсорбции агглютининов, однако в литературе встречаются сведения, свидетельствующие о наличии зависимости данной реакции и от других факторов (фактор времени, загрязнение и др.).

М.А. Бронникова и В.П. Сибирева указывают на влияние фактора времени на абсорбционную способность разных групп крови. Так, абсорбционная способность агглютиногена О с течением времени снижается в большей степени, чем агглютиногенов А и В, а, кроме того, менее устойчива. В.Л. Сидоров (2000) в эксперименте установила, что в пятнах крови, пораженных плесневыми грибами, определение ее групповой принадлежности затруднительно. Автор отметила, что чаще всего встречаются плесневые грибки *Penicillium*, *Aspargillius*, *Chaetomium*.

Р.С. Сахаров (2002) и И.М. Потапов (2001) указывают, что определение группы крови в пятне зависит от активности используемых иммунных сывороток. В этой связи авторы рекомендуют проверять и титр, и специфичность, и часто встречающуюся специфическую активность применяемых в каждом конкретном случае сывороток.

Определенное влияние на результаты реакции абсорбции агглютининов имеют активные агглютиногены и так называемые дополнительные агглютинины. На основании этого В. И. Чарный (1958) пришел к выводу о необходимости перед определением группы крови на вещественных доказательствах проверять экспериментальные пятна крови обвиняемых и потерпевших, поскольку ошибки преимущественно связаны с наличием слабых агглютиногенов и добавочных агглютиногенов.

А.К. Серопян выявил наличие неустановленных факторов, вызывающих неспецифическую абсорбцию изогемагглютинирующих сывороток, а также отметил, что эти факторы могут влиять на стандартные эритроциты, вызывая лизис или их агглютинацию, создавая тем самым определенные преграды для определения группы крови в пятне. Возможно также влияние примеси животной крови. В этих случаях выяснение групповой принадлежности крови человека невозможно из-за неспецифического связывания агглютининов альфа и бета (Е. Н. Леонова, И.В. Власюк 2014, 2015). На групповые свойства крови в пятнах определенным образом воздействуют ультрафиолетовые лучи (Е.А. Лупинова 2007).

И, наконец, изучая влияние факторов, препятствующих определению антигенов АВО в следах реакцией абсорбции агглютининов, нельзя не остановиться на том факте, что антигены системы АВО обнаруживаются не только в крови человека (в эритроцитах, лейкоцитах, тромбоцитах), но, как упоминалось выше, в различных выделениях человеческого организма. Они также выявляются в крови и выделениях многих видов животных, высших растений, микробов, вирусов (Н. Biwasaka 1998; D. Cho, H. Kim, M. Jeon. etal. 2004; B. Eiz-Vesper, A. Seltsam, R. Blasczyk 2005; A.C. Estalote,

М. Palatnik, M.A. Chesteretal. 2003; Н.М. Михайлова и др. 2002) и могут влиять на обнаружение специфических антигенов, если в пятне крови попадают примеси этих веществ.

Таким образом, приведенные краткие данные литературы свидетельствуют, что реакция абсорбции агглютининов в количественной модификации является длительной процедурой. На результаты исследования влияют предметы-носители, на которых находятся пятна крови. Они оказывают влияние как сами по себе, так и различной природы красителями, которыми окрашены. Наряду с этим на правильные показатели реакции определенное влияние имеют вещества, с которыми смешиваются пятна крови на образцах. Изложенное вызвало необходимость усовершенствования и разработки новых модификаций с целью устранения или хотя бы уменьшения этих недостатков. Однако, к сожалению, ни один из предложенных на сегодня методов не удовлетворяет требованиям экспертизы, поскольку они неспособны устранить отрицательные влияния перечисленных выше факторов. Таким образом, разработка методов, способных устранить перечисленные недостатки и до настоящего времени остается одной из актуальных проблем судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств.

Перечисленные выше недостатки и особенно невозможность исследования объектов малого количества послужило основанием для изыскания других способов, позволяющих выявлять агглютиногены в микрочастицах материала. С этих позиций определенного внимания заслуживают реакции абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации» (М.И. Лапенков, С.В. Гуртовая, В.Ю. Александрова, Т.А. Капинос 2009).

Реакции «смешанной агглютинации», а также абсорбции-элюции предложены довольно давно, хотя долгое время их практически не применяли. Только в начале шестидесятых годов, после всестороннего изучения исследователи показали ряд преимуществ данных реакций для экспертизы следов крови, особенно в случаях, когда в распоряжении эксперта имеется малое количество материала. Если РАЭ по V. Siracusa первоначально производилась с

сывороткой группы О и имела ряд недостатков, то в настоящее время применяются агглютинины альфа и бета в отдельности (группы А и В), причем высокого титра. По мнению Л.О. Барсегянц (2005), вместо сыворотки может быть использован даже элюат, т.к. он содержит антитела определенной направленности. Практически установлена целесообразность применения РАЭ не только при малой величине объекта, когда постановка реакции абсорбции агглютининов затруднительна или невозможна, но и в случаях неблагоприятного влияния предметов-носителей.

Установлено наличие положительных результатов РАЭ при фактических отрицательных результатах реакции абсорбции агглютининов (Л.О. Барсегянц 2005). При этом в отличие от реакции абсорбции в количественной модификации проверяют не остаток непрореагировавших предварительно проверенных агглютининов, а сами агглютинины, связанные с агглютиногенами исследуемого объекта. Разница между реакциями абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации» заключается лишь в последнем их этапе. Если при постановке реакции абсорбции-элюции определяют агглютинины путем отщепления их из комплекса антиген-антитело, то в реакции «смешанной агглютинации» к комплексу добавляют эритроциты и выявляют наличие специфично связанных агглютининов.

В силу своей доступности и информативности обе указанные реакции стали широко применяться и усовершенствоваться. Однако в дальнейшем широкое практическое применение в нашей стране получила реакция абсорбция-элюции. Первая проверка возможности использования РАЭ в модификации Т. Marcinkowski для определения групповой принадлежности крови в пятнах у нас в стране произведена М.А. Бронниковой (А.Т. Яхно, В.Г. Яхно 2009). Исследуя следы крови различной давности по системе АВО, автор пришла к выводу о целесообразности применения этой реакции в практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств.

РАЭ состоит из двух фаз: абсорбции и элюции, каждая из которых, в свою очередь, состоит из нескольких последовательно

заменяющих друг друга этапов. Авторы, ставившие эту реакцию, постепенно модифицировали метод, изменяя один из этапов или обе ее фазы. Так, в РАЭ предусмотрено предварительно, для создания прочного соединения антигенов крови к предмету-носителю, закрепление антигена различными фиксирующими веществами. Однако отдельные авторы (F Yamamoto 2004) считают, что фиксация в РАЭ необязательна. Тем не менее с этим мнением нельзя согласиться, так как в мембране эритроцитов лиц выделителей (они составляют основную часть), помимо гликолипидов содержатся водорастворимые антигены, вещества гликопротеиновой природы (K Takahama 1993; 1996). Следовательно, нефиксированные на предмете-носителе эти антигены при промывании физиологическим раствором могут быть легко уничтожены. Правда, иногда следы крови на вещественных доказательствах могут подвергаться воздействию высокой температуры, прямых солнечных лучей и пр., т.е. без вмешательства исследователя антигены фиксируются на предмете-носителе. К сожалению, как правило, эти факторы эксперту неизвестны, в связи с чем предварительное закрепление антигенов на предмете-носителе обязательно. Подавляющее большинство исследователей придерживается этого взгляда и предлагает для этой цели различные фиксирующие материалы. Так, например, S. Kind рекомендует кипячение в буферном растворе Мак Ильвена (pH=7,4), R. Coombs, B. Dodd – формалин или этиловый спирт, A. Fiori et al. – метиловый спирт (K. Virkler, I. K. Lednev 2009).

Одним из важных этапов РАЭ являются время и условия взаимодействия агглютиногена с агглютинином. V. Siracusa абсорбцию изоантител производил при температуре 4<sup>0</sup> в течение 12-20 часов. Такие же условия считает приемлемыми R. Rieben, (1999), тогда как S. Kind предлагает двухчасовую экспозицию при комнатной температуре и дополнительно в течение 30 мин. – при температуре 5<sup>0</sup>. L. Nickols, M. Pereira (1997) инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. S. Jada (1962) считает достаточным одночасовой контакт пятна с сывороткой при 37<sup>0</sup> абсорбцию сывороточных антител производил в течение 30 мин. при температуре 4<sup>0</sup>. А.

Fiorietal. предложили производить абсорбцию на протяжении 12 часов при 4<sup>0</sup>. По мнению М.С. Свирского оптимальным сроком абсорбции является 24-часовая экспозиция при 4<sup>0</sup>.

Следовательно, окончательных оптимальных температурных условий для постановки реакции до сих пор не выработано. То же относится и к количественному соотношению сывороток и объекта. В частности, А.К. Туманов считает целесообразным соотношение 0,05 мл сыворотки на одну ниточку пятна крови длиной 4-5 мм при титре стандартных сывороток не менее 1:128. Автор установил, что при этом происходит более четкая агглютинация стандартных эритроцитов. D.Zubakov, E.Hanecamp, M.Kokshoornetal. (2008) считает достаточным титр сыворотки 1:64 – 1:32.

Наиболее важным и в то время трудоемким этапом реакции абсорбции-элюции является отмывание неспецифически связанных агглютининов. L. Nickols, M. Pereira указывают, что недостаточное отмывание материала влечет за собой неспецифические результаты и, наоборот, в результате слишком тщательного отмывания чувствительность метода понижается (M. L.Uchimoto, E.Beasley, N.Coultetal. 2013).

Вторая фаза реакции абсорбции-элюции начинается с процесса элюции, который происходит только при воздействии на комплекс элюирующего фактора. Все авторы предлагают в основном нагревание при определенной температуре, которое нарушает связи антигена с антителом и обеспечивает выхождение ранее абсорбированных антител в окружающую жидкость (физиологический раствор). Y. ASeo(1992) предлагают элюирование ксиленом, имеющим высокую активность и вполне способным заменить тепловую элюцию. Далее, путем добавления эритроцитарных взвесей определяются агглютинины. Для этой цели Y. ASeo (1994) предложил использовать 2%, R. Coombs, B. Dodd – 1%, L. Nickols, M. Pereira и A. Fiorietal. – 0,5-1% эритроцитов в 1,0% бычьим альбумине, а М.А. Бронникова – 0,75%. М. Ш. Колиш и Г.Н. Семенова для повышения чувствительности реакции абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации» рекомендует производить

элюцию на предметных стеклах во взвеси эритроцитов, приготовленной на кроличьей сыворотке в разведении 1:100 с физиологическим раствором хлористого натрия (А. В. Коноваленко, В. Л. Сидоров, О. Д. Ягмуров 2015).

Из приведенных данных видно, что на всех этапах РАЭ, начиная от подготовки материала и кончая фазой элюции, предложен ряд модификаций, хотя, в принципе, техника постановки данной реакции практически не изменяется. Проверочные исследования авторов (Р.С. Сахаров, М.Ф. Федулова и др 1998.) показали возможность использования РАЭ и ее перспективность для дальнейшего широкого применения в практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. В настоящее время приемлемым вариантом данной реакции считают предложенный НИИ судебной медицины.

Кроме изосерологической системы АВО проверяются в настоящее время для идентификации пятен крови и другие системы, что чрезвычайно важно в уголовных делах при расследовании ряда преступлений (Н.М. Михайлова 2002; 2003; Н.В. Минеева 2003).

Внедрение в судебно-медицинскую практику других изосерологических систем приобретает большое значение с позиций более широкого решения вопроса возможности уточнения принадлежности пятен крови тому или иному лицу, либо, наоборот, исключения принадлежности ее тому или иному человеку.

В 1936-1940 гг. П.Н. Косяков и Г.П. Трибулев впервые предложили определение в пятнах крови антигенов MN. М.А. Бронникова упростив данный способ, использовала его при определении типов крови в засохших пятнах (Т. Е. Чукавина, С. В. Гуртовая, А. Д. Рамишвили 2006). Возможность использования реакции абсорбции агглютининов для определения типовой принадлежности в следах подтвердили исследования Р.С. Сахаров, М.В. Федулова (1999), Р.С. Сахаров и др (1998), Л.О. Барсегянц (2005) и др.

З.Ф. Васильева разработала методику обнаружения в пятнах крови резус-антигена. Параллельно с появлением новых систем крови, проводились и попытки их определения в пятнах. Поэтому,

если давность использования реакции абсорбции в количественной модификации для определения других систем крови (кроме системы АВО) в следах превышает полвека, то успешное применение реакции абсорбции-элюции начинается с 1960 года, когда S. Kind предложил модификацию своего метода обнаружения антигенов АВО. R.Coombs, B. Dodd опубликовали эту методику и в дальнейшем A. Fiorietal. и др. модифицировали ее (E.K.Hanson, H.Lubenow, J.Ballantyne 2009).

Одновременно с определением антигенов системы АВО появились сообщения о возможности успешного применения РАЭ для определения типов крови MN, резус, P, D, Лафактора и др. (Hurley I. P., Cook R., Laughton C. W. et al, 2009; Illes MR, Carter AL, Laturus PL, Yamashita AB, 2005; J.Mather 2002; Akane A, Mizukame H, Shiono H 2000; Т. Е. Чукавина, С. В. Гуртовая, А. Д. Рамишвили и др 2006).

M.C.Fernandez-Jimenez, M.T.Jimenez-Marco, D.Hernandezetal (2000) реакцией абсорбции агглютининов установил возможность обнаружения агглютинина P в пятнах крови, расположенных на льняном полотне давностью 48 часов. Исследование следов крови, расположенных на других предметах-носителях (шерстяные и шелковые ткани, стекло), агглютиногена P не обнаружило. Однако дальнейшие исследования других авторов показали возможность обнаружения этого агглютиногена и в более старых пятнах. Так, D.F.McDonald, J.M.Thompson, J.A.Lowe (1996), проверяя пятна крови на различных предметах-носителях, обнаруживал агглютиноген P в следах давностью до 4 месяцев. Автор пришел к выводу, что результаты исследования зависят от степени устойчивости агглютиногена P. Сильно выраженный агглютиноген P может выявляться в следах давностью до 4 месяцев, а слабые – не определяются даже в пятнах крови месячной давности. V. Schung удалось установить влияние предметов-носителей на ход реакции, а именно: неспецифическое связывание агглютинина свиной сыворотки анти-P, что относят за счет влияния красителей текстильных тканей. Причем при воздействии на пятно прямых солнечных лучей агглютиноген P не обнаруживается.



М.А. Бронникова с соавт. подтвердили результаты V. Schung, получив положительные результаты в исследованиях сильно выраженного агглютиногена Р в пятнах крови 3-месячной давности, загрязненных различными веществами. При этом авторы использовали нормальную человеческую сыворотку анти-Р. Позднее М.А. Бронникова и Т.М. Масис, используя сыворотку животных, установили агглютиноген Р в пятнах крови давностью от 1 месяца до 2 и более лет. Это позволило сделать вывод, что абсорбционная способность агглютинина анти-Р крови зависит от происхождения сывороток анти-Р (от человека или животного).

Для обнаружения агглютинина Р в следах крови Н.В.Минеева (2004) применяла гетероиммунную сыворотку анти-Р. Причем давность пятен, температура окружающей среды, дневной свет и другие факторы не влияли на обнаружение агглютиногена Р.М.Ф. Верещака проверяла фактор Р в пятнах крови реакцией абсорбции в количественной модификации, а также РАЭ в модификации А. Fiorietal. и доказала возможность выявления данного фактора даже в пятнах гнилостно-измененной крови (В. И.Петров, Н. В.Пантелеева, В. И.Мурзич 2018).

Для определения агглютиногена Р при помощи РАЭ М.С. Свирский проверил абсорбционную способность козьей эхинококковой сыворотки анти-Р, подвергавшейся воздействию высокой температуры. При воздействии  $40^{\circ}$  в течение одного часа антиген Р хорошо определяется, а по мере увеличения времени сила антигена снижается, а при воздействии  $110^{\circ}$  в течение 3 часов антиген Р в высохших пятнах не определяется. Испытание некоторых органических и неорганических растворителей показало, что воздействие эфира в течение 1-2 часов не препятствовало выявлению антигена Р (С.В. Гуртова 2005).

Использование реакции абсорбции агглютининов для обнаружения Льюис-принадлежности связана с производством сывороток анти- $Le^a$  и  $Le^b$ . В нашей стране такие сыворотки впервые были получены Cooling L., GuY (2003).

М.А. Бронникова установила возможность обнаружения агглютиногена Келл реакцией абсорбции агглютининов (Н.М.Михайлова, Н.И.Васильев 2002; С.И.Донсков, И.В.Дубинкин, Т.М. Пискунова 2000). Ruffie, Ducos исследуя пятна крови однодневной давности, выявили агглютиноген  $Fy(a+)$ , используя для этой цели сыворотку с антителами типа крипто-агглютиноидов. Т.М. Масис подтвердила возможность обнаружения этого агглютиногена в следах крови методом, разработанным М.А. Бронниковой (D.A.Colligan, A.Mackie, R.H.Fraser 2000). Чувствительность и надежность РАЭ позволили использовать его для выявления антигенов других систем (Н.М. Михайлова, Н. И. Васильев 2002). М.Ф. Верещака предлагает РАЭ для последовательного обнаружения антигенов А, В, Н, Р и S в одной вырезке из пятна. Для этого рекомендует сначала выявить антиген S, после него Р и затем последовательно А, В и Н. Г.С. Юдина с успехом использовала РАЭ для одновременного определения антигенов М, N, А и В.

Исследование крови человека в засохших пятнах производится не только обнаружением агглютиногенов эритроцитарной, но и сывороточной системы. За последние годы исследования в этом направлении приняли особо широкий размах. Изучение белковых компонентов сыворотки разных людей показало полиморфизм их липопротеинов и ферментов крови. Широкое применение при экспертизе в делах о спорном отцовстве, материнстве и замене детей нашли сывороточные системы. Однако количество определяемых антигенов этой системы при экспертизе следов крови незначительно. Возможно, это связано с отсутствием иммунных сывороток высокого титра.

РАЭ используется и для определения антигенов АВО в мышцах, костях трупов, в волосах. Кроме того, РАЭ применяли с целью дифференциации антигенов в смешанных пятнах, например в пятнах крови и спермы и другими выделениями человеческого организма. Разделение основывается на различной чувствительности отдельных антигенов к определенным температурным условиям, химическим

растворителям и на распределении антигенов выделений при электрофорезе (Г.П. Колоколова 2006).

Наряду с большими возможностями использования РАЭ в силу ее высокой чувствительности отмечаются и некоторые ее недостатки, такие как трудоемкость выполнения, особенно процедуры промывания неспецифически связанных агглютининов, возможность смывания комплекса антиген-антитело с предмета-носителя и др.

А.К. Серопян указывает на возможность возникновения ложного результата реакции абсорбции-элюции за счет влияния собственных агглютининов пятен крови. Т.М. Масис приводит случаи влияния на РАЭ собственных агглютининов крови. Данные автора свидетельствуют о том, что в некоторых образцах крови встречаются агглютинины очень высокого титра, способные давать ложные результаты при исследовании как изолированных пятен или образцов крови, так и смешанных пятен крови (от 2 и более лиц). Из приведенных выше данных видно, что для определения группы крови АВО в следах в судебно-медицинских лабораториях пользуются в основном реакцией абсорбции агглютининов в количественной модификации и РАЭ.

Параллельно с РАЭ была предложена реакция «смешанной агглютинации». Однако у нас в стране, как указывает А.С. Гаркави, реакция «смешанной агглютинации» нашла применение в научно-исследовательских работах. Как упоминалось выше, все перечисленные методы имеют ряд недостатков, а именно: влияние предметов-носителей на результаты исследования, технически трудное выполнение, потребность в большом количестве лабораторной посуды, влияние загрязняющих факторов, вызывающих неспецифическую абсорбцию, трудность промывания неспецифически связанных агглютининов (при РАЭ) или возможность вымывания комплекса антигена-антитело, влияние на реакцию абсорбции-элюции собственных агглютининов крови и др (Лапенков М.И., Гуртовая С.В., Александрова В.Ю. Капинос Т.А. 2009).

Так, например, K. Landsteiner, D. Witt, G. Faraone, B. Dodd, G. Bird, R. Owen, S. Kind, L. Nickols, M. Pereira, определяя группу крови

в пятнах реакцией абсорбции агглютининов и РАЭ, получали неспецифические результаты (G.Garratty, S.A.Glynn, R.McEntire 2004). В этой связи стремление судебных медиков разработать способы, позволяющие устранить эти недостатки не прекращаются как в нашей стране, так и за рубежом.

В настоящее время предложены различные способы, в которых делаются попытки устранения перечисленных недостатков. Одни из них направлены на повышение титра исследуемых антител или активности антигенов, другие – на изменение техники реакции определения антигенов.

H. D. Hogward, P. D. Martin для определения группы крови в пятнах применяли модификацию реакции смешанной агглютинации, вводя в нее объекты исследования (ниточки), приклеенные к ацетатцеллюлозной пленке.

I. Ichiyama, T. Okada объекты исследования приклеивали к предметному стеклу двусторонней клейкой лентой и после фиксации объекта (на ленте) добавляли иммунные сыворотки анти-А или анти-В в титре 1:512 – 1:1024. Через 15 минут неспецифические антитела удаляли, помещая препараты в сосуд с физиологическим раствором. Физ. раствор меняли 3-5 раз. Затем к объектам исследования добавляли 2-3 капли 5% взвеси стандартных эритроцитов и предметные стекла с закрепленными на ленте объектами, переворачивая, клали на подставки в чашки Петри с физиологическим раствором, где оставляли препарат на 15 минут, после чего микроскопировали его и читали реакцию (F.Yamamoto 2004).

С целью повышения титра исследуемых антител Р.С. Сахаров предлагает добавлять к изогемагглютинирующим сывороткам протеолин, что, по мнению автора, позволяет выявлять слабые антигены. R. Varbel установил, что титр гемагглютининов в криопреципитате повышается в большей степени, чем в исходной плазме. В настоящее время для определения групповой принадлежности крови в следах стали широко применять метод иммунофлюоресценции, разработанной А.Н. Coonsetal. Метод основан на использовании явления люминесценции для индикации

реакции антиген-антитело, происходящей на поверхности клеток или срезов тканей. Он высокочувствителен и специфичен. Применяется в медицине при различных исследованиях. Так, например, В.Д. Jankowic, J. Whitakeretal. этим методом определяли групповую принадлежность эритроцитов по системе АВО; L. Glynn, E. Holbogow– изучали возможность определения антигенов АВО в тканях и органах человеческого организма (А.Н. Lee, М.Е. Reid 2000).

Е. Holbogowetal используя метод иммунофлюоресценции в эксперименте, пришли к выводу, что по своей чувствительности он не уступает реакции смешанной агглютинации. Его преимуществом является возможность определения антигенов в изолированных клетках, что трудно, а в ряде случаев невозможно выполнить реакциями абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации». Подгруппу антигена А можно дифференцировать по интенсивности флюоресценции. Кроме того, метод иммунофлюоресценции позволяет определить не только антигены, но также их локализацию в клетках (В.Л. Сидоров 2000.). Следует однако отметить, что, несмотря на несомненные достоинства, технически трудное его выполнение и дефицит реагентов для его постановки несколько ограничивают возможности его использования. Тем не менее исследования, проведенные рядом авторов, дали весьма обнадеживающие результаты. Так, например, А.А. Давыдов с соавт. для выявления антигенов А и Вв помарках крови использовали метод иммунофлюоресценции и установили возможность обнаружения их в пятнах и помарках крови на различных материалах. В.П. Ольховик разработал методику иммунофлюоресцентного определения видовой и групповой принадлежности пятен крови. А.П. Загрядская и А.Л. Федоровцев для определения видовой и групповой принадлежности изолированных клеток предлагают метод иммунофлюоресценции (Т.Н. Шамонова 2004; В.Л. Сидоров 2000).

Т. Inoue, К. Okada исследуя этим методом пятна крови, слюны, спермы, пота и влагалищного выделения, получили положительные результаты. Авторы указывают, что иммунофлюоресценция более чувствительна, чем реакция абсорбции-элюции, хотя и требует

большей затраты времени. Недостатком метода, по их мнению, является трудность его использования в предметах со старыми следами, подвергавшимися воздействию внешних факторов (К. AHamada 2002). Кроме того, при хранении сывороток нарушается связь между флюоресцирующими веществами и антителами, что может влиять на достоверность реакций. Группоспецифические антигены системы АВО в сперматозоидах методом иммунофлюоресценции были обнаружены также Т.В. Стегневой (1999).

С целью отыскания соответствующих реагентов отечественного производства и установления оптимальных условий использования данного метода для выявления антигенов системы АВО, в изолированных клетках и высохших следах крови исследования продолжались. Так, В.П. Ольховик в эксперименте установил возможность использования флюоресцирующих сывороток мечеными флюоресцирующими красителями отечественного производства. Оптимальным вариантом автор считает исследование изолированных клеток, лежащих в один слой. При наличии скопления клеток оценка результатов несколько усложняется из-за нечеткости их границ. В последующих исследованиях, применив иммунофлюоресценцию, В.П. Ольховик определил антигены системы Льюис в следах крови (V.Katamatic, J.Poole, J.Banksetal 2004).

В последнее время появились сообщения о возможности определения групповой принадлежности при помощи агглютинации частиц латекса. Сущность способа заключается в следующем: слюну гомогенизируют и смешивают с обычным альбумином, глициновым буфером (рН=3,5) и частицами латекса. При этом агглютиногены соединяются с частицами латекса. При добавлении анти-А, анти-В и анти-Н агглютининов к слюне с частицами латекса при соответствии их наблюдается агглютинация латекса Е.Рас-Вобола для определения группоспецифических компонентов крови прибегала к геле-электрофорезу (М.И.Лапенков, С.В.Гуртовая, В.Ю. Александрова Т.А.Капинос 2009).

Следует указать, что во всех указанных модификациях метода абсорбции агглютининов и реакций абсорбции-элюции, а также «смешанной агглютинации» сущность их оставалась неизменной. Модификация ограничивалась видоизменением экспозиции абсорбции, температурного режима, количества ингредиентов и т. д. В этой связи проблема поиска оптимальных методов определения групповых систем крови и на сегодня остается актуальной. Внедрение в практику судебно-медицинской экспертизы таких методов как электрофоретический, гель-диффузионный, спектрофотометрический, хроматографический и др. открыло новые возможности серологической дифференциации. Они способствовали расширению, обогащению способов выявления антигенов сывороточных, лейкоцитарных, эритроцитарных, ферментных и других систем.

В литературе за последнее 30-40 лет имеются работы об использовании хроматографического определения агглютининов и агглютиногенов крови (Д.Д. Джалалов, Б.С. Абдуллаев 1982, 1984).

Перечисленные авторы определяли агглютинины и агглютиногены в жидкой крови. Принцип метода заключается в иммобилизации агглютиногенов на лиганде с последующим определением путем биоспецифической адсорбции одноименных агглютининов и, наоборот, при иммобилизации агглютининов выявляется агглютиноген.

Эти методы, на наш взгляд, весьма перспективны и требуют дальнейшей разработки.

## ГЛАВА II. ОБНАРУЖЕНИЕ АГГЛЮТИНОГЕНОВ СИСТЕМЫ АВО МЕТОДОМ АБСОРБЦИИ-ЭЛЮЦИИ В СЛЕДАХ КРОВИ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ

### Характеристика исследуемого материала

В соответствии с постановленными задачами проводились анализ исследования пятен крови с различными сроками давности и измененных под воздействием ряда внешних факторов.

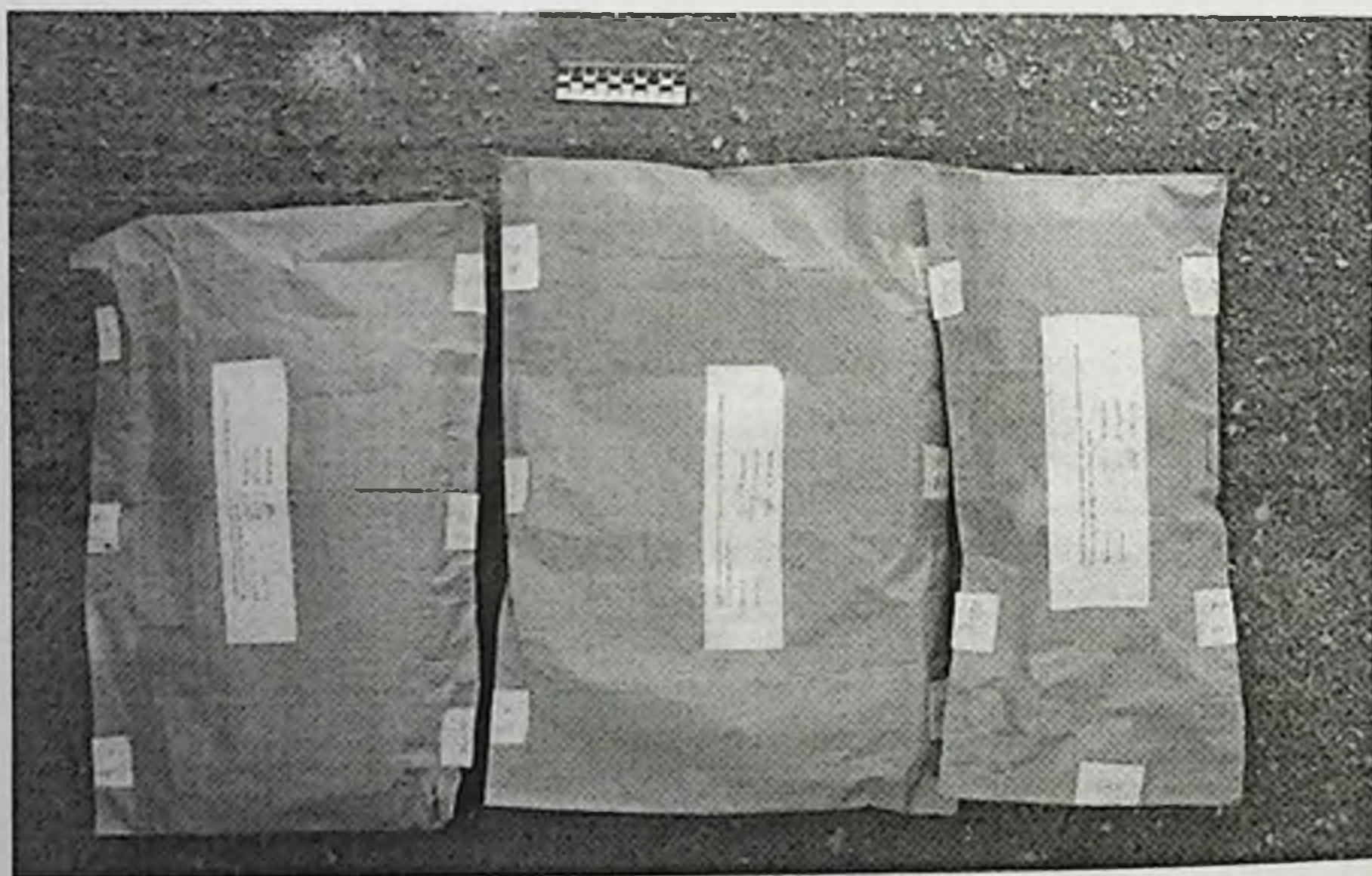
Таблица I.

### *Характер и объем проведенных исследований*

№	Проведенные исследования	Количество объектов
1	Установление возможности определения группы крови в следах, подвергшихся восходящей хроматография	50
2	Исследование микроследов крови методом радиарной микрохроматографии	106
3	Исследование следов крови, загрязненных некоторыми горючими и смазочными веществами	62
4	Исследование следов крови, загрязненных некоторыми сыпучими веществами	48
5	Исследование пятен крови, подвергшихся гниению и стирке моющими средствами	64
6	Исследование пятен крови, подвергшихся воздействию солнечных лучей и высокой температуры	104
7	Исследование пятен крови, расположенных на различных текстильных тканях	40
8	Установление возможности определения группы крови в следах методом аффинной хроматография	182
9	Определение группы крови аффинной хроматографией в следах крови, расположенных на различных текстильных тканях	40
10	Определение группы крови аффинной хроматографией в пятнах крови, смешанных с выделениями человеческого организма	192
11	Исследование метода аффинной хроматографии на материалах экспертизы	63



Следы крови готовили на индифферентном предмете-носителе – чистой (стерильной) марле и фильтровальной бумаге. Для приготовления экспериментальных пятен жидкую кровь наносили равномерно на заранее приготовленные кусочки марли размером 3x4 см или на такого же размера чистую фильтровальную бумагу, помещенную на гладкую поверхность (стекло). Приготовленные таким образом следы крови высушивали при комнатной температуре (без доступа прямых солнечных лучей). На фильтровальной бумаге в верхней части отмечали наименование предмета-носителя, номер пятна и дату его приготовления, а на марлю – приклеивали ярлычок с теми же данными. Наряду с приготовленными нами экспериментальными пятнами исследовали архивный материал (готовые пятна крови на марле).



*Рис. 1. Объекты исследования для судебной медицинской экспертизы.*

Всего исследован 951 образец крови с различными групповыми свойствами. Давность исследуемых пятен варьировала от 2 дней до 10 лет.

Об объеме проведенных исследований можно судить по данным, суммированным в таблице I.

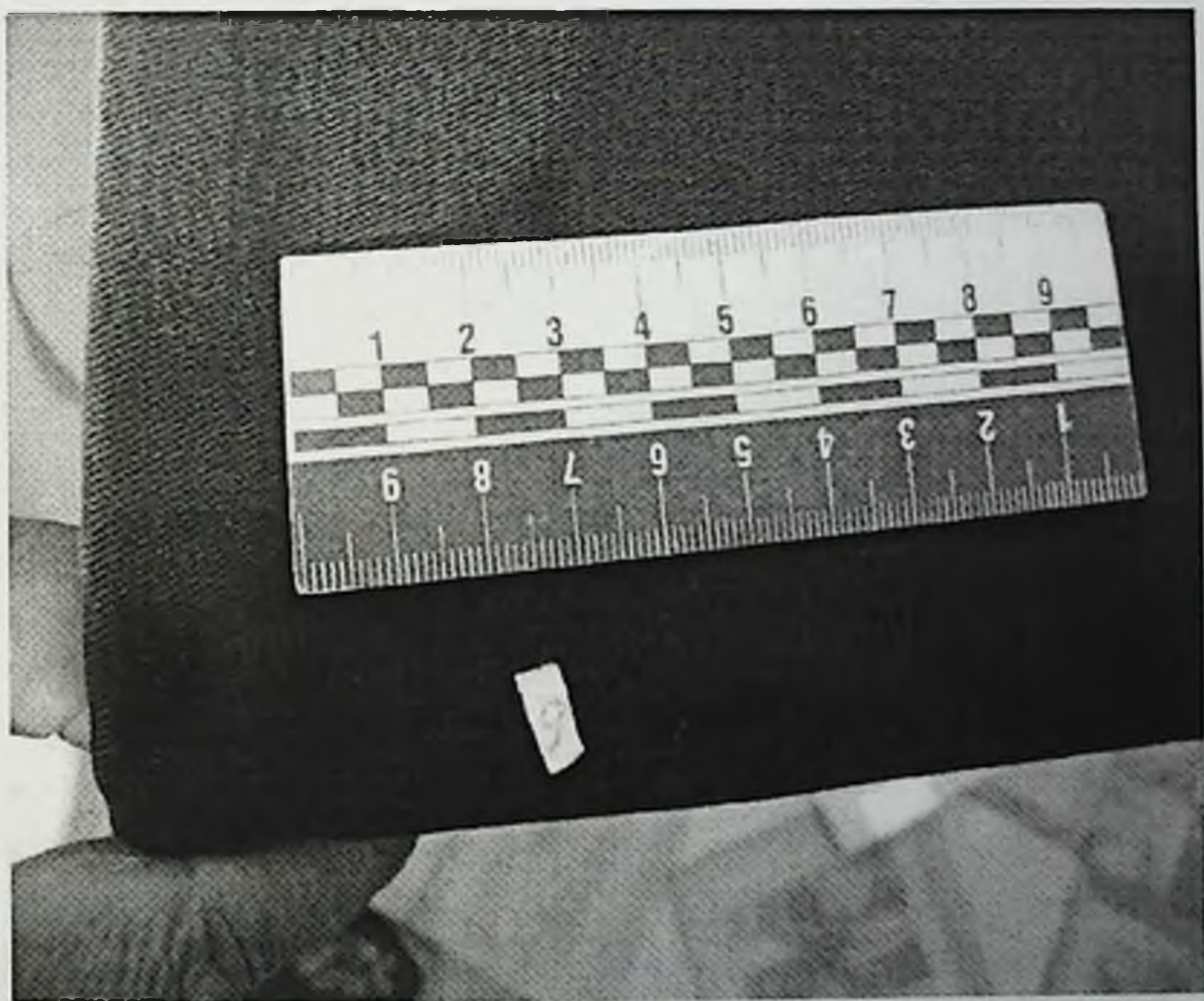
Подробная характеристика использованных в эксперименте материалов будет изложена в соответствующих разделах.

### Установление возможности определения группы крови в следах, подвергшихся восходящей хроматографии

Для определения наличия крови в следах широко используется хроматография, особенно метод хроматографии на бумаге, как наиболее экономичный, высокочувствительный и доступный метод.

Применение метода хроматографии на бумаге для установления наличия крови в следах показало ряд его преимуществ перед другими методами, особенно в случаях исследования пятен крови, загрязненных и измененных под действием ряда внешних факторов.

Как упоминалось выше, для определения групповой принадлежности крови в следах предложен ряд модификаций реакций абсорбции агглютининов, абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации».

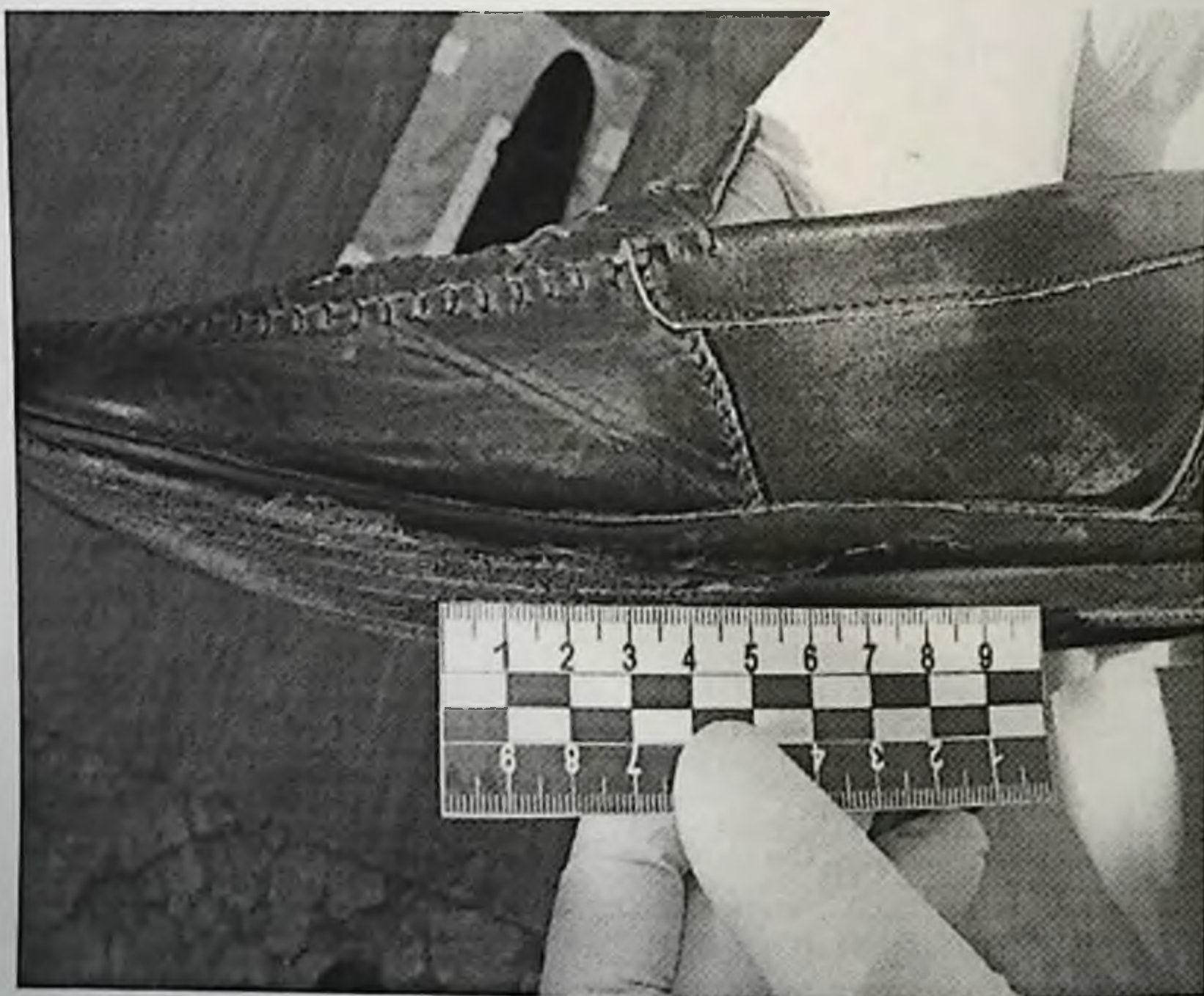


*Рис. 2. Следов крови, загрязненных некоторыми горючими и смазочными веществами.*

В большинстве случаев определение группы крови в пятнах не представляет затруднений, однако иногда, из-за наличия маленького пятна, когда весь материал уходит на определение наличия и видовой принадлежности крови, для дальнейших исследований материала не остается.

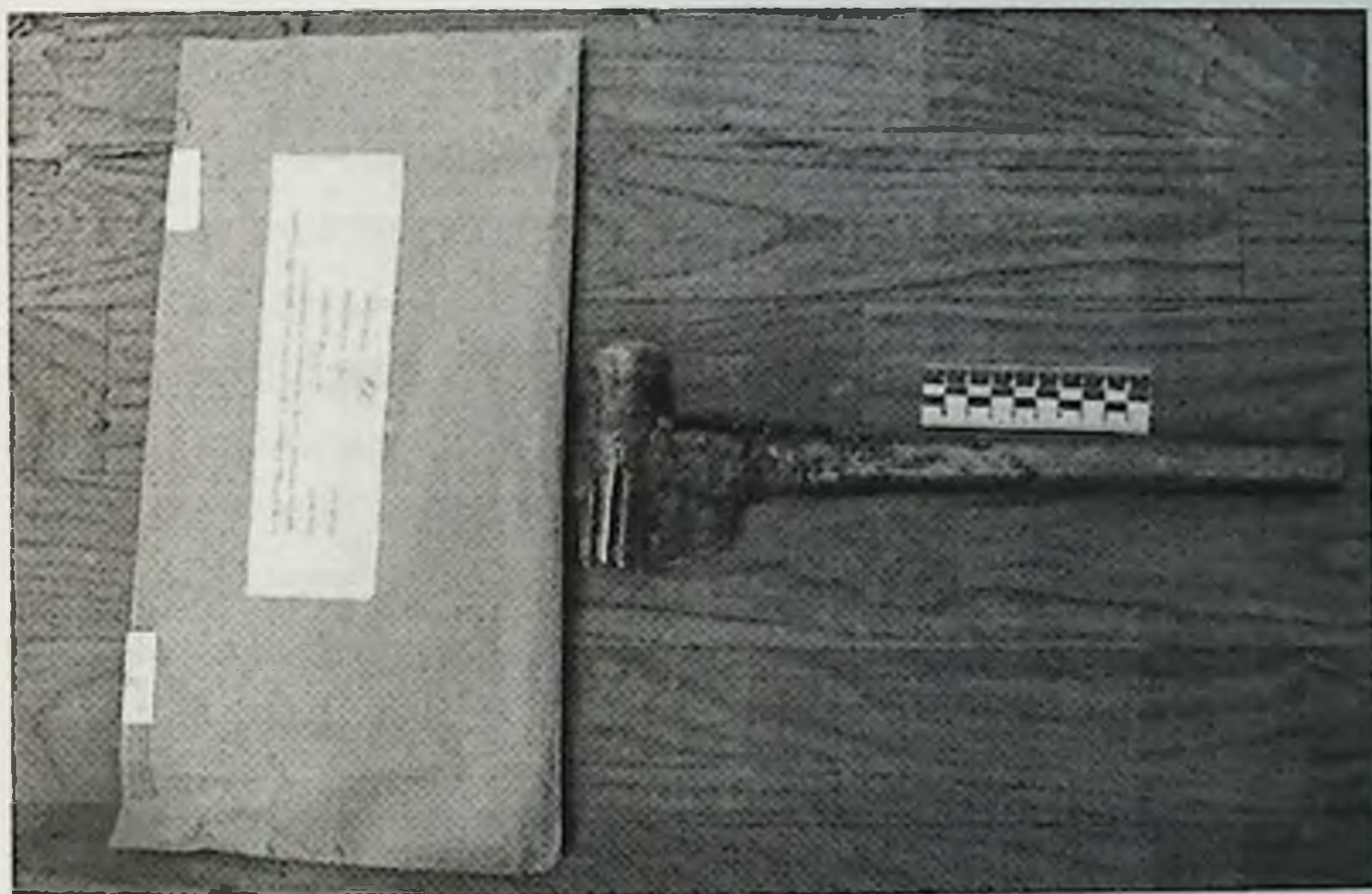
Авторам было разработано метод, позволяющий определять группу крови в ниточках из пятен, в которых предварительно, методом хроматографии на бумаге, установлено наличие крови.

Их внимание привлекло то обстоятельство, что в реакции абсорбции-элюции для фиксации материала используется метиловый спирт. Для определения наличия крови в пятнах хроматографией на бумаге в качестве растворителя также используются спирты (бутанол и аммиак). Следовательно, растворитель не только способствует растворению пигмента с последующим образованием зоны гемина, но и фиксирует группоспецифические белки крови на предмет-носителе.



*Рис. 3. Следов крови, загрязненных некоторыми горючими и смазочными веществами.*

Выяснение этих особенностей растворителя (бутанол-аммиак) предопределила возможность обнаружения антигенов в пятнах, ранее использованных для других исследований. Таким образом решается вопрос определения наличия и группы крови в одном и том же материале, т.е. создание предпосылки для получения максимума сведений из минимального количества материала. Такая постановка вопроса в практике судебно-медицинского исследования вещественных доказательств имеет большое значение, поскольку нередко из-за наличия малого пятна крови, как указывалось выше, идентификация личности ограничена. Для этого в первую очередь представлялось необходимым выяснить, пригоден ли материал пятна, предварительно использованный для определения наличия крови методом хроматографии на бумаге, для выявления в нем агглютиногенов РАЭ.



*Рис. 4. Следов крови, загрязненных некоторыми сыпучими веществами.*

Для решения этого вопроса наличие крови в пятнах определяли при помощи хроматографии на бумаге по методике, предложенной в Методической рекомендации «Об установлении наличия спермы и крови методом хроматографии на бумаге» Бюро Главной Судмедэкспертизы Минздрава. Для получения четких результатов

при определении антигенов крови в хроматографированных вырезках, предварительно было установлено оптимальное соотношение растворителя – бутанол-аммиака.

С этой целью исследовали 10 экспериментальных пятен с различными групповыми свойствами. С момента приготовления пятна на индифферентном предмете-носителе (чистая марля) до начала исследования проходило от 2 до 5 дней. Хроматографирование осуществлялось при различных соотношениях растворителя бутанол-аммиак, а затем в этих же вырезках при помощи РАЭ определялась их групповая принадлежность. Результаты этих опытов представлены в таблице 2.

Таблица 2.

*Зависимость результатов реакции абсорбции-элюции в хроматографированных образцах от соотношения бутанол-аммиака*

№	Соотношение растворителя (бутанол:аммиак)	Результаты хроматографии	Результаты РАЭ			
			+++	++	+	-
1	1:9	-	1	4	5	-
2	2:8	-	2	5	3	-
3	3:7	+	1	3	6	-
4	4:6	+	2	4	4	-
5	5:5	+	4	3	3	-
6	6:4	+	5	3	2	-
7	7:3	+	6	3	1	-
8	8:2	-	7	2	1	-
9	9:1	-	7	2	1	-

Как видно из таблицы, результаты РАЭ зависят от соотношения, применяемого растворителя – бутанол-аммиака. При большей концентрации аммиака по сравнению с бутанолом число положительных результатов уменьшается. Следует отметить, что для хроматографического определения наличия крови при увеличении

количества бутанола сравнительно с аммиаком интенсивность окрашивания зоны пигмента на хроматограмме уменьшается.

Оптимальные результаты реакции абсорбции-элюции получены при использовании растворителя бутанол-аммиака в соотношении 6:4 и 7:3.

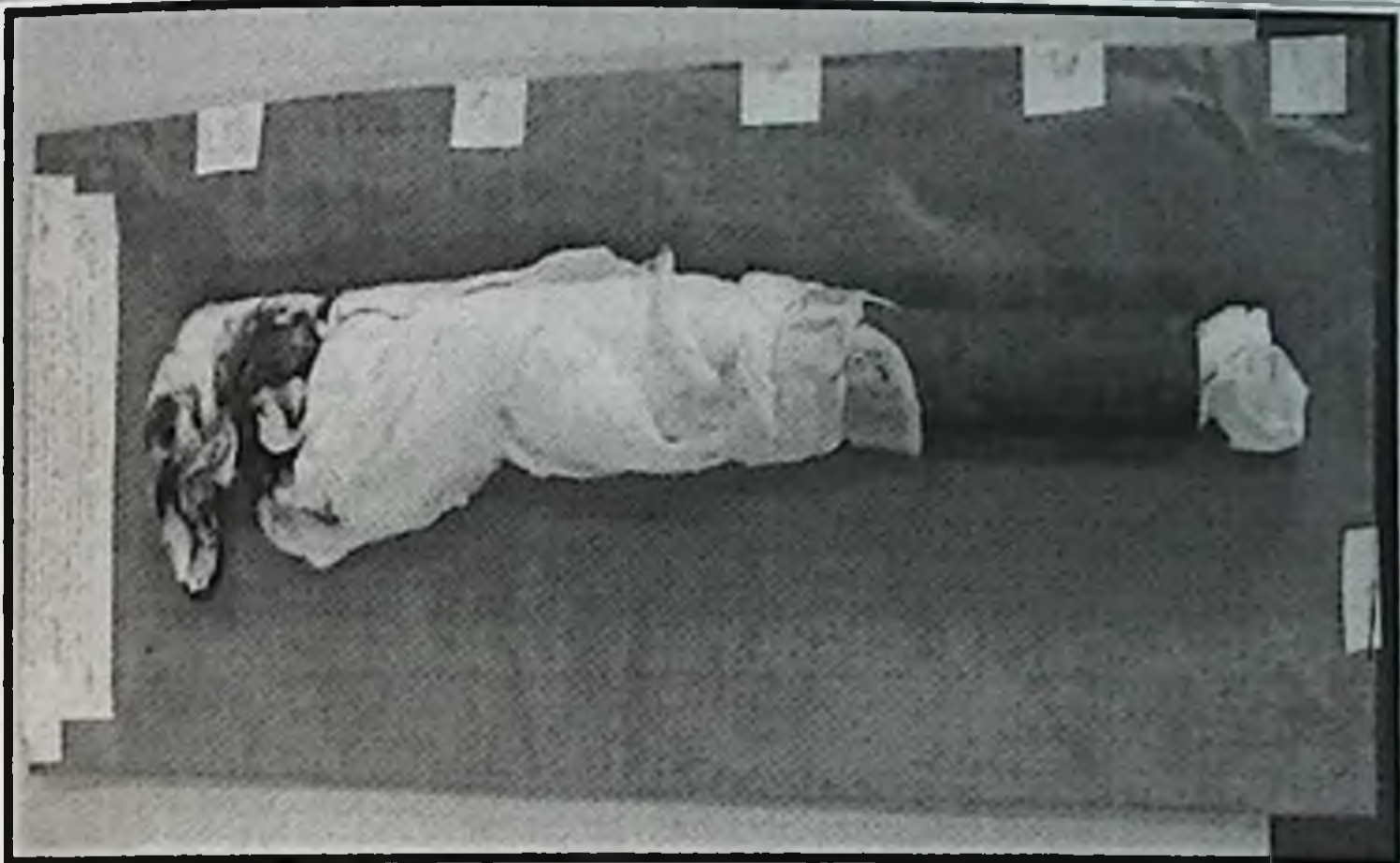
Последовательное определение наличия и групповой принадлежности крови в одном и том же пятне проводили по следующей методике: хроматографическую бумагу марок Б или М разрезали на листы в соответствии с размером камеры. Простым карандашом размечали на ней полосы шириной 2 см. Полосы нумеровали. На расстоянии 2 см от нижнего края листа обозначали линию старта. По обе стороны линии старта на каждой полосе делали параллельные разрезы. Из исследуемых пятен и контрольных участков предметов-носителей делали вырезки и вставляли их в надрезы пронумерованных полосок хроматографической бумаги. Хроматографическую бумагу с объектами исследования закрепляли в бумагодержателе и помещали в хроматографическую камеру таким образом, чтобы нижний конец листа соприкасался с налитым на дно камеры растворителем. Когда фронт растворителя в силу капиллярности доходил до верхнего конца листа, бумагу с объектами исследования извлекали и, отметив простым карандашом линию фронта растворителя, высушивали при комнатной температуре.

Если в объекте исследования содержалась кровь, то на полосе бумаги, у линии старта, еще до проявления, появлялась зона желтовато-красного цвета.

После высыхания хроматограмм, объекты исследования снимали с полосок, а хроматографическую бумагу проявляли путем обработки 0,1% раствором основного бензидина в хлороформе и 3% растворе перекиси водорода. При этом зона пигмента крови окрашивалась в интенсивный синий цвет. При погружении бумаги под проточную воду зона приобретала стойкий коричнево-красный оттенок.



*Рис. 5. Пятен крови, подвергшихся воздействию солнечных лучей и высокой температуры.*



*Рис. 6. Пятен крови, подвергшихся гниению и стирке моющими средствами.*

Снятые с полосок хроматографической бумаги объекты исследования разрезали на три равные части и помещали по отдельности в три ряда одинаковых пробирок. Пробирки нумеровали, как и полоски хроматографической бумаги. В один ряд пробирок добавляли сыворотку альфа, в другой ряд – сыворотку бета и в третий ряд – лактин анти-Н. Пробирки закрывали ватными пробками и оставляли для абсорбции на 18 часов при температуре  $4^{\circ}$ . Затем исследуемые объекты помещали на фильтровальную бумагу и отсушивали чистой фильтровальной бумагой. Далее объекты исследования помещали в ряд специальных лунок-пластинок, заливали в избытке ледяным физиологическим раствором и интенсивно промывали путем продувания воздуха в течение 25-30 секунд, а затем отсушивали фильтровальной бумагой и переносили в ряд других лунок, после чего промывание повторяли. После промывания производили пробу на чистоту промывания. При отрицательном результате пробы на чистоту промывания объекты исследования переносили в агглютинационные пробирки. Для осуществления элюции в каждую пробирку добавляли по 2 капли физиологического раствора и помещали их в термостат при температуре  $54-56^{\circ}$  на 20 минут. Затем в элюаты ряда пробирок «альфа» добавляли соответственно по 1 капле 1% взвеси стандартных эритроцитов группы А, в элюаты ряда пробирок «бета» - по 1 капле



1% взвеси стандартных эритроцитов группы В, в элюаты пробирок ряда Н – соответственно эритроциты группы О. Смесь центрифугировали со скоростью 1000-2000 об./мин. в течение 4 минут, затем пробирки осторожно встряхивали и производили учет результатов макро- и микроскопически.

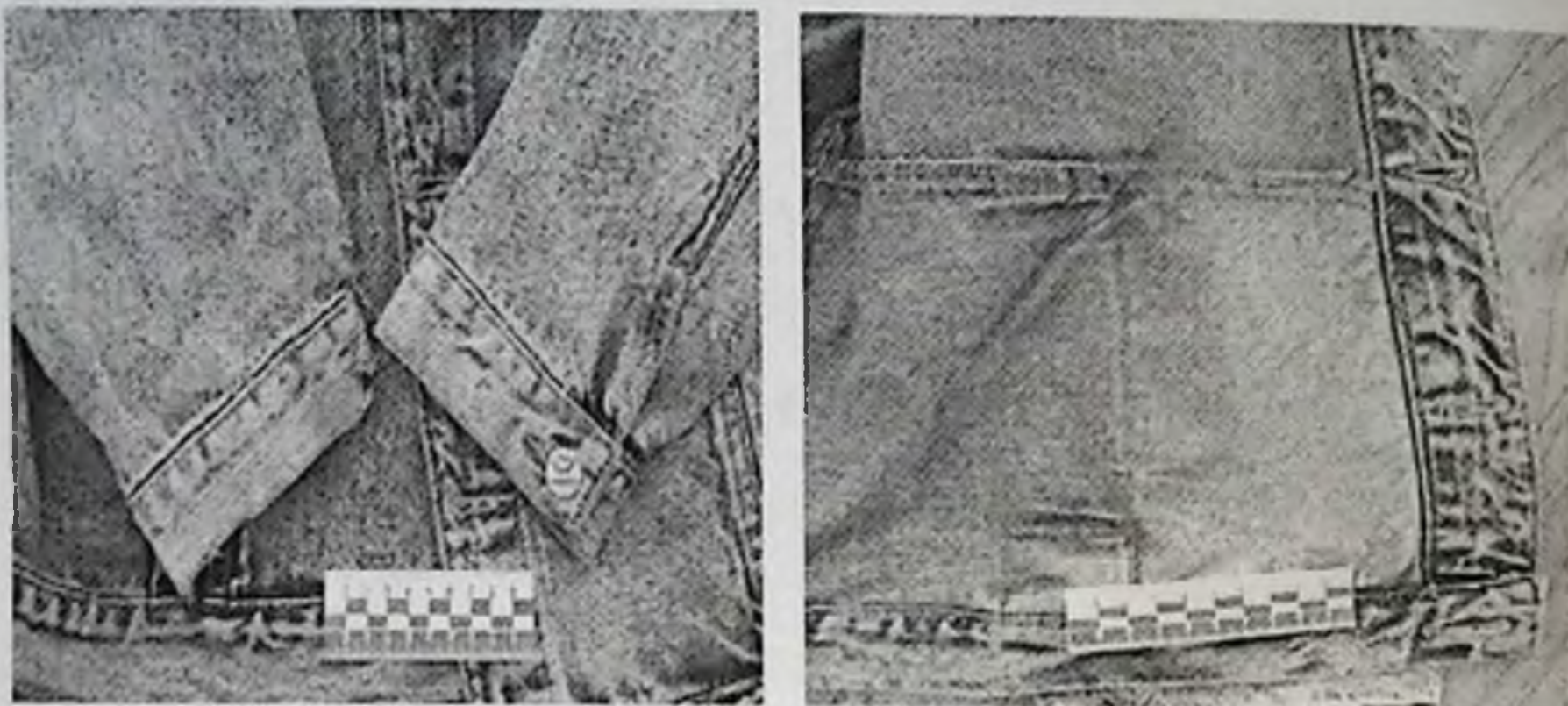


Рис. 7. Пятен крови, расположенных на различных текстильных тканях.

Результаты реакции оценивали по системе трех плюсов. Наиболее интенсивная картина реакции «+++» (рис.1), она характеризовалась появлением глыбок (комков) связанных эритроцитов или большого числа крупных эритроцитарных агглютинатов, которые видны макроскопически. Появление средних агглютинатов, содержащих по 5-7 эритроцитов на фоне единичных свободно лежащих эритроцитов в поле зрения, отмечалось «++» (рис.9).

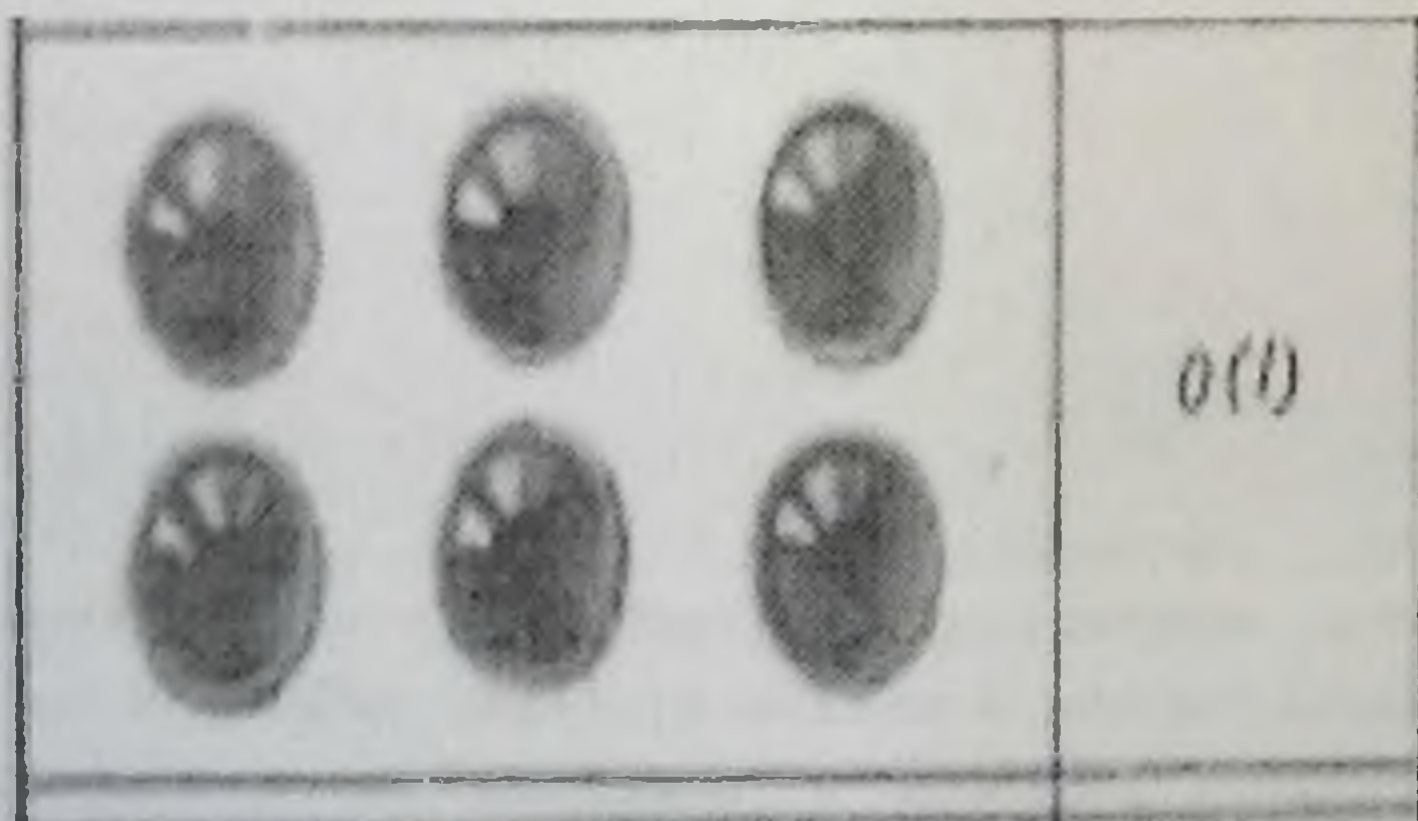
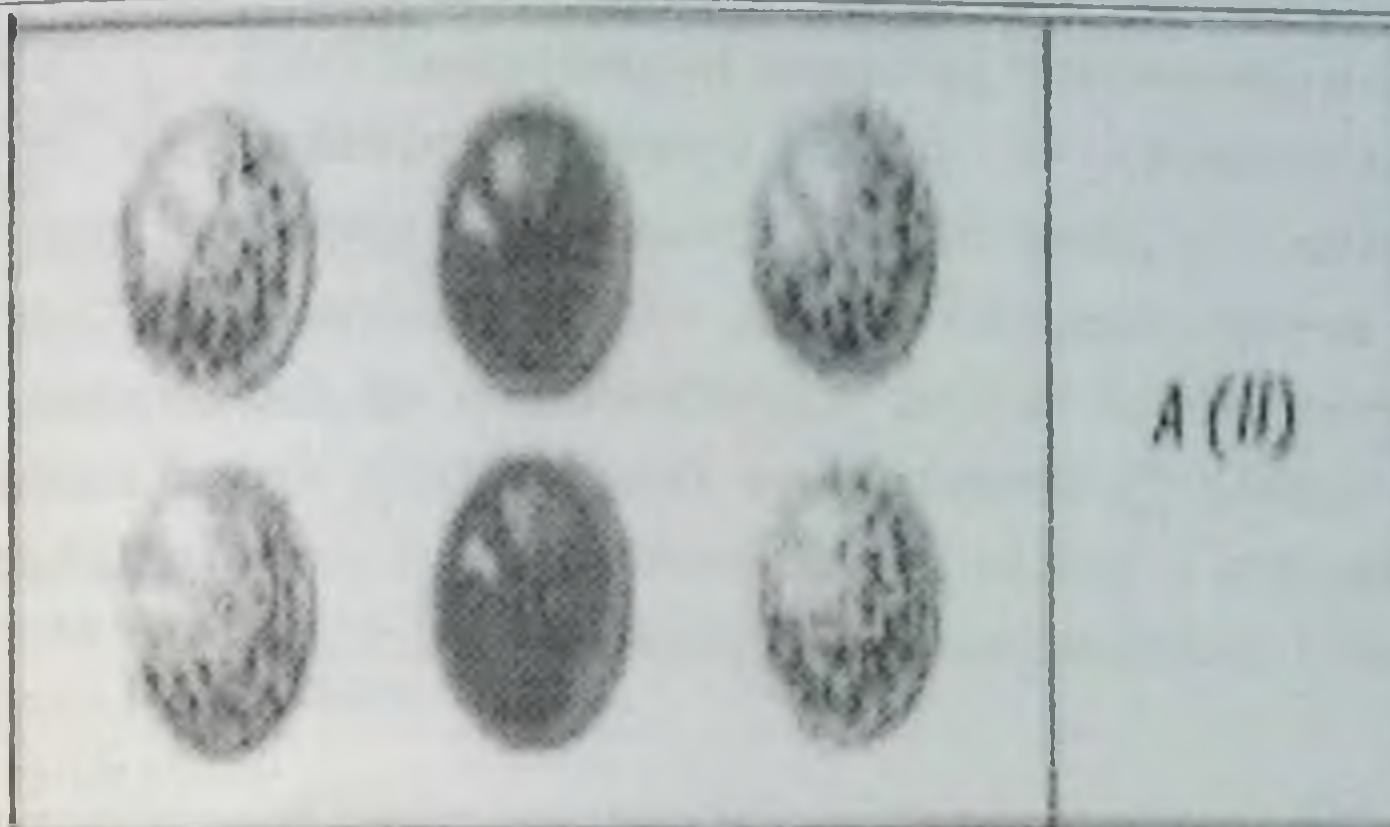


Рис. 8. Результат РАЭ. Появление глыбок связанных эритроцитов, макроскопическая видимая агглютинация.



*Рис. 9. Результат РАЭ. Появление крупных агглютинатов (связанных по 5-7 эритроцитов) на фоне единичных свободных эритроцитов.*

Наличие небольшого числа мелких агглютинатов, содержащих по 3-4 эритроцита на фоне множества свободно лежащих эритроцитов в поле зрения, отмечалось «+» (рис.3). Отсутствие агглютинатов, указывающее на отрицательный результат реакции, отмечалось как «-» (рис.4.).

Результаты исследования 10 экспериментальных пятен крови на индифферентном материале (чистая марля) в указанной выше последовательности показали возможность использования хроматографированного объекта для обнаружения в нем антигенов системы АВО. Наряду с этим невыясненным остается вопрос, не влияет ли хроматография на абсорбционную активность антигенов исследуемого пятна или, наоборот, не происходит ли своего рода очистка антигенов системы АВО от других примесей, т.е. не повышается ли абсорбционная способность.

Для разрешения этой задачи провели сравнительное исследование объектов общепринятой реакцией абсорбции-элюции, а также РАЭ с предварительным хроматографированием образцов. С этой целью из одного и того же объекта, в одно и то же время брали ниточки, которые предварительно фиксировали в течение 20 мин. в метиловым спирте и другие ниточки из этих же объектов, предварительно хроматографировали для обнаружения в них крови.

Хроматографированные и фиксированные метиловым спиртом объекты в одинаковых условиях подвергались РАЭ.

Исследовано 40 пятен крови с различными групповыми свойствами. Их давность варьировала от 2 дней до 1 месяца. Кровь людей непосредственно после изъятия равномерно наносили (в количестве 0,3-0,5 мл) на расправленную на стеклянной подложке чистую марлю. Предварительно каждая проба крови в жидком виде исследовалась с целью определения ее групповой принадлежности. Результаты исследования суммированы в таблице 3.

Таблица 3.

*Сравнительные данные хроматографированных и нехроматографированных объектов, исследованных реакцией абсорбции-элюции.*

№	Исследуемые образцы крови	Группа крови	Выявление агглютиногенов в предварительно фиксированных пятнах			Выявление агглютиногенов в предварительно хроматографированных пятнах		
			А	В	О	А	В	О
			3	4	5	6	7	8
	1	2						
1	Кровь гр-на К-ва	0(I)	-	-	++	-	-	++
2	Кровь гр-на Х-ва	0(I)	-	-	++	-	-	++
3	Кровь гр-на К-ва	0(I)	-	-	+	-	-	++
4	Кровь гр-на Т-ва	0(I)	-	-	+	-	-	+
5	Кровь гр-на М-ва	0(I)	-	-	++	-	-	++
6	Кровь гр-на Ш-го	A(II)	++	-	-	+++	-	-
7	Кровь гр-на Т-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
8	Кровь гр-на Г-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
9	Кровь гр-на Е-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
10	Кровь гр-на В-ва	A(II)	+++	-	-	+++	-	-
11	Кровь гр-на П-ва	A(II)	++	-	-	+++	-	-
12	Кровь гр-на Ч-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
13	Кровь гр-на К-на	A(II)	++	-	-	++	-	-
14	Кровь гр-на П-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-

15	Кровь гр-на К-ва	A(II)	+++	-	-	+++	-	-
16	Кровь гр-на Ж-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
17	Кровь гр-на Е-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
18	Кровь гр-на Т-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
19	Кровь гр-на З-ва	A(II)	+++	-	-	+++	-	-
20	Кровь гр-на З-кого	A(II)	++	-	-	++	-	-
21	Кровь гр-на И-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
22	Кровь гр-на Г-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
23	Кровь гр-на М-ев	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
24	Кровь гр-на К-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
25	Кровь гр-на С-та	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
26	Кровь гр-на Е-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
27	Кровь гр-на К-на	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
28	Кровь гр-на Ем	B(III)	-	++	-	-	+++	-
29	Кровь г-ки С-ной	B(III)	-	++	-	-	+++	-
30	Кровь г-ки Ш-вой	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
31	Кровь г-ки П-вой	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
32	Кровь г-ки З-вой	B(III)	-	++	-	-	++	-
33	Кровь г-ки С-вой	B(III)	-	++	-	-	+++	-
34	Кровь г-ки Ф-ва	B(III)	-	++	-	-	++	-
35	Кровь г-ки К-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
36	Кровь г-ки К-ва	AB(IV)	++	+++	-	++	+++	-
37	Кровь г-ки Б-ных	AB(IV)	++	+++	-	+++	+++	-
38	Кровь г-ки Е-вой	AB(IV)	++	+++	-	+++	+++	-
39	Кровь г-ки Б-ка	AB(IV)	++	+++	-	++	+++	-
40	Кровь г-ки О-на	AB(IV)	++	+++	-	+++	+++	-

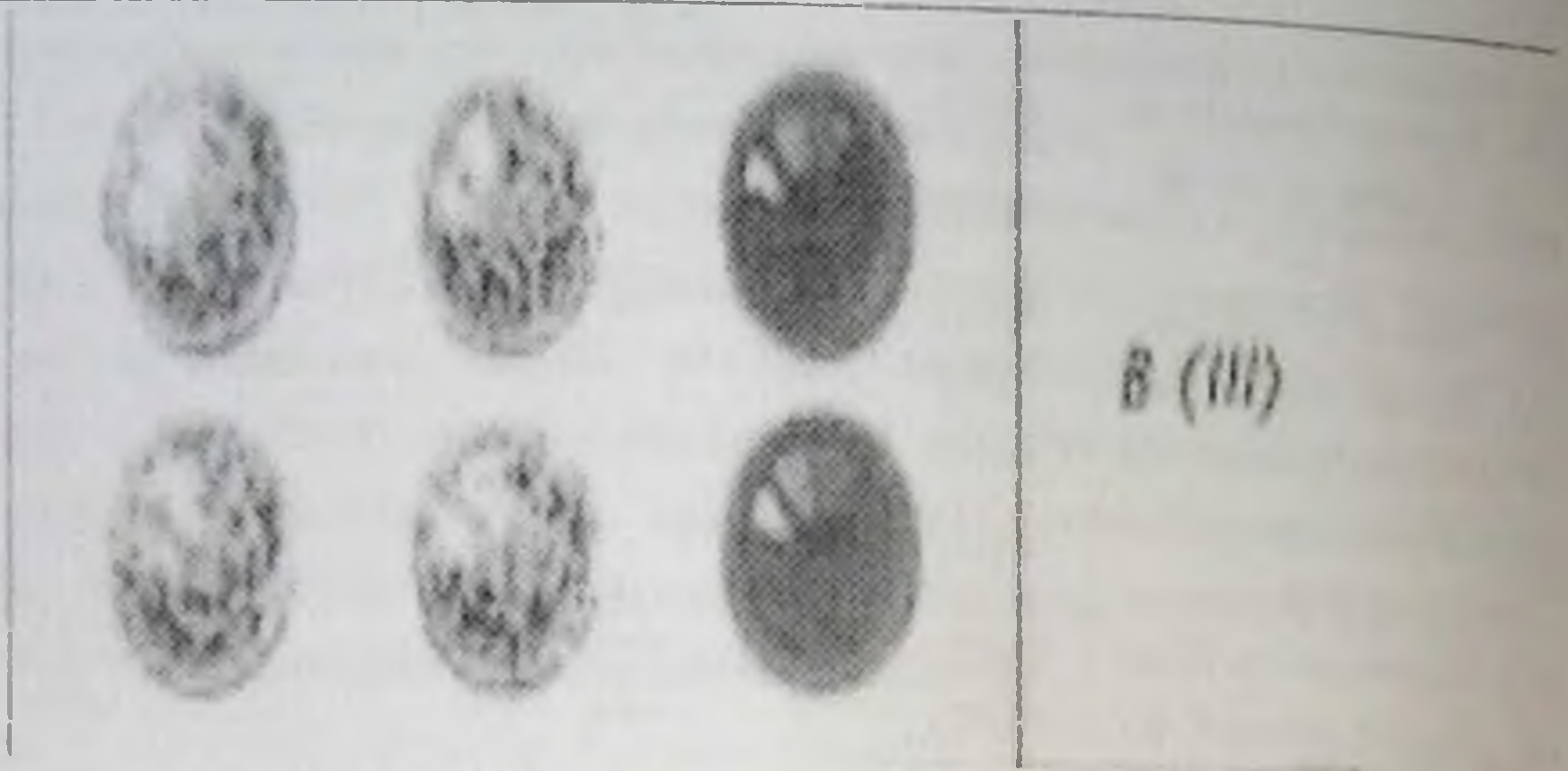


Рис. 10. Результат РАЭ. Появление мелких агглютинатов (связанных по 3-5 эритроцитов) на фоне множества свободных эритроцитов.

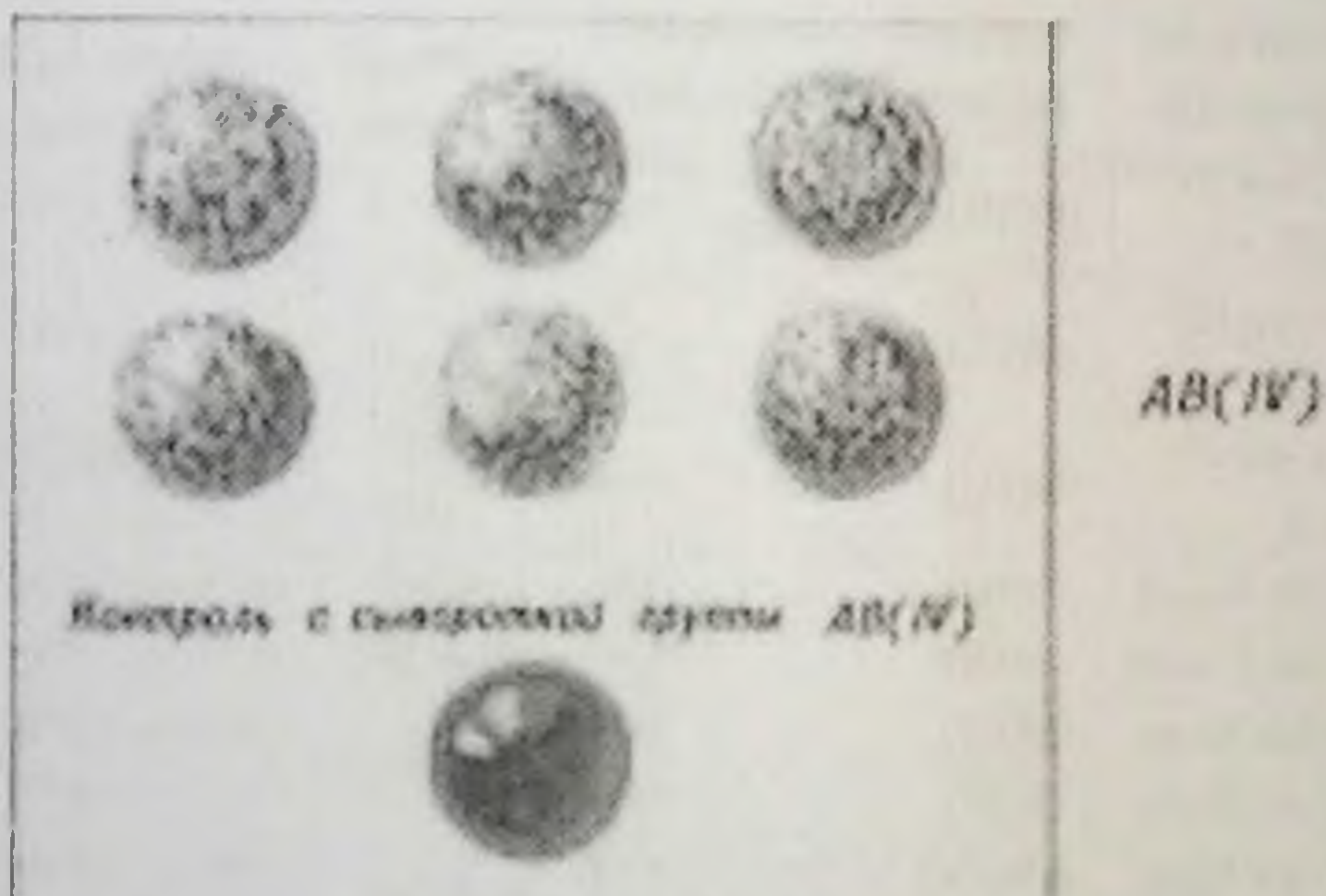


Рис. 11. Результат РАЭ. Отсутствие агглютинации (-).

Из таблицы видно, что во всех 40 предварительно хроматографированных объектах реакцией абсорбции-элюции удалось выявить антигены А, В, АВ и О (Н). В контрольных, т.е. предварительно фиксированных метиловым спиртом пятнах, были также обнаружены соответствующие антигены. Однако полученные результаты оказались неодинаковыми. Так, в 8 из общего числа хроматографированных объектах при элюции были установлены

глыбки (комки) связанных эритроцитов, или большое число крупных агглютинатов (+++), тогда как тем же методом без предварительной хроматографии были получены только средние агглютинаты, содержащие 3-5 эритроцитов (++)).

Исследуя хроматографированные ниточки из пятен крови, посчитали интересным проверить, нельзя ли выявить антигены крови на хроматограммах выше этой ниточки, в том числе на протяжении всей растворенной зоны пигмента крови.

Для ответа на данный вопрос исследовали хроматограммы 10 пятен крови разных лиц с различными групповыми свойствами. Для этой цели каждая зона, начиная с верхнего конца нитки, разрезалась на 5-6 мелких кусочков, которые исследовали при помощи РАЭ для определения агглютиногенов крови. Наряду с этим хроматографированные объекты образцов крови, взятых у лиц с первой, второй и третьей группой, исследовали методом Лятесса для выявления у них агглютининов. При этом ни в одном из них проверенных кусочков агглютиногенов системы АВО выявить не удалось. Не установлены и соответствующие агглютинины крови.

Результаты, полученные на данном этапе, позволило полагать, что сморщенные, засохшие эритроциты, находящиеся в пятнах крови, гемолизируются под действием растворителя, а агглютинины полностью разрушаются.

Таким образом, предложенный метод позволяет получить строго специфические результаты, о чем свидетельствует совпадение обнаруженных агглютиногенов с предварительно выявленными агглютиногенами и агглютинидами жидкой крови. Строгая специфичность предлагаемого метода указывает на то, что в процессе хроматографии растворитель (бутанол-аммиак) фиксирует агглютиногены крови. Кроме того, он полностью разрушает собственные агглютинины пятен крови, способные исказить результаты РАЭ.

Ярко выраженные результаты реакций (+++) при исследовании хроматографированных вырезок, а также отрицательный результат реакции абсорбции-элюции при исследовании вырезок из зоны гемина и других участков хроматограмм свидетельствуют, что в

процессе хроматографии антигены крови не уходят с растворителем, а фиксируются в самом пятне.

Следует также отметить, что при использовании фитоагглютининов из семян ракичника для получения четких результатов РАЭ можно использовать фитоагглютинины с титром 1:64.

Разработанный вариант позволяет обнаружить антигены крови системы АВО реакцией абсорбции-элюции в объекте, в котором определяли наличие крови методом хроматографии на бумаге, т.е. наличие и группа крови определяются в одном пятне, что имеет большое значение в практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. Это подтверждает мнение В.В. Томилина и М.В. Кисина, отметивших, что для идентификации личности комплексное исследование единого исходного материала весьма актуально.

### **Исследование микроследов крови методом радиальной микрохроматографии**

В последнее время судебно-медицинскому исследованию крови методом хроматографии уделяется все большее внимание. В судебно-медицинскую практику прочно вошло установление наличия крови методом хроматографии на бумаге. Этому способствовал ряд его преимуществ перед остальными способами.

Этот метод достаточно специфичен, высокочувствителен, прост в исполнении, позволяет исследовать непосредственно пятно крови без предварительной его обработки. Это имеет большое значение, поскольку методы, связанные с предварительным приготовлением вытяжки из пятна не всегда эффективны, так как экстрагирование красящего вещества крови из загрязненных и старых пятен, пятен крови, подвергшихся стирке, либо воздействию других факторов может быть затруднено и даже невозможно.

Метод хроматографии обладает свойством очищать и отделять чистый ингредиент от посторонних загрязнений. Примесь земли, цемента, навоза, ржавчины, алебаstra, извести, песка, хлорофилла, мыла, жира, горючих веществ, клеевых и масляных красок не оказывает побочного влияния на определение наличия крови

хроматографией на бумаге. Этим методом легко устанавливается наличие крови в следах, измененных под воздействием высокой температуры, солнечных лучей и различных химических веществ, как органического, так и неорганического происхождения, в том числе кислот и щелочей, а также индикаторов, красителей и др. Изложенное убеждает в целесообразности совершенствования данного метода с целью решения ряда других задач.

Одной из проблем судебно-медицинского исследования следов крови является разработка способов, позволяющих одновременно исследовать большое количество объектов при минимальной затрате необходимых ингредиентов и материала экспертизы, т.е. их микрочастиц. Апробация способов показала, что оптимальным методом является радиальная микрохроматография на бумаге с системой растворителя бутанол-аммиак. Камерой для хроматографии служила фарфоровая чашка конической формы. В чашку сливали нижний слой растворителя, а верхний слой сливали в бюкс или флакон из-под пенициллина, установленный на дно чашки. Стекланный сосуд не должен быть выше фарфоровой чашки.

Из хроматографической бумаги марки «М» вырезали круг, диаметр которого был на 5 мм меньше самого большого диаметра камеры-чашки. Так, при диаметре чашки 145 мм диаметр круга составлял 140 мм. Простым (графитным) карандашом по радиусу размечали на нем 48 полос в форме сектора, основанием обращенного к периферии, которые нумеровали от 1 до 48. Круги и их разметку можно делать заблаговременно по шаблону (круг из обычной бумаги, расчерченный на полоски диаметром на 10 мм больше стандартной хроматографической бумаги). Хроматографическую бумагу стандартного диаметра кладут на шаблон так, чтобы края очерченных линий шаблона равномерно выступали под ней. Очерчивая карандашом каждую такую линию продолжают к центру, вычерчивая таким образом полоски в форме сектора.

На расстоянии 20 мм от центра по радиусу прочерчивается линия старта. В средней части стартовой линии каждой полоски кончиком иглы на расстоянии 2 мм друг от друга делаются два



параллельных прокола, в которые затем вставляют ниточку из исследуемого пятна длиной 3 мм. Таким образом, объекты исследования располагаются по радиусу малого круга (линия старта) на одном уровне. В центре хроматографической бумаги делается прокол. Берется пучок чистой нитки длиной 5-6 см и с одного конца они завязываются узлом. Пучок ниток проводится через прокол в хроматографической бумаге и узлом плотно прикрепляется к бумаге (в виде фитиля). Кружок хроматографической бумаги с объектами исследования (фитилем вниз) помещается в камеру так, чтобы фитиль попадал в центр стеклянного сосуда с растворителем. Хроматографическая бумага должна быть в горизонтальном положении. Бумага, равномерно покрывая края камеры, обеспечивает герметичность, для улучшения которой камера помещается на стекло и покрывается крышкой эксикатора, края которой смазываются вазелином.

В результате капиллярности растворитель быстро поднимается по фитилю и, достигнув центра, равномерно распределяется по радиусу бумажного круга. Хроматографирование продолжают до приближения линии растворителя к периферической части бумаги. Хроматограмма вынимается, высушивается и проявляется с последующей обработкой 0,1% раствором основного бензидина в хлороформе и 3% раствором перекиси водорода. Проявление производится в фарфоровой тарелке диаметром больше площади хроматограммы.

При проявлении на белом фоне бумаги у исходной линии каждой полоски (если в исследуемом объекте имеются следы крови) проявляется интенсивно-синяя зона пигмента крови. Чтобы сохранить хроматограмму на вещественное доказательство, она вынимается из тарелки с раствором перекиси водорода и в мокром состоянии помещается на несколько часов в такую же тарелку с проточной водопроводной водой. При этом зона отмывается от балласта, на беловатом фоне бумажной полоски остается стойкая зона крови желтовато-красного цвета. Хроматограмма высушивается при комнатной температуре и прикладывается к заключению.

Ниточки из объектов, прикрепленные к проколам, вынимаются до проявления хроматограммы и исследуются РАЭ с целью обнаружения в них агглютиногенов. Таким образом, в одной и той же ниточке может быть определено и наличие крови, и ее группа.

Для проверки возможности определения антигенов в предварительно хроматографированных пятнах крови различной давности исследовали 76 объектов, 56 из них пятна крови на марле и 20 – на фильтровальной бумаге давностью от 2-3 дней до 1 месяца. Наряду с этим исследовали пятна крови от 30 трупов и живых лиц, длительность хранения которых колебалась от 1 года до 10 лет.

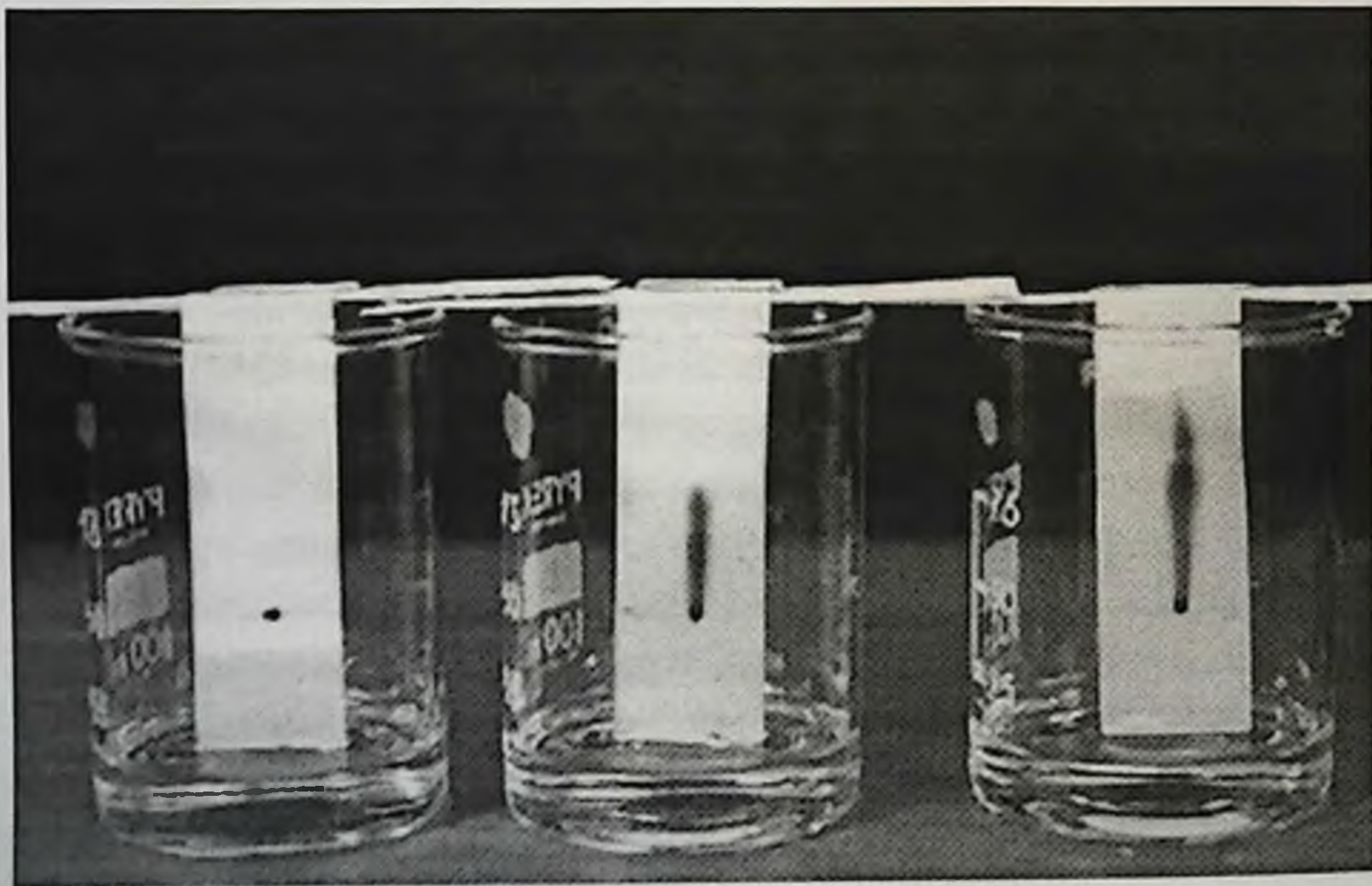
В общей сложности исследовано 106 объектов с различными групповыми свойствами. Параллельно во всех случаях хроматографировали и контрольные незапятнанные предметы – носители (вырезки из чистой фильтровальной бумаги, либо ниточки из чистой марли) в зависимости от расположения пятна крови на марле или на фильтровальной бумаге.

Во всех случаях у исходной линии каждой полоски после хроматографии образовалась зона пигмента крови удлиненной, языкообразной формы (рис.5), окрашенная в синий цвет различной интенсивности. Хроматограммы пятен крови, хранившиеся от 2-3 суток до 1 месяца и от одного года до 10 лет никакими особенностями не отличались, с той лишь разницей, что интенсивность окрашивания пятен с более продолжительными сроками хранения (6-10 лет) была менее выражена, чем при меньших сроках хранения. Возможно, это объясняется меньшей растворимостью красящего вещества крови в растворителе (бутанол-аммиак). Что касается антигенов, то они, соответственно групповой принадлежности, одинаково хорошо выявлялись как в свежих, так и в старых пятнах крови. Причем, в некоторых случаях, при исследовании пятен крови 1-10-летней давности имела место выраженная агглютинация эритроцитов, в то время как пятна крови 2-3-дневной давности в идентичных условиях исследования, при использовании одних и тех же сывороток и эритроцитов давали менее выраженные результаты.

Ни в одном случае на хроматограммах контрольных предметов-носителей зона свойственной пигменту крови не была обнаружена и хроматографированные контрольные ниточки и вырезки не оказывали влияния на результаты реакции абсорбции-элюции.

Таким образом, предложена метод радиальной микрохроматографии, позволяющей за короткое время установить наличие крови в следах большого количество объектов. На волокнах и вырезках из пятен крови, исследованных при помощи хроматографии, независимо от давности образования пятен, РАЭ хорошо выявляются свойственные для группы крови (по системе АВО) антигены, т.е. в одних и тех же объектах одновременно определяются и наличие, и группа крови.

В качестве примера приводятся хроматограммы крови с давностью пятен от 2-3 суток до 10 лет. Как видно из рисунка, у стартовой линии полоски (сектора), где было пятно, видна зона пигмента крови с определенной величиной  $R_f$  (рис.5).



*Рис. 12. Хроматограмма пятен крови.*

## Исследование следов крови, загрязненных некоторыми горючими и смазочными веществами

В практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств нередко возникает необходимость в групповой идентификации пятен крови, загрязненных различными горючими и смазочными веществами. Загрязнение пятен крови некоторыми горючими и смазочными веществами в ряде случаев сильно затрудняет определение групповой принадлежности исследуемых пятен (Н.В. Мотовилова, 1969). Под влиянием загрязняющих (горючих и смазочных) веществ довольно часто снижается абсорбционная активность групповых антигенов. Кроме того, эти вещества могут послужить причиной неспецифических результатов в количественной модификации реакции абсорбции агглютининов. В этой связи интересно проследить за влиянием горючих и смазочных веществ на результаты реакции абсорбции-элюции при использовании предварительно хроматографированных образцов.

Если учесть, что хроматография широко применяется во многих областях науки для получения того или другого чистого вещества из исследуемой смеси, либо для очистки его от различных загрязнений, примесей и компонентов, то уже такое свойство может служить гарантией широких перспектив и возможностей использования ее для исследования следов крови, загрязненных различными загрязнителями, в том числе смазочными и горючими веществами. Для того, чтобы проверить такую возможность (использование метода хроматографии на бумаге для установления наличия крови и одновременно очистки ее антигенов от загрязнителей) готовили экспериментальные пятна на индифферентном предмете-носителе — чистой марле. Для этого 0,5-1,0 мл жидкой крови равномерно наносили на марлю, причем предварительно определяли ее групповую принадлежность. Приготовленные таким образом следы крови высушивали при комнатной температуре вдали от прямых солнечных лучей. Затем на поверхность пятен равномерно наносили отдельно бензин, керосин, солярку, автол, солидол, мазут, нигрол, тормозную жидкость и вазелин.

Всего приготовлено 62 экспериментальных пятна, загрязненных горючими и смазочными веществами. При этом параллельно исследовались предварительно хроматографированные и нехроматографированные нити (контроль) из этих объектов. При этом как предварительно хроматографированные объекты, так и обработанные в течение 20 мин. метиловым спиртом исследовали реакцией абсорбции-элюции. В каждом случае брали волокна одинакового размера с одного и того же участка пятна.

Результаты хроматографии 62 образцов показали, что во всех случаях у стартовой линии каждой полоски (сектора) обнаруживается свойственная пигменту крови зона, т.е. установлено ее наличие. На хроматографированных волокнах всех объектов РАЭ четко выявлены агглютиногены, соответствующие групповым системам. Что касается объектов, предварительно нехроматографированных, то результаты их исследования резко отличались. Результаты этих опытов суммированы в таблице 4. Как видно из таблицы, некоторые горючие и смазочные вещества, например бензин, тормозная жидкость и солярка существенно не влияют на результаты реакции абсорбции-элюции. В этих случаях четкие результаты реакции абсорбции-элюции были получены как при исследовании хроматографированных объектов, так и обработанных метиловым спиртом.

Таблица 4

**Определение группы крови в пятнах, загрязненных горючими и смазочными веществами, РАЭ при использовании хроматографированных и обработанных метиловым спиртом объектов**

№	Исследуемые образцы крови	Группа крови	Объекты, обработанные метиловым спиртом			Хроматографированные объекты		
			А	В	О	А	В	О
	1	2	3	4	5	6	7	8
			Образцы, обработанные бензином					
1	П-ко	AB(IV)	+++	+++	-	+++	+++	-
2	Н-ва	A(II)	++	-	-	+++	-	-
3	П-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-

4	П-т	AB(IV)	+++	++	-	+++	+++	.
5	П-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	.
6	В-ва	A(II)	++	-	-	++	-	.
7	Д-на	O(I)	-	-	++	-	-	++
8	К-ва	A(II)	+++	-	-	+++	-	.

**Образцы, обработанные керосином**

9	Б-ва	A(II)	++	-	-	+++	-	-
10	К-ва	O(I)	-	-	+	-	-	+
11	Л-ва	B(III)	-	++	-	-	+++	-
12	П-ко	AB(IV)	+	++	-	+++	+++	-
13	Р-ва	A(II)	++	-	-	++	-	-
14	П-ва	B(III)	-	++	-	-	++	-
15	П-т	AB(IV)	++	++	-	++	+++	-
16	Д-н	O(I)	-	-	+	-	-	+

**Образцы, обработанные соляжкой**

17	Д-я	B	-	+++	-	-	+++	-
18	Б-ва	A(II)	++	-	-	+++	-	-
19	А-ва	AB(IV)	+++	+++	-	+++	+++	-
20	А-ва	O(I)	-	-	+	-	-	++
21	О-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
22	Ш-вой	A(II)	++	-	-	+++	-	-

**Образцы, обработанные автолом**

23	Н-вой	A(II)	-	-	-	++	-	-
24	К-вой	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
25	М-ва	O(I)	-	-	+	-	-	++
26	А-вой	AB(IV)	++	++	-	++	++	-
27	И-ва	A(II)	+	-	-	++	-	-
28	Р-ва	B(III)	-	+	-	-	+++	-
29	К-к	O(I)	-	-	+	-	-	+
30	С-вой	AB(IV)	+	+++	-	++	+++	-

**Образцы, обработанные вазелином**

31	Т-к	O(I)	-	-	-	-	-	++
32	З-ва	A(II)	-	-	-	++	-	-
33	М-ной	B(III)	-	±	-	-	+++	-
34	Л-вой	AB(IV)	-	±	-	++	++	-
35	М-вой	O(I)	-	-	+	-	-	++
36	С-вой	AB(IV)	+	++	-	++	++	-
37	П-ва	A(II)	-	-	-	++	-	-
38	Ж-кой	B(III)	-	±	-	-	+++	-

Образцы, обработанные солидолом								
39	М-н	O(I)	-	-	+	-	-	+
40	П-ва	A(II)	+	-	-	++	-	-
41	К-р	B(III)	-	++	-	-	+++	-
42	А-вой	AB(IV)	+	+	-	+	+++	-
43	М-на	B(III)	-	++	-	-	++	-
44	З-ва	A(II)	+	-	-	++	-	-
Образцы, обработанные мазутом								
45	А-вой	AB(IV)	++	+	-	++	++	-
46	М-н	O(I)	-	-	+	-	-	++
47	П-ва	A(II)	±	-	-	++	-	-
48	П-ва	A(II)	+	-	-	++	-	-
49	К-р	B(III)	-	+	-	-	++	-
50	Ж-кой	B(III)	-	++	-	-	+++	-
Образцы, обработанные тормозной жидкостью								
51	Ж-х	A(II)	+++	-	-	+++	-	-
52	М-вой	O(I)	-	-	++	-	-	++
53	К-ва	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
54	Н-вой	AB(IV)	+++	+++	-	+++	+++	-
55	З-вой	A(II)	+++	-	-	+++	-	-
56	К-к	B(III)	-	+++	-	-	+++	-
Образцы, обработанные нигролом								
57	П-ко	AB(IV)	-	++	-	++	++	-
58	П-ва	B(III)	-	++	-	-	+++	-
59	А-вой	B(III)	-	++	-	-	+++	-
60	А-вой	O(I)	-	-	+	-	-	++
61	К-ной	A(II)	+	-	-	++	-	-
62	Х-вой	A(II)	-	-	-	-	-	-

Однако исследование пятен крови, загрязненных автотоллом, солидолом, нигролом, мазутом, вазелином и частично керосином установило их влияние на ход РАЭ при исследовании нехроматографированных образцов. В частности, перечисленные вещества заметно снижали абсорбционную активность крови. В большинстве образцах не удалось получить четких результатов реакции абсорбции-элюции при использовании фиксированных метиловым спиртом объектов. Между тем исследование предварительно хроматографированных волокон, взятых из этих образцов, дало хорошие результаты.

Таким образом, сравнительное исследование 62 экспериментальных пятен крови, загрязненных смазочными и горючими веществами, показало преимущество предварительной хроматографии перед обычной реакцией абсорбции-элюции. В предварительно хроматографированных 62 объектах во всех случаях были обнаружены агглютиногены крови системы АВО, тогда как их исследование без предварительного хроматографирования в 11 случаях показало снижение абсорбционной способности крови, а в 8 (из 62) не удалось установить соответствующих агглютиногенов крови.

### **Исследование следов крови, загрязненных некоторыми сыпучими веществами**

Исследование пятен крови, загрязненных горючими и смазочными веществами, подтвердило целесообразность предварительного хроматографирования образцов в подобных случаях, поскольку хроматография с растворителем бутанол-аммиаком очищает антигены крови от примесей, в частности от нигрола, вазелина, автола, мазута и др. В практике судебно-медицинской экспертизы нередко встречаются случаи, когда следы, подозрительные на кровь, загрязняются землей, навозом, цементом, известью и другими сыпучими веществами. Загрязнение следов крови этими веществами чаще всего происходит на месте происшествия при самых разнообразных обстоятельствах.

С целью проверки возможности последовательного определения наличия и группы крови в следах, загрязненных перечисленными сыпучими веществами, готовили экспериментальные пятна на индифферентном предмете-носителе – чистой марле. Затем на пятна крови в избытке наносили землю, песок, навоз, мел, цемент, известь, сахар, перец и соль. Всего приготовлено 48 пятен. Для этого использовали 11 образцов крови первой группы, 16 образцов крови второй группы, 15 образцов крови третьей группы и 6 образцов крови четвертой группы. Следы крови наносили на предварительно расправленные на предметном стекле кусочки чистой марли и, не



давая ей высохнуть, сверху равномерно в избытке наносили указанные вещества. С момента приготовления объекта до начала исследования проходило от 2-3 дней до 2 недель. Исследование 48 объектов при помощи радиальной хроматографии во всех случаях показало наличие крови. При исследовании хроматографированных и нехроматографированных объектов реакцией абсорбции-элюции была установлена групповая принадлежность. Для обнаружения агглютиногенов реакция абсорбции-элюции производилась с изогемагглютинирующими сыворотками альфа и бета с титрами 1:256 и экстрактом анти-Н с титром 1:128. Результаты этих опытов представлены в таблице 5.

Таблица 5.

*Результаты определения групповой принадлежности в пятнах крови, загрязненных некоторыми сыпучими веществами*

№	Группа крови	К-во объектов в	Результат РАЭ с хроматографированными объектами				Результат РАЭ с нехроматографированными объектами			
			+++	++	+	-	+++	++	+	-
			1	A (II)	16	12	2	2	-	11
2	B (III)	15	10	5	-	-	10	4	1	-
3	AB (IV)	6	3	2	1	-	3	2	1	-
4	O	11	1	9	1	-	1	8	2	-

Как видно из данных таблиц, загрязнение пятен крови землей, навозом, известью, цементом, мелом, солью, перцем и сахаром не влияет на результаты реакции абсорбции-элюции как хроматографированных объектов, так и объектов, обработанных спиртом. Во всех случаях были получены четкие, достаточно интенсивные результаты, что обусловило легкое определение групповой принадлежности исследуемых образцов.

Таким образом, радиальная микрохроматография на бумаге и реакция абсорбции-элюции не подвержены влиянию земли, навоза и других сыпучих веществ и могут успешно применяться для установления и наличия, и группы крови загрязненных ими пятен.

## Исследование пятен крови, подвергшихся гниению и стирке моющими средствами

В судебно-медицинской практике вещественных доказательств зачастую возникает необходимость в групповой идентификации пятен, образованных гнилостно-измененной кровью. Развитие гнилостных процессов в крови в ряде случаев в значительной степени затрудняет определение групповой принадлежности исследуемых пятен. При исследовании гнилостно-измененных пятен крови реакцией абсорбции агглютининов не всегда удается получить специфические результаты. Исследуя пятна крови, подвергшиеся гниению, пришла к выводу, что развитие гнилостных процессов не только снижает абсорбционную способность антигенов, но может быть причиной неспецифических результатов. S. Akajashi (1965), применяя реакцию смешанной агглютинации, установил групповую принадлежность в гнилостно-измененных пятнах. Противоположные результаты получил А.К. Серопян (1967), по мнению которого реакция «смешанной агглютинации» для этой цели непригодна. Между тем М.С. Свирский (1969) установил, что гнилостные изменения совершенно не препятствуют применению реакции абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации». Неспецифические результаты в этих реакциях автор получал лишь с теми материалами, которые после нагрузки агглютинами (в реакции абсорбции агглютининов) продолжали снижать титр абсорбируемых сывороток на 4-6 ступени поглощения.

Как отмечалось выше, хроматография способна очищать пятна крови от различных загрязнителей. В этой связи интересным представляется проследить, какое воздействие оказывают гнилостные изменения на реакцию абсорбции-элюции при изучении хроматографированных объектов.

Сэтой целью были приготовлены 8 образцов (по 2 образца из каждой группы) пятен донорской крови, которые во влажном виде помещались в чашки Петри для процесса гниения. Гнилостно измененные пятна исследовались через 1, 2, 3, 4 и 8 недель. Наличие крови в них определяли методом радиальной микрохроматографии на

бумаге. Затем объекты исследования (ниточки), до проявления хроматограмм, снимали со стартовой линии и для установления групповой принадлежности исследовали реакцией абсорбции-элюции. Для сравнительного изучения в реакции абсорбции-элюции был использован материал из тех же пятен, но предварительно обработанный метиловым спиртом. Для абсорбции применяли те же сыворотки и лектины, что и при исследовании образцов свежей крови (табл.6). Из таблицы видно, что антигены крови во всех случаях выявляются, однако по мере увеличения срока хранения агглютинабельность их снижается.

Реакция абсорбции-элюции показала, что антигены крови хорошо выявлялись в гнилостно-измененных образцах со сроком хранения до 1 месяца как при использовании предварительно хроматографированных объектов, так и объектов, фиксированных метиловым спиртом. При дальнейшем хранении (в конце 2-го месяца), при исследовании нитей, фиксированных метиловым спиртом, получали менее выраженные результаты реакции по сравнению с хроматографированными объектами.

Таблица 6.

**Результаты определения групповой принадлежности гнилостно измененной крови**

№	Исследуемые образцы	Хроматографированные объекты			Нехроматографированные объекты			Группа
		A	B	O	A	B	O	
	I	2	3	4	5	6	7	8
<b>Образцы гнилостно измененной крови гр-ки Ш-вой через</b>								
1	1 неделю	-	-	++	-	-	++	O(I)
2	2 недели	-	-	++	-	-	++	-  -
3	3 недели	-	-	++	-	-	+	-  -
4	4 недели	-	-	++	-	-	+	-  -
5	8 недель	-	-	+	-	-	+	-  -
<b>Образец гнилостно измененной крови гр-ки К-вой через</b>								
1	1 неделю	+++	-	-	+++	-	-	A(II)
2	2 недели	+++	-	-	+++	-	-	-  -
3	3 недели	+++	-	-	+++	-	-	-  -
4	4 недели	+++	-	-	++	-	-	-  -
5	8 недель	+++	-	-	++	-	-	-  -

Образец гнилостно измененной крови гр-наМ-гочерез

1	1 неделю	-	+++	-	-	+++	-	B(III)
2	2 недели	-	+++	-	-	+++	-	-//-
3	3 недели	-	+++	-	-	+++	-	-//-
4	4 недели	-	+++	-	-	+++	-	-//-
5	8 недель	-	+++	-	-	++	-	-//-

Образец гнилостно измененной крови гр-наГ-гочерез

1	1 неделю	+++	+++	-	+++	+++	-	AB(IV)
2	2 недели	++	+++	-	++	+++	-	-//-
3	3 недели	++	+++	-	++	+++	-	-//-
4	4 недели	++	++	-	++	++	-	-//-
5	8 недель	++	++	-	+	+	-	-//-

Образец гнилостно измененной крови гр-на В-начерез

1	1 неделю	-	-	++	-	-	++	O(I)
2	2 недели	-	-	++	-	-	++	-//-
3	3 недели	-	-	++	-	-	+	-//-
4	4 недели	-	-	++	-	-	+	-//-
5	8 недель	-	-	+	-	-	+	-//-

Образец гнилостно измененной крови гр-на С-вачерез

1	1 неделю	+++	-	-	+++	-	-	A(II)
2	2 недели	+++	-	-	++	-	-	-//-
3	3 недели	+++	-	-	++	-	-	-//-
4	4 недели	++	-	-	+	-	-	-//-
5	8 недель	++	-	-	+	-	-	-//-

Образец гнилостно измененной крови гр-ки Б-вой через

1	1 неделю	-	+++	-	-	+++	-	B(III)
2	2 недели	-	+++	-	-	+++	-	-//-
3	3 недели	-	+++	-	-	++	-	-//-
4	4 недели	-	++	-	-	++	-	-//-
5	8 недель	-	++	-	-	+	-	-//-

Образец гнилостно измененной крови гр-наИ-начерез

1	1 неделю	+++	+++	-	+++	+++	-	AB(IV)
2	2 недели	+++	+++	-	++	++	-	-//-
3	3 недели	+++	+++	-	++	++	-	-//-
4	4 недели	+++	+++	-	++	++	-	-//-
5	8 недель	++	++	-	+	+	-	-//-

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что при исследовании гнилостно-измененных пятен крови целесообразно

использовать реакцию абсорбции-элюции с предварительно хроматографированными объектами.

С целью выяснения, пригоден ли материал пятна, подвергавшийся стирке хозяйственным мылом и некоторыми другими моющими средствами для выявления в нем агглютиногенов методом абсорбции-элюции, в предложенной схеме изготовлено 24 пятна крови на индифферентном предмете-носителе – чистой марле. Приготовленные пятна после высыхания (через 1-2 дня) стирали хозяйственным мылом и стиральными порошками (Лотос и Эра) до обесцвечивания. Для выявления антигенов использовали те же изосыворотки альфа и бета, а также экстракт анти-Н, что и в описанных выше опытах. Результаты реакции абсорбции-элюции при постановке с хроматографированными и обработанными метиловым спиртом ниточками оказались одинаковыми. Во всех случаях достаточно четко были выявлены агглютиногены крови, что обеспечило успешное определение групповой принадлежности исследуемых образцов.

### **Исследование пятен крови, подвергшихся воздействию солнечных лучей и высокой температуры**

При воздействии на пятна крови высокой температуры и солнечных лучей происходит изменение свойств белков крови и, в том числе, группо-специфических, что может отрицательно сказаться на результатах реакции абсорбции-элюции.

Т. Nagahoetal. и Т. Tsujietal. изучая термостабильность гликолипидов крови антигенного происхождения пришли к выводу, что с повышением температуры активность гликолипидов уменьшается.

Для изучения влияния солнечных лучей и высокой температуры на результаты хроматографированных образцов были приготовлены экспериментальные пятна крови на индифферентном предмете-носителе – чистой марле. Пятна готовили из крови 8 доноров (по 2 образца из каждой группы). Всего изготовлено 40 пятен. Приготовленные экспериментальные пятна помещали на открытом

воздухе под солнцем. Затем по 4 образца (по 1 из каждой группы) убирала от воздействия прямых солнечных лучей через 3, 5, 10, 20 и 30 дней.

Наряду с этим готовили пятна крови для выяснения влияния на них высокой температуры. Образцы готовили из крови 8 доноров (по 2 образца из каждой группы) всего 64 пятна. Образцы выдерживали в термостате в течение 60 минут при различной температуре (60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 и 200°).

Определение наличия крови в образцах, подвергавшихся воздействию солнечных лучей и высокой температуры проводили методом радиальной хроматографии на бумаге. Затем в этих же хроматографированных ниточках реакцией абсорбции-элюции определяли агглютиногены крови. Для сравнительной оценки реакции абсорбции-элюции ставили также с ниточками из тех же объектов, но без предварительной обработки.

Результаты во всех случаях (как с хроматографированными, так и предварительно необработанными объектами) оказались четкими.

Результаты исследования пятен крови, подвергавшихся воздействию высоких температур (60-200°) приведены в таблице 7.

Как видно из данных, приведенных в таблице, нагревание исследуемых образцов до 60-100° отрицательного влияния на реакцию абсорбции-элюции не имеет. При этом четкие результаты были получены как с образцами предварительно хроматографированными, так и необработанными. При нагревании образцов в течение часа при 120-160° количество свободно лежащих агглютинатов уменьшалось, а до 180 и 200° реакция выпадала отрицательной.

Таким образом, приведенные выше результаты свидетельствуют, что солнечные лучи не оказывают влияния на показатели реакции абсорбции-элюции как при исследовании хроматографированных образцов, так и фиксированных метиловым спиртом. Нагревание пятен (до 120-160°) сопровождается

ослаблением реакции. Следовательно, по мере повышения температуры абсорбционная активность агглютиногенов снижается.

Таблица 7.

*Результаты определения агглютиногенов крови в пятнах, подвергшихся воздействию высокой температуры реакцией абсорбции-элюции*

№	Фамилия донора и группа крови	Температура обработки (0С)	Хроматографированные объекты			Нехроматографированные объекты		
			A	B	O	A	B	O
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Ш-ва O (I)	60	-	-	++	-	-	++
2		80	-	-	++	-	-	++
3		100	-	-	++	-	-	++
4		120	-	-	+	-	-	+
5		140	-	-	+	-	-	+
6		160	-	-	-	-	-	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-
1	К-ва A (II)	60	+++	-	-	+++	-	-
2		80	+++	-	-	+++	-	-
3		100	+++	-	-	+++	-	-
4		120	++	-	-	++	-	-
5		140	++	-	-	++	-	-
6		160	+	-	-	+	-	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-
1	М-ских B (III)	60	-	+++	-	-	+++	-
2		80	-	+++	-	-	+++	-
3		100	-	+++	-	-	+++	-
4		120	-	++	-	-	++	-
5		140	-	++	-	-	++	-
6		160	-	+	-	-	+	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-
1	М-ин AB (IV)	60	+++	+++	-	+++	+++	-
2		80	+++	+++	-	+++	+++	-

3		100	+++	+++	-	+++	+++	-
4		120	++	++	-	++	++	-
5		140	++	++	-	+	++	-
6		160	+	++	-	+	+	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-
1	В-ий О (I)	60	-	-	+++	-	-	+++
2		80	-	-	+++	-	-	+++
3		100	-	-	++	-	-	++
4		120	-	-	++	-	-	++
5		140	-	-	+	-	-	+
6		160	-	-	-	-	-	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-
1	С-ова (II)	60	++	-	-	++	-	-
2		80	++	-	-	++	-	-
3		100	++	-	-	++	-	-
4		120	++	-	-	++	-	-
5		140	+	-	-	+	-	-
6		160	+	-	-	+	-	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-
1	Б-ва В (III)	60	-	+++	-	-	+++	-
2		80	-	+++	-	-	+++	-
3		100	-	+++	-	-	+++	-
4		120	-	++	-	-	++	-
5		140	-	++	-	-	++	-
6		160	-	+	-	-	+	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-
1	Г-ий АВ (IV)	60	++	+++	-	++	+++	-
2		80	++	+++	-	++	+++	-
3		100	++	++	-	++	+++	-
4		120	++	++	-	++	++	-
5		140	+	+	-	+	++	-
6		160	+	+	-	+	+	-
7		180	-	-	-	-	-	-
8		200	-	-	-	-	-	-



## Исследование пятен крови, расположенных на различных текстильных тканях

В практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств в подавляющем большинстве случаев определение групповой принадлежности крови приходится проводить в пятнах крови на различных текстильных тканях (одежда, постельные принадлежности потерпевших и обвиняемых и др.). При обработке этих следов различными реактивами, применяемые для растворения пятна (в том числе и физиологический раствор), наряду с групповыми компонентами крови, могут растворяться красители тканей, которые, как известно из литературы, отрицательно влияют на ход реакции при определении агглютиногенов, особенно на реакцию абсорбции агглютининов (Е.В. Чучмарева, 1941; Я.С. Познянский - 1955).

Исходя из этого, представлялось интересным исследовать пятна крови, расположенные на различных текстильных тканях при помощи реакции абсорбции-элюции с использованием предварительно хроматографированных образцов.

Следует отметить, что на большом экспериментальном материале Д.Д. Джалалов показал возможность использования хроматографии на бумаге для установления наличия крови в пятнах, расположенных на различных текстильных тканях разных цветов и оттенков. При этом автор установил, что красители некоторых изделий растворяются в системе бутанол-аммиак и оставляют на полоске свойственные для них зоны окрашивания от слабо - заметных расплывчатых до четких интенсивных, однако они не мешают обнаружению пигмента крови. Следовательно, можно полагать, что при хроматографическом установлении наличия крови происходит своего рода очистка фиксированного на волокне антигена крови от красителей тканей. Это позволяет предположить, что красители не влияют на обнаружение агглютиногенов системы АВО при определении их реакцией абсорбции-элюции в предварительно хроматографированных объектах.

Чтобы проверить подобное предположение, исследованию подвергались пятна крови 40 лиц в возрасте 17-50 лет. Пятна крови

(после предварительного определения групповой принадлежности ее в жидком виде) приготавливали на разнообразных по расцветке и сорту текстильных тканях. Всего было приготовлено 40 пятен: 10 из них на группе хлопчатобумажных изделий, 10 – на шерстяных и полушерстяных тканях, 10 – на натуральных и искусственных шелковых изделиях и 10 – на других видах текстильных тканей. С момента приготовления пятен до начала их исследования проходило от 1-2 суток до 2 недель. Наряду с исследованием пятен крови, для контроля параллельно исследовали чистые участки тех же тканей. При этом во всех случаях на хроматограммах образовалась зона, свойственная пигменту крови, т.е. установлено наличие крови. В 18 случаях наблюдалось растворение красителей хлопчатобумажных, шелковых, шерстяных и других текстильных тканей, но преимущественно красителей шерстяных и полушерстяных тканей. На полосках хроматографической бумаги красители тканей давали от одного слабозаметного пятна (без резких границ) до 2-3 интенсивно окрашенных зон. При исследовании хроматографических ниточек реакцией абсорбции-элюции во всех случаях выявлены агглютиногены крови. В контрольных ниточках (из незапятнанных кровью участков текстильных тканей) антигены не выявлены, т.е. предметы-носители не влияли на реакцию абсорбции-элюции.

Для контроля проводили сравнительные исследования ниточек, взятых из тех же пятен крови, обычно принятой РАЭ (после предварительного фиксирования метиловым спиртом) (табл. 8).

Таблица 8

*Исследование пятен крови, расположенных на различных тканях*

№	Предмет-носители пятен крови	К-во объект ов	Хроматографирован ные объекты				Нехроматографиро ванные объекты			
			+++	++	+	-	+++	++	+	-
1	Шерстяные ткани	10	7	2	1	-	5	3	2	-
2	Шелковые ткани	10	2	4	2	2	1	3	4	2
3	Хлопчатобумажные ткани	10	7	3	-	-	6	2	2	-
4	Синтетические ткани	10	2	3	3	2	1	4	4	2

Как видно из таблицы, в 36 из 40 образцов выявлены агглютиногены как в хроматографированных объектах, так и в нехроматографированных. Лучшее качество РАЭ обеспечивала предварительная хроматография объектов исследования.

В 4 случаях, когда пятна крови располагались на китайском шелке, искусственной шелке, бархате и вельвете, результаты РАЭ выпадали отрицательными. Это объясняется тем, что образцы перечисленных тканей во время промывания расщепляются на очень мелкие ниточки и, тем самым, затрудняют дальнейшее исследование.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что в предварительно хроматографированных объектах, независимо от расположения пятен на различных по качеству и окраске текстильных тканях легко определяются и наличие, и группа крови. Сравнительное исследование хроматографированных и обработанных метиловым спиртом пятен крови на текстильных тканях, красители которых растворяются в системе растворителя бутанол-аммиак, показало преимущество метода хроматографии не только с точки зрения экономии материала, но и с позиций качественного различия, а именно: в хроматографированных образцах выявляются антигены крови с более высокой степенью активности, чем в следах крови, не подвергавшихся предварительному хроматографическому исследованию.

### ГЛАВА III. НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ В ПЯТНАХ МЕТОДОМ БИОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Комплексная программа научных исследований по проблеме «Судебно-биологическое исследование вещественных доказательств», предусматривает усовершенствование существующих и разработку новых методов исследования с целью идентификации личности.

Известно, что реакция абсорбции агглютининов в количественной модификации трудоемка, требует большого количества материала исследования, предметы-носители, на которых находятся пятна крови, влияют на результаты исследования, так же, как и различные вещества, с которыми смешивается кровь в пятне. Остается нерешенным ряд вопросов, связанных с постановкой РАЭ и РСА, а именно: для их постановки необходимы цельные сыворотки альфа и бета в высоком титре (от 1:128 до 1:512), а, кроме того, затрачивается много времени и большое количество лабораторной посуды; при промывании объекта физраствором механически повреждается исследуемое волокно и образец разволокняется на мелкие волоконца, что значительно затрудняет дальнейшие исследования; в результате промывания образца (недостаточного) выпадает неспецифическая агглютинация и, наоборот, сильное отмывание исследуемого объекта сопровождается значительным уменьшением количества комплекса антиген-антитело, что в свою очередь, снижает специфичность способа и точность получаемых результатов. Изложенное, несомненно, явилось основанием для усовершенствования и разработки новых модификаций метода определения группы крови в следах.

Однако, к сожалению, ни одна из предложенных на сегодня модификаций не удовлетворяет экспертных требований, т.к. каждая из них только частично устраняет перечисленные выше недостатки. Это доказано рядом проверочных работ.

Таким образом, реакции абсорбции агглютининов, РАЭ и РСА обладают рядом недостатков. Это оправдывает стремление ученых разработать способы, направленные на их устранение.

За последнее время для определения антител и антигенов особое внимание привлекает метод аффинной хроматографии. Первое сообщение об использовании данного метода принадлежат Д. Х. Кэмпбел. Для выделения антител авторы использовали колонку с целлюлозой, содержащей ковалентно связанный антиген.

Вопросами применения аффинной биоспецифической адсорбционной хроматографии для получения чистых антител в нашей стране занимался ряд авторов А. К. Антонян.

Особый интерес для судебных медиков представляет определение агглютининов и агглютиногенов, т.е. определение группы крови, однако в этом направлении пока встречаются лишь единичные сообщения Т. Кристиансен.

В доступной литературе мало работ, посвященных использованию метода аффинной хроматографии для определения группы крови в следах. Между тем есть все основания считать данный метод перспективным в экспертизе вещественных доказательств.

Биоспецифическая адсорбционная (аффинная) хроматография предназначена для выделения биологических макромолекул путем простой сорбции на специфическом сорбенте. Это доказывает специфические особенности метода и ряд его преимуществ по сравнению с другими видами сорбционной и жидкостной хроматографии, поскольку открывает своеобразие биологических процессов на молекулярном уровне.

Биоспецифическая адсорбционная хроматография – новый эффективный метод выделения и очистки биополимеров и клеточных структур. В отличие от других методов очистки биологически активных веществ, основанных на физикохимических различиях (размер молекул, молекулярный вес, заряд и т.д.), используется уникальное свойство биополимеров – их биологическая функция, т.е. способность специфически и обратимо взаимодействовать с определенными веществами. Эти вещества, получившие название лиганды, ковалентно связываясь с твердым носителем, образуют биоспецифический адсорбент. Последний может избирательно удерживать из разделяющей смеси биополимер, имеющий сродство к иммобилизованному лиганду. Изменение условий приводит к выделению (элюции) адсорбированного вещества в чистом виде.

Таким образом, одним из важных вопросов, требующих решения, является получение иммобилизованных антител или антигенов при определении неизвестной группы крови.

При решении проблемы получения иммобилизованных антигенов крови системы АВО немаловажное значение имеет подбор подходящего носителя. Известны требования, предъявляемые к носителям, в частности они не должны инактивировать антиген и должны обладать гидрофильными физико-механическими свойствами.

Из литературы известно, что при биоспецифической адсорбционной хроматографии носители по существу выполняют и функцию матрицы для лигандов. Для определения антигенов предложены два типа носителей: органические (природные, синтетические) и неорганические.

Практика судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств подтверждает, что носителями следов крови в подавляющем большинстве случаев являются текстильные ткани (хлопчатобумажные, шерстяные, шелковые, искусственные и др.). Если волокна перечисленных тканей не инактивируют антигенов и обладают гидрофильными физико-техническими свойствами, а агглютиногены системы АВО могут прочно фиксироваться на них (при воздействии некоторых факторов) и особенно на волокнах хлопчатобумажных изделий, то не исключена возможность использования этих свойств для иммобилизации лигандов при биоспецифической адсорбционной хроматографии. Именно на этой основе был разработан новый способ определения агглютиногенов (системы АВО) крови в следах по принципу биоспецифической адсорбционной хроматографии. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционной реакцией абсорбции-элюции.

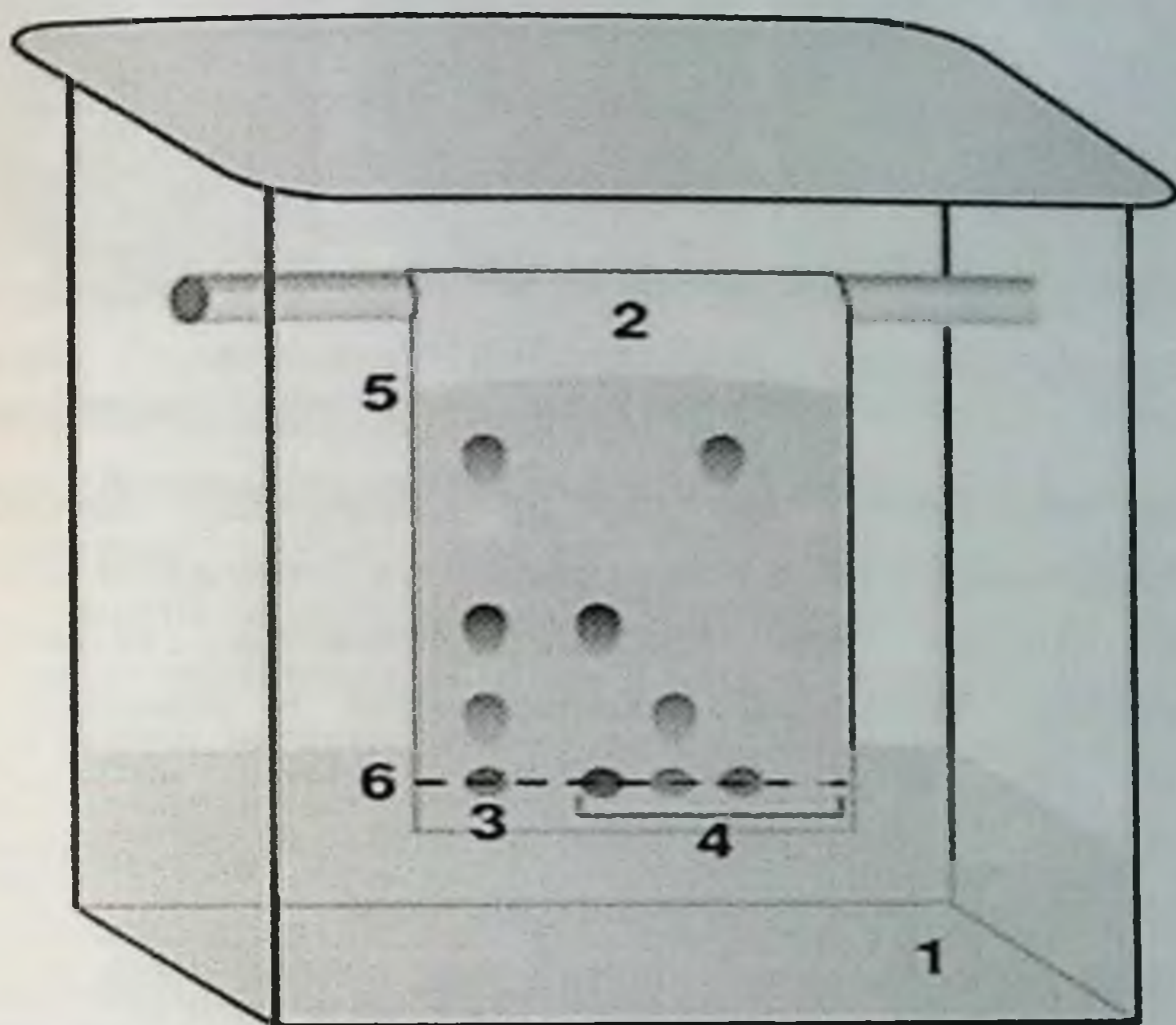
При разработке метода авторы перед собой ставили задачу, чтобы он был легко выполнимым, позволял проводить серийные исследования и, самое главное, чтобы можно было избежать процесса трудоемкой промывки неспецифично связанных антител (агглютининов альфа и бета) холодным физиологическим раствором хлористого натрия. И, наконец, необходимо было, чтобы разработанная модификация позволяла работать не с цельной

сывороткой (альфа и бета), как это принято в РАЭ, а с разведенными сыворотками, т.к. из литературы известно, что в иммунохимических исследованиях удельная абсорбция антител, т.е. осаждение глобулинов сыворотки на поверхности антигена выше при значительном разведении сывороток. Отсюда понятно, что разработка способа, обладающего свойством эффективно использовать сильно разведенные сыворотки альфа и бета не только способствует специфической абсорбции, но и дает возможность избежать трудоемкой промывки неспецифично связанных антител, имеющих место при применении неразведенных сывороток высокого титра.

Поставленная цель достигается тем, что исследуемый образец после определения наличия крови методом хроматографии на бумаге просушивают и повторно хроматографируют, пропуская через иммобилизованный антиген потоки разведенных сывороток.

Способ осуществляется следующим образом. Для исследования берут, например, ниточки длиной 0,4-0,5 см и вставляют их в проколы на местах хроматографической бумаги, нижний прокол делают у линии старта, которая проводится на листе, отступя от его края на 1 см. Один лист обозначают буквой альфа, другой – бета. Каждый лист в отдельности с закрепленными на них объектами исследования помещают в хроматографическую камеру таким образом, чтобы нижний конец, где обозначена линия старта, каждого листа соприкасался с налитым на дно камеры растворителем – бутанол-аммиаком в соотношении 7:3. Через 30-40 мин. хроматограмму вынимают из камеры и просушивают при комнатной температуре до полного испарения влаги. Затем листы бумаги снова помещают в хроматографическую камеру так, чтобы конец листа, обозначенный буквой альфа, соприкасался с разведенной физиологическим раствором альфа-сывороткой, а конец листа, обозначенного буквой бета – с разведенной бета-сывороткой (рис.6). Камеру закрывают и в течение 18 часов проводят повторную хроматографию. Затем хроматограммы вынимают, ниточки снимают с проколов и элюируют из них абсорбированные ранее антитела при температуре  $55^{\circ}$  в течение 20 мин. Затем в элюат добавляют эритроциты группы А и В и центрифугируют 4 мин. при 1000 об/мин. При этом, если в пятне содержится агглютиноген А, в элюате

обнаруживается только агглютинин альфа, а если имеется агглютиноген В, то выявляется агглютинин бета. При наличии в пятне агглютиногенов А и В в элюате определяют оба агглютинина. В элюатах контрольных незапятнанных ниточек агглютинины альфа и бета не обнаруживаются.

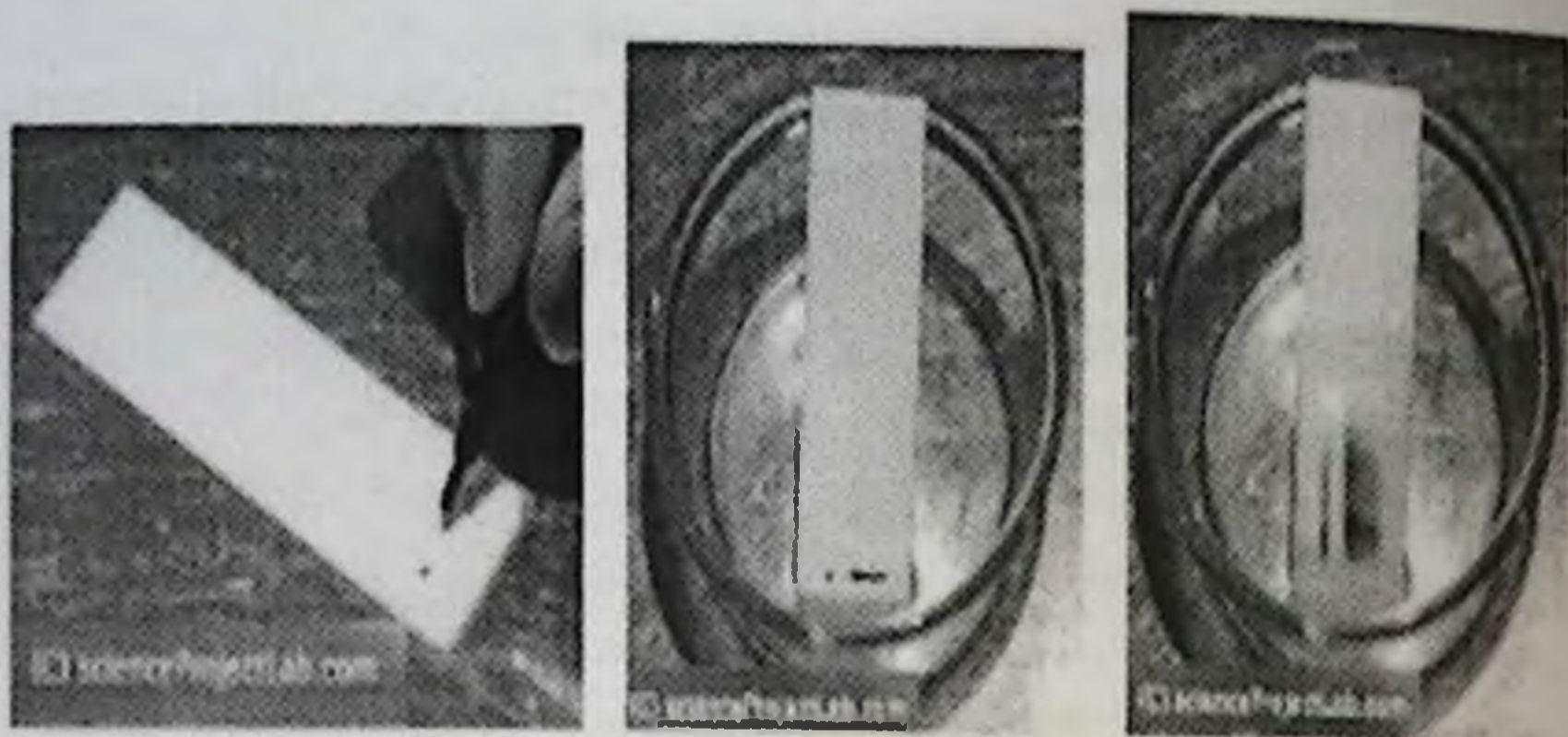


Бумажная хроматография: 1 — растворитель, 2 — бумага, 3 — образец исследуемой смеси, 4 — образцы потенциальных компонентов, 5 — капиллярное продвижение растворителя, 6 — стартовая линия для образцов

Рисунок 13. Биоспецифическая адсорбционная хроматография.

1 — установленные к стенкам камеры стеклянные трубочки в виде мостика; 2 — бумагодержатели - стеклянные трубочки, прикрепленные между собой резиновыми кольцами; 3 — листы хроматографической бумаги, начерченные на полоски; 4 — лодочка с сывороткой альфа; 5 — ниточка из объектов исследования; 6 — лодочка с сывороткой бета.





*Рисунок 14. Биоспецифическая адсорбционная хроматография.*

Это объясняется тем, что при разведении сыворотки в физиологическом растворе в нем содержится очень малое количество антител, которые при хроматографировании, встречаясь с одноименными антигенами, задерживаются и накапливаются в ниточке. При встрече с неоднородными антигенами и контрольными предмет-носителями антитела не задерживаются и протекают по току физиологического раствора.

Таким образом, разработанный ими способ легко выполним, доступен, сокращает время, необходимое для обнаружения агглютиногенов, позволяет одновременно исследовать большое количество объектов (30-40 более в зависимости от количества лодочек и объема камеры). В нем могут быть использованы разведенные сыворотки и самое главное, он позволяет избегать трудоемкого процесса промывания неспецифически связанных антител холодным физиологическим раствором, так как при таких разведениях неспецифического абсорбирования не происходит.

Следует отметить, что антиген крови (биополимер) после хроматографирования в системе растворителя бутанол-аммиак иммобилизуется, то есть переводится в нерастворимое состояние путем связывания с ниточкой (носителем), что называется лигандом (вещество, присоединенное к носителю ковалентными связями и

способное биоспецифически взаимодействовать с выделяемым биополимером). Волокно ткани как носитель, отвечает определенным требованиям, предъявляемым носителям при аффинной хроматографии, а именно: он не должен инактивировать антиген и должен обладать гидрофильными физико-механическими свойствами. Именно всеми этими свойствами обладает и хроматографическая бумага. Она служит матрицей, в силу своей капиллярности способствует передвижению разделяемой смеси по своей поверхности, следовательно, и через волокно с фиксированным на нем антигеном. В данном случае носитель и лиганд (волокно и фиксированный антиген) именуется биоспецифическим адсорбентом, способным избирательно взаимодействовать с выделяемым биополимером (агглютинином).

Таким образом, предложенный способ обнаружения антигенов крови системы АВО основан на принципе аффинной, биоспецифической адсорбционной хроматографии, т.е. на способе хроматографии агглютининов альфа и бета по сродству. При этом в качестве сорбента нерастворимого лиганда служили агглютиногены А и В, фиксированные на хлопчатобумажной нитке, прикрепленной к хроматографической бумажной полоске. Специфические силы сродства, лежащие в основе биологических функций антигена позволяют избирательно и эффективно выделять чистые антитела из физиологического раствора, поскольку антитела узнают лишь «свои» антигенные детерминанты с очень высокой степенью избирательности. Именно эта особенность биохимических реакций лежит в основе аффинной хроматографии, т.е. в специфичности сорбции.

Таким образом, разработанный метод определения группы крови (системы АВО) в пятне, по принципу биоспецифической адсорбционной хроматографии обеспечивает специфичность и точность определения, прост, легко доступен и позволяет одновременно исследовать большое количество объектов. Использование данного метода обеспечивает возможность проведения последовательного установления наличия крови и ее группы на одном и том же объекте, что значительно упрощает весь процесс исследования и повышает производительность труда эксперта, резко сокращая необходимое количество лабораторной посуды.

### Чувствительность метода, оптимальная температура, разведение сывороток и время хроматографирования

При аффинной хроматографии обычно специфические взаимодействия осуществляются в водных растворах, но при определенной ионной силе и температуре. Отклонение от оптимальных условий может обратимо тормозить взаимодействие антигена и антитела. Это объясняется изменением уникальной пространственной конфигурации биополимеров и позволяет осуществлять направленное изменение скорости процесса. Известно, например, что при повышении температуры и ионной силы комплекс антиген-антитело может распадаться в ту или иную сторону от нейтральной зоны. Исходя из этого, они посчитали интересным проверить оптимальные температурные условия, при которых происходит максимальное комплексное образование антиген-антитело.

При использовании реакций абсорбции агглютининов и абсорбции-элюции апробированы различные температурные условия и наиболее приемлемыми считается абсорбирование при низкой температуре. В связи с этим мы решили провести хроматографирование объектов в холодильнике при различных экспозициях. Результаты исследования оказались неудачными, после чего было проведено сравнительное исследование одних тех же объектов при трех температурных условиях: при комнатной, в холодильнике при температуре  $4^{\circ}$  и в термостате – при  $37^{\circ}$ . Хроматография во всех случаях производилась в течение 18 часов. Одновременно исследовалось 4 пятна крови двухдневной давности. Два пятна были второй, два – третьей группы. Результаты исследования приведены на рисунке 7. Как видно из рисунка, при хроматографировании в термостате специфического связывания антигена с антителом не происходило, тогда как хроматографирование в холодильнике сопровождалось образованием незначительной связи комплекса антитела-антигена. Оптимальным температурным режимом оказалась комнатная температура ( $18^{\circ}$ ), когда при соблюдении других равных условий были получены хорошие результаты (+++).

Итак, было установлено, что оптимальным температурным

режимом для хроматографии является комнатная температура (18°). Вместе с тем наиболее благоприятная продолжительность процесса хроматографирования оставалась невыясненной.

Учитывая, что соприкосновение растворенного биополимера (агглютинина) с иммобилизованным антигеном происходит очень быстро, мы попытались выяснить, следует ли сократить время хроматографирования, либо, наоборот, продлить его, чтобы происходило предельное накопление антитела на предполагаемом антигене.

Для проверки этих данных исследовано 20 пятен крови (10 относились ко второй группе и остальные 10 – к третьей группе) с различными абсорбционными способностями.

Все 20 объектов исследовались одновременно в одинаковых условиях. Каждый объект исследовался до 13 раз. Первый раз хроматографирование (с растворенными в физиологическом растворе агглютинидами альфа и бета) производилось в течение одного часа. В последующем ниточки из этого же объекта исследовались еще 12 раз. Причем второй раз процесс хроматографирования продолжался 2 часа, а затем каждое последующее исследование на два часа превышало время предыдущего исследования. Таким образом, экспозиция последнего образца продолжалась 24 часа.

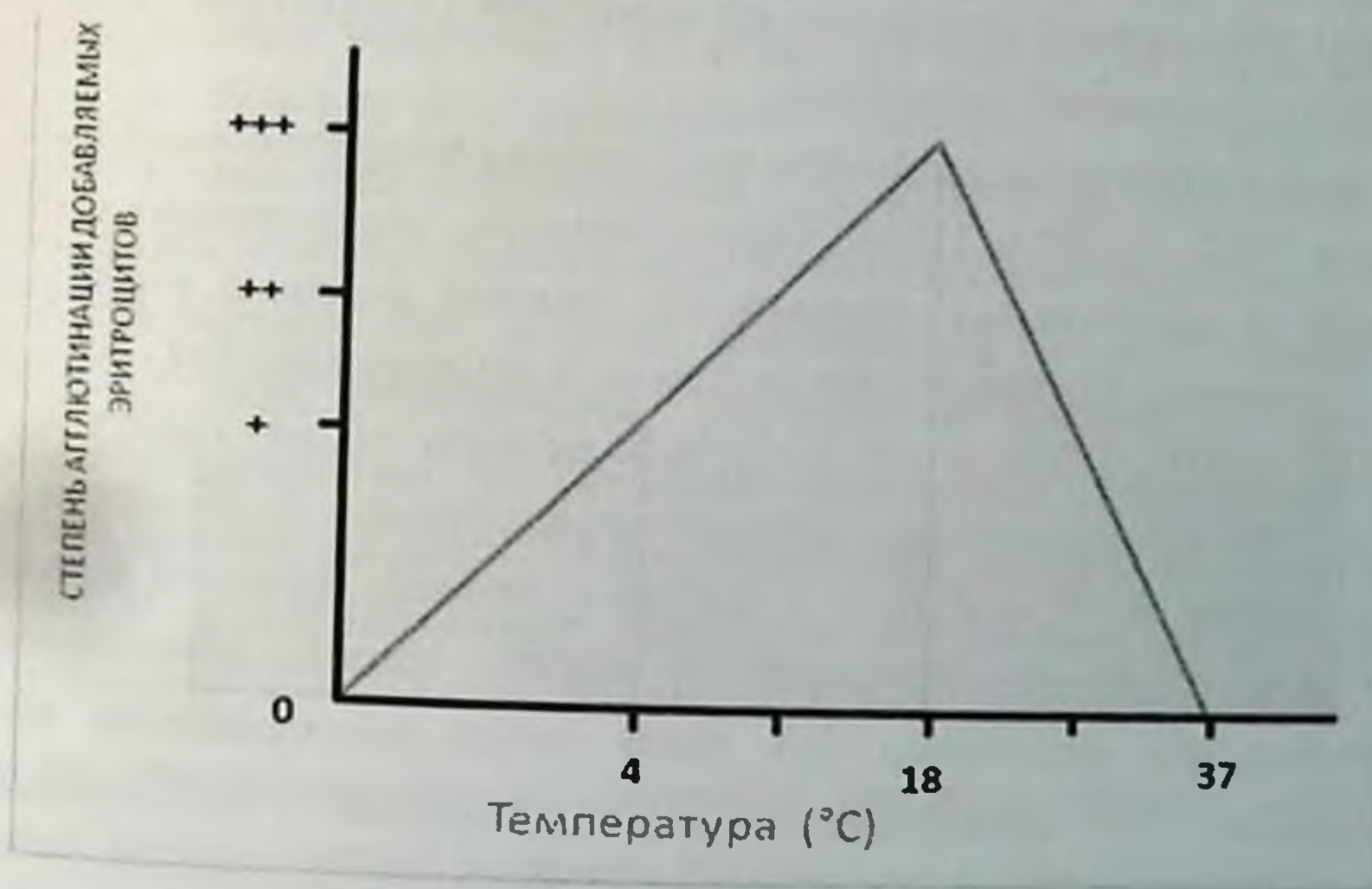
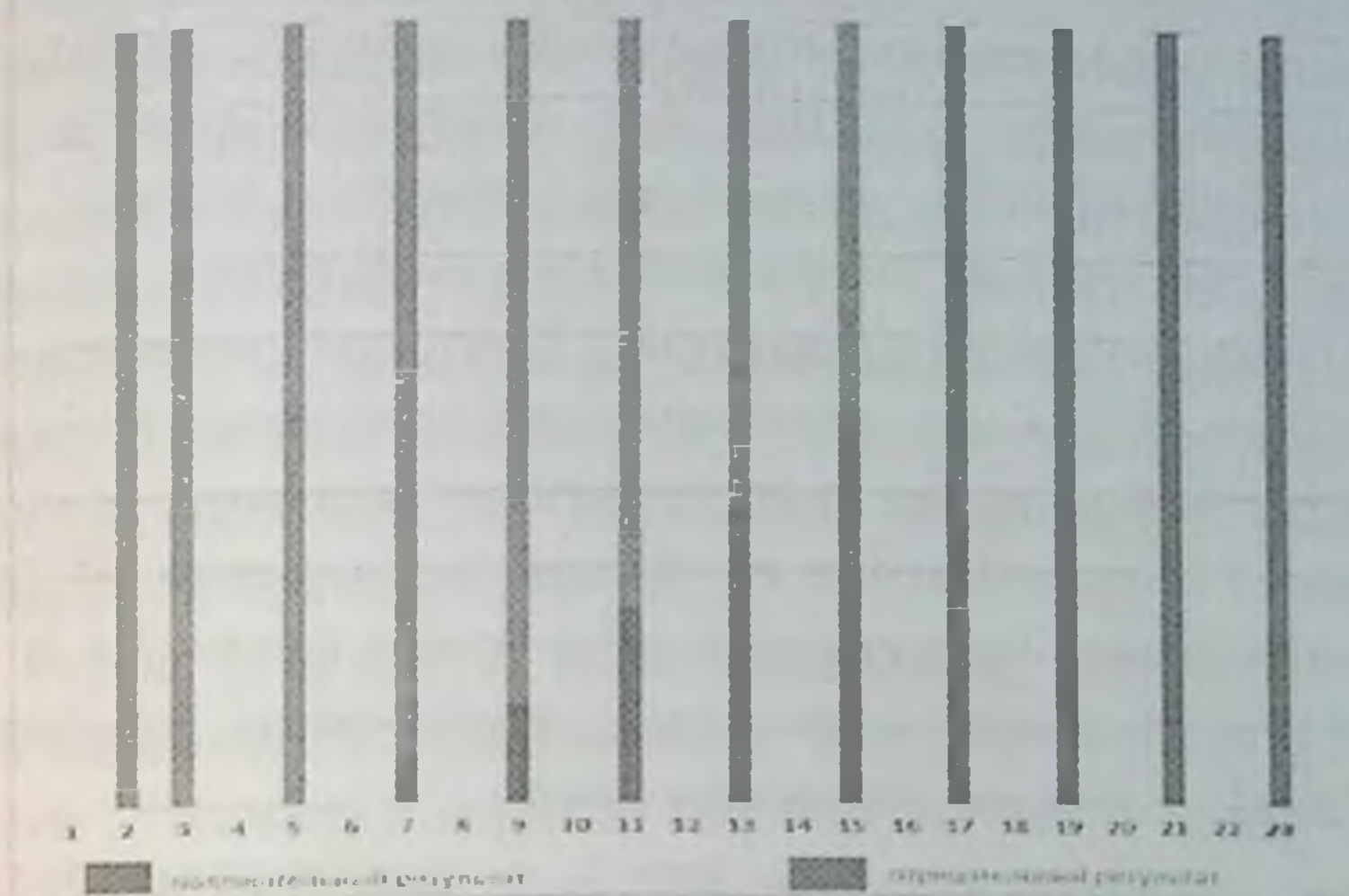


Рис. 15 Взаимосвязь температурных условий и результатов исследования

Результаты исследования 20 образцов крови дали разные результаты. При хроматографировании объектов от 1 до 4 часов агглютиногены выявить не удалось. Они начали обнаруживаться только по истечении 6 часов хроматографирования (рис.8). Из рисунка видно, что оптимальные результаты получены при хроматографировании в течение 16 часов. В дальнейшем результаты стабилизировались до конца исследований (24 часа). Проверка выполнялась на 20 образцах крови.

Таким образом, установлено, что оптимальными условиями проведения биоспецифической хроматографии является комнатная температура, а время хроматографирования – 16-18 часов. Наряду с этим неясным оставалось каким должно быть предельное разведение сыворотки крови для получения максимального специфического абсорбирования антитела с антигеном, либо абсолютно не должно происходить неспецифические связывание агглютининов, в том числе и с предмет-носителем. Подбор таких оптимальных разведений очень важен для аффинной хроматографии, поскольку известно, что в иммунологических исследованиях удельная абсорбция антител, т.е. осаждение глобулинов сыворотки на поверхности антигена тем выше, чем больше разведение сыворотки.

С этой целью исследовались по 2 серии сывороток альфа и бета с титрами 1:64, 1:128 и 1:256. Таким образом, исследовано 6 серий сывороток с различными титрами. Из каждой серии в стерильном физиологическом растворе приготавливали 8 разведений: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 и 1:512. Этими разведенными сыворотками альфа и бета производилось хроматографирование 5 объектов (2 с группой крови А, 2 – с В и 1 пятно с первой группой крови) и контрольные предметы-носители – чистая марля. Исследования проводились по истечении 2-3 дней после изготовления пятен. Контрольные и экспериментальные образцы исследовались одновременно в одинаковых условиях.



*Рис. 16. Зависимость результатов реакции от продолжительности хроматографирования (абсорбция)*

Проверка авторами результатов шести сывороток с различными титрами разведения показала принципиально различные данные. Между титром абсорбируемых сывороток и разведением в физрастворе отмечалась значительная разница (рис.9). Хорошие результаты были получены с разведением сывороток альфа и бета не ниже 1:64. Причем при разведении сыворотки в физиологическом растворе в меньшем соотношении 1:32 (при титре сыворотки 1:128) мобильность антител снижалась и образовывались ложные связи антиген-антитело. Это, видимо, объясняется высоким содержанием антител в этих разведениях, особенно в первых, которые при хроматографировании не образуют комплекса антиген-антитело, а просто с первой же порцией растворенного лиганда насыщают саму ниточку и в последующем вызывают агглютинацию стандартных эритроцитов.

Не специфически насыщенные антитела можно удалять из ниточек промыванием ледяным физиологическим раствором, однако этот процесс очень трудоемок и длителен. Это побудило их попытаться разработать такой способ, который позволил бы

исключить процесс промывки, что и удалось добиться, используя сыворотку в разведении 1:32. При этом физиологический раствор содержит незначительное количество антител, которые при соответствии с антигенами, содержащимися в исследуемых ниточках, образуют комплекс антиген-антитело. Благодаря непрерывному потоку разведенных антител, количество этих комплексов постоянно увеличивается. Если антитела не соответствуют антигенам, то они не задерживаются и продвигаются по фронту растворителя. В более высоких разведениях содержание антител резко снижается и для образования достаточного количества специфических комплексов потребуется много времени (48 часов и более).

Анализ экспериментальных пятен с различными титрами стандартных сывороток показал, что наиболее приемлемым является их разведение 1:32 при титре сывороток 1:128 и 1:64 при титре 1:256.

Таким образом, разработанная авторами методика определения группы крови системы АВО в следах (по типу аффинной хроматографии) оказалась температура ( $18^{\circ}$ ) в течение 16-18 часов с предельно разведенными сыворотками альфа и бета в физрастворе 1:32 при титре 1:128 и 1:64 при титре 1:256.



*Рис. 17. Взаимосвязь между титром абсорбируемых сывороток и разведением их в физрастворе*

Оставалось выяснить чувствительность разработанного метода.

В ходе исследования, наряду с разведенными сыворотками альфа и бета, решили проверить возможность использования экстракта анти-Н из семян раkitника сидячелистного для определения антигена О (Н).

При этом установлена возможность определения данным методом выявления антигена О/Н/. Однако, наиболее приемлемым оказалось приготовление разведения экстракта физиологическим раствором 1:8 при титре 1:64.

Чтобы установить, какое наименьшее количество антигена крови определяется предлагаемым методом, исследовали кровь 8 доноров (7 женщин в возрасте 18-35 лет и 1 мужчина 29 лет). Кровь брали из локтевой вены. 4 образца были второй и 4 – третьей группы. Непосредственно после взятия крови ее разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:110, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180, 1:190, 1:200 в химические пробирки. Таким образом, из каждого образца крови были приготовлены разведения с различным содержанием искомым веществ.

Учитывая, что в практике судебно-медицинской экспертизы в основном приходится определять группу крови в пятнах, расположенных на текстильных тканях, исследователи изготовили экспериментальные пятна крови на белой фабричной нити № 3 почти одинаковой толщины на всем протяжении. С этой целью из каждого разведения брали по 0,04 мл жидкости и ею пропитывали нитку на протяжении 4 см. Нить высушивали при комнатной температуре, а на следующий день исследовали. Для этого два листа хроматографической бумаги размером 15x25 см линовали простым карандашом на 15 равных полосок, которые нумеровали от 1 до 15. Затем объекты (нити по 4 мм), пропитанные кровью одного донора, вставляли в проколы у стартовой линии каждой полоски и помещали в хроматографическую камеру. Таким образом в одних и тех же условиях, одновременно исследовалось 15 разведений крови каждого донора с изосыворотками альфа и бета отдельно.



Таблица 9.

**Результаты аффинной хроматографии пятен крови 8 доноров в различных разведениях**

Разведение	Количество выявленных агглютиногенов		Количество не выявленных агглютиногенов		
	А	В	А	В	
1.	1:20	4	4	-	-
2.	1:40	4	4	-	-
3.	1:60	4	4	-	-
4.	1:80	4	4	-	-
5.	1:100	4	4	-	-
6.	1:110	3	4	1	-
7.	1:120	3	3	1	1
8.	1:130	2	3	2	1
9.	1:140	1	2	3	2
10.	1:150	1	1	3	3
11.	1:160	-	-	4	4
12.	1:170	-	-	4	4
13.	1:180	-	-	4	4
14.	1:190	-	-	4	4
15.	1:200	-	-	4	4

Результаты исследования крови 4 доноров со второй группой крови (А (II)) и 4 – с третьей группой крови (В (III)) показали, что интенсивность агглютинации разбавленной крови разных лиц неодинакова, что зависит от степени выраженности антигена, т.е. способности изоантигена связывать изоантитела. Во всех случаях интенсивность реакции зависела от концентрации агглютиногенов крови и, начиная с разведения 1:110 в отдельных объектах агглютинации отсутствовала. Таким образом, агглютинация была интенсивнее в пятнах крови с меньшими разведениями и слабее – в пятнах с наиболее высокими разведениями. Результаты хроматографии крови различных людей при разном разведении приведены в таблице 9.

Как видно из таблицы, в объектах с разведением 1:100 агглютиногены А и В обнаруживались во всех случаях. Однако при исследовании объектов с низким содержанием агглютиногенов, т.е. при высоком разведении не только понижалась степень агглютинации, но в ряде случаев отмечалось полное их отсутствие.

Таким образом, проверка чувствительности метода показала, что пятно, образованное 0,004 мг крови содержит минимальное количество агглютиногенов, необходимое для получения удовлетворительных результатов.

### Исследование пятен крови, расположенных на различных текстильных тканях

Из практики судебно-медицинской экспертизы известно, что пятна крови встречаются на самых разнообразных предметах-носителях, которые могут быть представлены в качестве вещественного доказательства. В большинстве случаев это одежда или постельная принадлежность. Отсюда возникает необходимость определения агглютиногенов в следах крови, расположенных на разнообразных текстильных тканях.

Для приготовления экспериментальных пятен авторы использовали кровь 20 доноров в возрасте 22-40 лет. Предварительное определение группы крови у них показало, что у 4 из них кровь была первой группы, у 5 – второй, у 7 – третьей и у 4 – четвертой группы. Из крови всех доноров готовили пятна на разнообразных по расцветке и сорту тканях. Всего было приготовлено 20 пятен, в том числе 10 – на хлопчатобумажных тканях, 7 – на натуральных и искусственных шелковых тканях и 3 – на шерстяных и полушерстяных тканях.

Текстильные ткани перед нанесением на них жидкой крови расправляли на чистом сухом стекле. Пятна готовили по возможности одинаковой плотности при комнатной температуре, непосредственно после взятия крови из локтевой вены, приблизив таким образом условия опыта к обычным обстоятельствам попадания крови на одежду и постель обвиняемых или пострадавших.

С момента приготовления пятен до хроматографического исследования проходило от 2 суток до 3 недель. Параллельно с исследованием пятен крови исследовали и предмет-носители этих пятен.

Во всех пятнах крови заведомо известных групп на волокнах текстильных тканей методом аффинной хроматографии были выявлены агглютиногены. На контрольных образцах тканей агглютиногены ни в одном случае не обнаружены, т.е. текстильные ткани не влияли на обнаружение агглютиногенов АВО.

Необходимо отметить, что в 2 случаях пятна крови, расположенные на искусственных шелковых изделиях было трудно закрепить в проколы, т.к. они разволокнялись на отдельные волокна, хотя агглютиногены в них выявлялись хорошо.

Таким образом, установлено, что метод биоспецифической адсорбционной (аффинной) хроматографии вполне соответствует для определения антигенов (системы АВО) в пятнах крови, расположенных на разнообразных тканях.

### **Обнаружение агглютиногенов АВО в пятнах крови, смешанных с некоторыми выделениями**

В своей практической деятельности судебно-медицинскому эксперту нередко приходится иметь дело с исследованиями пятен крови, смешанных с выделениями человеческого организма. Это может привести к ошибкам, потому что существующими методами как агглютиноген крови, так и агглютиногены выделенной одинаково хорошо выявляются. Следовательно, при смешивании крови одного человека с выделениями другого происходит взаимная маскировка, что, естественно, затрудняет или даже препятствует определению групповой принадлежности (Л.О. Барсегянц, Б.Д. Левченков, 1978).

Изложенное дает основание считать отыскание способов, позволяющих дифференцировать антигены крови от антигенов выделений в смешанных пятнах, одной из важных задач судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств, т.к. выявление чистых антигенов крови в пятнах с примесями выделений

способно предотвратить возможные ошибки при определении групповой принадлежности крови.

Одним из свойств выделительства является растворимость его антигенов в воде. Это свойство использовалось рядом авторов для идентификации антигенов крови от антигенов слюны, спермы, мочи и др. (М.С. Свирский 1975, 1976 и др.).

Установлено, что мембраны эритроцитов не секретизирующих индивидуумов содержат в качестве антигенов АВО(Н) только гликолипиды. В эритроцитах секретизирующих лиц помимо гликолипидов имеются активные агглютиногены, возможно, гликопротеиновой природы. Это свойство послужило основанием к разработке метода, который путем предварительного разделения смешанных пятен крови с выделениями определяет антигены, свойственные крови и относящиеся к выделениям (М.С. Свирский 1975). Однако этот метод трудоемок и требует много времени, что и обуславливает дальнейшие поиски более приемлемых методик.

Известно, что при определении группы крови (системы АВО) предложенным авторам методом – аффинной хроматографии при потоке растворителя через иммобилизованный лиганд (антиген) на поверхности антигена накапливается одноименный биополимер (агглютинин). Если учесть, что антигены выделений (пот, слюна, моча, сперма и т.д.) водорастворимые вещества, то не исключена возможность самопроизвольного отделения этих антигенов (из ниточки) и исчезновение их с потоком физиологического раствора к фронту растворителя, т.е. очистка агглютиногенов крови от антигенов выделений при наличии их в пятнах.

Чтобы проверить данное предположение, мы готовили экспериментальные пятна крови, слюны, пота, спермы, мочи как в отдельности, так и в смешанном виде. Следует отметить, что образцы слюны и мочи перед приготовлением пятен центрифугировались с целью удаления клеток, если таковые имеются, и брались над осадок.

Пятна выделений и крови готовили при комнатной температуре на индифферентном предмет-носителе – чистой марле. Образцы высушивали без доступа прямых солнечных лучей. Пятна выделений

старались готовить насыщенными, а затем над ними наносили менее выраженные следы крови.

Следует отметить, что пятна пота приготавливали путем накладывания чистой марли в подмышечную впадину или вытиранием чистой марлей вспотевших участков тела, а пятна других выделений (моча, слюна, сперма) брали от доноров и сразу же наносили на расправленные кусочки чистой марли.

Для изучения пятен крови с примесью одного из упомянутых выделений, например спермы, приготавливали 48 образцов. При этом старались охватить все возможные варианты смешивания. Каждую группу крови проверяли со смесью спермы 4 мужчин с разной группой крови. Наряду с исследованием 4 пятен крови, смешанных с пятнами спермы, параллельно исследовали в отдельности пятна крови и спермы этих же лиц. Таким образом, для анализа одной группы крови, смешанной с спермой требовалось изготовить 12 образцов. Если учесть, что исследование подвергались все четыре группы крови по системе АВО, то в общей сложности было приготовлено 48 образцов.

По такому же принципу приготавливали пятна крови с примесью слюны, мочи, пота, т.е. всего авторами было приготовлено и исследовано 192 экспериментальных пятна.

Следует отметить, что при изучении возможности обнаружения агглютиногенов крови в смешанных пятнах старались проводить исследования в идентичных условиях.

Перед приготовлением пятен из спермы, слюны, мочи, пота доноров проверяли на выделительство и только при наличии последнего выделения были использованы в качестве объектов исследования.

Исследование 16 пятен спермы с примесью крови и 16 нейтральных пятен крови методом аффинной хроматографии выявило агглютиногены крови во всех случаях. Однако при исследовании пятен спермы в идентичных условиях эксперимента в 14 из 16 образцов агглютиногены не обнаружены и в 2 случаях (при изучении пятен спермы со второй и четвертой группами) были

получены сомнительные реакции. При исследовании же пятен крови с примесью спермы только в одном образце (из 16) была получена слабо выраженная положительная реакция на антиген спермы. В таблице 10 приведены результаты исследования экспериментальных пятен крови второй группы с примесью спермы разных доноров.

Изучение 144 пятен слюны, мочи и пота с примесью крови, а также контрольных пятен крови без выделений дало такие же результаты. Агглютиногены крови как в чистых (не смешанных), так и в смешанных пятнах были четко выявлены во всех случаях.

Однако ни в одном образце пота, мочи и слюны агглютиногены установить не удалось, за исключением двух образцов слюны (из 16), когда были получены сомнительные результаты, но при повторных исследованиях и они были отрицательными.

Таблица 10.

*Исследование пятен крови второй группы с примесью спермы в различных вариантах смешивания*

	Объект исследования	Содержание агглютиногенов	Реакция агглютинации при добавлении к элюанту эритроцитов после хроматографии			Агглютиногены, выявленные аффинной хроматографией
			А	В	О	
1.	Кровь группы А(II)	А	+++	-	-	А
	Та же кровь с примесью спермы группы О(I)	А, О	+++	-	-	А
	Сперма группы О(I)	О	-	-	-	-
2.	Кровь группы А(II)	А	+++	-	-	А
	Та же кровь с примесью спермы группы А(II)	А	+++	-	-	А
	Сперма группы А(II)	А	-	-	-	-

Кровь группы А(II)	А	+++	-	-	А
Та же кровь с примесью спермы группы В (III)	А, В	+++	-	-	А
Сперма группы В(III)	В	-	-	-	-
Кровь группы А(II)	А	+++	-	-	А
Та же кровь с примесью спермы группы АВ(IV)	А, В	++	+	-	А, В
Сперма группы АВ(IV)	А, В	-	+	-	В

Таким образом, при аффинной хроматографии пятен крови с примесью пота, слюны, мочи и спермы выявляются агглютиногены крови, тогда как антигены этих выделений не определяются. На взгляд авторов, это обусловлено тем, что эти антигены, как водорастворимые вещества, не удерживаются на предмете-носителе (ниточки) и, возможно, выносятся потоком физиологического раствора вверх, не образуя комплекса антиген-антитело за счет постоянного накопления растворенного в физиологическом растворе агглютинина.

### Сравнительная оценка результатов исследования экспертных материалов реакцией абсорбции-элюции и методом аффинной хроматографии

Проведенные исследования на большом экспериментальном материале показали высокую чувствительность, специфичность, доступность и экономичность метода аффинной (биоспецифической адсорбционной) хроматографии, что позволило использовать его при исследовании пятен крови, расположенных на различных предметах-носителях, следов крови, подвергшихся воздействию высокой

температуры, солнечных лучей; при исследовании пятен крови, загрязненных различными веществами, смешанных с различными выделениями человеческого организма. Сравнительное исследование предложенного авторами метода и РАЭ на экспериментальном материале показало преимущество аффинной хроматографии, особенно при исследовании загрязненных объектов.

Это позволило подтвердить целесообразность проведения сравнительного исследования этих двух методов на экспертном материале. С этой целью помимо экспериментальных пятен крови авторы исследовали объекты судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств, поступившие в судебно-биологическую лабораторию Бюро главной судмедэкспертизы Минздрава РУ. Всего исследовано 63 экспертных объекта на различных текстильных тканях, металлических изделиях и др. Указанные пятна были на следующих предметах: на костюме – 3, на брюках – 1, на рубашках – 3, на платьях – 2, на рейтузах – 1, на трусах – 14, на простынях – 7, на наволочке – 1, на полотенце – 2, на чехле автомашины – 5, на карнизе дверцы автомобиля – 2, на бампере – 1, на брызговике – 1, на ломе – 1, на ноже – 1 и 18 образцов крови.

Таким образом, исследовано 57 пятен крови, расположенных на текстильных тканях и 6 следов крови на твердых предметах (нож, резина и т.д.). В каждом случае для исследования двумя методами брали равные по размерам кусочки (ниточки) из одного участка пятна. В тех случаях, когда пятна крови располагались на текстильных тканях, обнаружение групповых антигенов крови производили непосредственно на указанных предметах-носителях и, наоборот, когда пятна располагались на металлических предметах или на других твердых предметах, с поверхности последних предварительно снимали соскобы, которые затем экстрагировали физиологическим раствором. Экстракт переносили на чистую марлю и затем производили исследование.



**Сравнительное исследование экспертного материала методом  
аффинной хроматографии и РАЭ**

	Наименование объектов	Количество объектов	Аффинная хроматография				Реакция абсорбции-элюции			
			+++	++	+	-	+++	++	+	-
1.	Костюм	3	1	2	-	-	-	3	-	-
2.	Брюки	1	-	1	-	-	-	1	-	-
3.	Рубашка	3	1	1	1	-	1	1	1	-
4.	Платье	2	-	2	-	-	-	1	1	-
5.	Рейтузы	1	-	-	1	-	-	-	1	-
6.	Трусы	14	6	6	2	-	4	6	4	-
7.	Простыня	7	5	2	-	-	3	2	2	-
8.	Наволочка	1	-	1	-	-	-	1	-	-
9.	Полотенце	2	-	2	-	-	-	1	1	-
10.	Чехол автомобины	5	1	3	1	-	-	-	-	5
11.	Карниз дверцы автомобиля	2	1	1	-	-	1	1	-	-
12.	Бампер	1	-	1	-	-	-	1	-	-
13.	Брызговик	1	1	-	-	-	1	-	-	-
14.	Лом	1	1	-	-	-	1	-	-	-
15.	Нож	1	1	-	-	-	1	-	-	-
16.	Образцы крови	18	12	6	-	-	12	6	-	-
17.	Всего	63	29	29	5	-	23	24	11	5

Сравнительное исследование 63 экспертных объектов при помощи биоспецифической адсорбционной хроматографии во всех случаях были получены агглютиногены. При исследовании объектов из тех же участков пятен крови реакцией абсорбции-элюции антигены крови выявлены не во всех случаях. Полученные результаты суммированы в таблице 11.

Из таблицы видно, что аффинная хроматография дала хорошо выраженные результаты, а именно: большое число крупных эритроцитарных агглютинатов, различаемых невооруженным глазом (++++) и небольшое число крупных агглютинатов, содержащих по 5-6 эритроцитов, различаемых под микроскопом (++) (58 образцов). Только в 5 случаях результаты оказались слабо выраженными (+), т.е. в поле зрения было небольшое число мелких агглютинатов. Что касается данных РАЭ, то интенсивная реакция (+++ и ++) выявлена в 47 образцах, слабо выраженная реакция (+) – в 11 случаях и в 5 случаях выпали отрицательные результаты. При этом пятна крови находились на чехле автомашины, изготовленном из паролона розовато-красного цвета (акт судебно-медицинской экспертизы № 1097-Т).

Таким образом, если при исследовании вещественных доказательств при помощи биоспецифической адсорбционной хроматографии агглютинины были выявлены во всех случаях, то РАЭ в 5 случаях были получены отрицательные результаты. На взгляд авторов, это объясняется тем, что паролоновая ткань обладает плохой всасываемостью и при промывании физиологическим раствором антигены легко смываются вместе с расщепленными частицами ткани.

Следует отметить, что при применении метода биоспецифической адсорбционной хроматографии объекты закрепляются на бумаге и, кроме того, не требуется промывания объектов от избытка непрореагировавших сывороток. Это позволяет провести групповую идентификацию исследуемых пятен в тех случаях, когда РАЭ дает отрицательный результат.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из первостепенных и постоянных проблем судебно-медицинской экспертизы следов крови остается определение группы крови системы АВО. Оно основано на обнаружении агглютининов и агглютиногенов.

В судебно-медицинской практике наибольшее внимание уделяют агглютиногенам, поскольку агглютинины нестойки к воздействию внешних факторов.

Для обнаружения агглютиногенов в следах предложено много методов и их модификаций. Наиболее широкое применение получила реакция абсорбции агглютининов в количественной модификации. Она основана на поглощающем свойстве агглютиногенов пятен крови одноименных агглютининов из изогемагглютинирующих сывороток. Абсорбированные агглютинины определяются путем проверки титра исходных сывороток.

Следует отметить, что до 1941 года определяли только агглютиногены А и В, тогда как агглютиноген О не исследовался. И только благодаря работам Р.М. Уринсона, получившего путем иммунизации коз бациллами Григорьева-Шига изогемагглютинирующей сыворотки анти-О, появилась возможность обнаружения агглютиногенов О в пятнах. В дальнейшем появились новые возможности получения иммунных сывороток.

Наиболее удовлетворительные результаты реакции абсорбции агглютининов в количественной модификации получены при соотношении 50 мг вырезки из пятна и 0,3 мл сыворотки. Описаны и минимальные соотношения, но не менее 10-15 мг вырезки. Однако в практике судебно-медицинской экспертизы встречаются случаи, когда в распоряжении эксперта может быть совсем незначительное количество материала. В таких случаях стали прибегать к последовательному определению антигенов АВО в одной и той же навеске из пятна. В ходе проверок предложенных способов установлено влияние ряда факторов на результаты реакции

абсорбции агглютининов. Это, прежде всего, особенности исследуемой крови и предмета-носителя, на котором находится пятно. Из-за влияния незапятнанных предметов-носителей на сыворотки, при реакции абсорбции агглютининов, в ряде случаев (20-30%) групповая принадлежность не определяется. Контрольные незапятнанные предметы-носители воздействуют на сыворотки в основном своими свойствами (красители и прочие), неспецифическими загрязнителями предметов и специфическими загрязнителями — выделениями человеческого организма, содержащими агглютиногены АВО. Последние не могут препятствовать определению группы крови, но могут исказить ее изосерологическую характеристику. Для устранения влияния предметов-носителей стали изменять количественные соотношения между материалами и стандартными сыворотками и ряд других модификаций.

Как видно из приведенного, предложен ряд модификаций реакции абсорбции агглютининов. Они направлены на изменение условий проведения реакции и выбора подходящих количественных соотношений исследуемого пятна крови и предмета-носителя, а также количества агглютинирующих сывороток определенного титра в зависимости от конкретных условий каждого случая.

Помимо этих факторов существует и другие причины: фактор времени, загрязнение плесневыми грибами, активность сывороток и агглютиногенов, наличие так называемых дополнительных агглютининов, примесь животной крови и т.д.

Кроме того, следует отметить, что антигены системы АВО обнаружены не только в крови человека и в различных его выделениях, но и в составе многих высших растений, микробов, вирусов и др.

Реакция абсорбция агглютининов в количественной модификации требует много времени и на ее результаты влияют предметы-носители. Наряду с этим определенное влияние имеют и различные вещества, с которыми смешиваются пятна крови.

Изложенное поставило перед судебно-медицинскими экспертами задачу усовершенствовать и разработать новые модификации реакции абсорбции агглютининов для устранения или уменьшения указанных недостатков. Однако ни одна из разработанных на сегодня реакций или их модификации не удовлетворяют требованиям экспертизы, т.к. ни одна из них полностью не устраняет отрицательного влияния перечисленных выше факторов. Следовательно, разработка метода, способного устранить эти недостатки, и до настоящего времени остается одной из важных проблем судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств.

Перечисленные выше недостатки и особенно невозможность исследования объектов малого количества послужили основанием для дальнейших поисков метода, способного выявлять агглютиногены в микрочастицах материала. С этой точки зрения определенного внимания заслуживают реакции абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации».

В силу своей доступности и демонстративности эти реакция стали широко использоваться и усовершенствоваться. Однако в настоящее время более широко применяются реакции абсорбции-элюции. РАЭ состоит из двух фаз: абсорбции и элюции. В каждой фазе имеется несколько последовательно заменяющих друг друга этапов. На всех этапах РАЭ, начиная с этапа подготовки материала и кончая фазой элюции, предложен ряд модификаций.

В большинстве случаев определение группы крови в пятнах не представляет затруднений. Однако, из-за наличия незначительного количества материала (когда весь материал расходуется при определении наличия и видовой принадлежности) дальнейшие исследования невозможны. Исходя из этого, нами был предложен способ определения группы крови в объекте, в котором предварительно определили наличие крови.

Самым перспективным способом установления наличия крови является метод хроматографии.

Учитывая, что при установлении наличия крови методом хроматографии на бумаге употребляется растворитель бутанол-аммиак, обладающий хорошими фиксирующими свойствами, было решено исследовать этот же объект для определения антигенов крови системы АВО. Преимущество данного метода заключается в том, что он позволяет экономить материал, исключает время, необходимое для его фиксации и гемолизует собственные агглютинины пятен крови, тем самым устраняя возможность влияния их на четкость результатов реакции абсорбции-элюции.

В процессе установления возможности определения антигенов крови в предварительно хроматографированных пятнах была разработана новая методика радиальной микрохроматографии, позволяющая одновременно исследовать большее количество образцов.

Применение хроматографированных объектов для обнаружения группы крови при помощи РАЭ оказалось наиболее эффективным в случаях загрязнения пятен крови некоторыми горюче-смазочными веществами, поскольку в хроматографированных объектах наличие агглютиногенов можно установить в случаях, когда обычная реакция абсорбции-элюции дает сомнительные и даже отрицательные результаты.

Благодаря тому, что хроматография может очищать ингредиенты от загрязняющих их примесей, наличие и группа крови легко определяются в следах, загрязненных навозом, землей, цементом, алебастром, солью, сахаром, перцем и др. веществами, а также в пятнах крови, подвергшихся воздействию высокой температуры и солнечной радиации.

Этим методом можно определить наличие и группу крови в пятнах, расположенных на различных текстильных тканях, независимо от их цвета и оттенка, в загнивших пятнах и в пятнах крови, подвергшихся воздействию моющих средств.

Следует указать, что реакция абсорбции-элюции не лишена ряда недостатков, а именно: для ее постановки требуется цельные сыворотки, технически она трудоемка, для ее выполнения требуется

много времени и большое количество лабораторной посуды, при промывании объекта физиологическим раствором происходит механическое повреждение пятна, недостаточное промывание объекта ведет к неспецифической агглютинации, а сильное отмывание исследуемого объекта приводит к значительному уменьшению комплекса антиген-антитело, что снижает специфичность способа и точность определения.

Это побудило авторов разработать новый метод определения группы крови системы АВО в следах, методом биоспецифической адсорбционной (аффинной) хроматографии, т.е. способом хроматографии агглютининов альфа и бета по сродству к. При этом в качестве сорбента нерастворимого лиганда служили агглютиногены АВО, фиксированные на предмете-носителе, которые прикреплялись к хроматографической бумажной полоске. Специфические силы сродства, лежащие в основе биологических функций антигены позволяют избирательно и эффективно выделять чистые антитела из физиологического раствора, т.е. антитела «узнают» лишь «свои» антигенные детерминанты с очень высокой степенью избирательности.

Установлено, что оптимальными параметрами реакции является хроматография в течение 16-18 часов при комнатной температуре (18-19<sup>0</sup>) с сыворотками альфа и бета, разведенными в соотношении 1:32 при их титре – 1:128 и 1:64 при титре 1:256 и экстракт анти-Н в разведении 1:8 при титре 1:64.

Таким образом, впервые показана возможность определения групповой принадлежности крови в следах методом биоспецифической адсорбционной хроматографии. Данный метод прост, высокочувствителен, широко доступен, экономит экспертный материал для проведения экспертизы и, главное не требует трудоемкого процесса промывки неспецифически связанных антител, что значительно снижает трудоемкость и время исследования.

Пятна крови, содержащие 0,004 мг сухого вещества, являются тем минимальным количеством агглютиногенов, которое необходимо для получения удовлетворительных результатов.

Биоспецифическая адсорбционная (аффинная) хроматография полностью подходит для определения антигенов в следах крови, расположенных на различных текстильных тканях, разных цветов и оттенков. С помощью аффинной хроматографии могут быть выявлены антигены крови в смешанных пятнах крови с потом, слюной, мочой и спермой, тогда как антигены перечисленных выделений не обнаруживаются. Это обусловлено тем, что антигены выделений, как водорастворимые вещества, не удерживаются на предмете-носителе из-за вымывания потоком физраствора и неспособны к образованию комплекса антиген-антитело.

Таким образом, в определенной мере можно дифференцировать антигены крови и выделений в смешанных пятнах.

Сравнительная оценка результатов исследований экспериментальных и экспертных материалов реакцией абсорбции-элюции и методом аффинной хроматографии показала преимущества последней. Этот метод позволяет определить агглютиногены в следах даже в тех случаях, когда РАЭ дает отрицательные результаты.



## ВЫВОДЫ

1. Хроматография объекта, предшествующая постановке реакции абсорбции-элюции, позволяет последовательно определять наличие и групповую принадлежность (системы АВО) крови в ее микроследах путем исследования одного объекта.

2. Реакция абсорбции-элюции в сочетании с предшествующей ей хроматографией повышает точность метода при исследовании микроследов крови, подвергшихся гнилостному изменению, загрязнению горюче-смазочными и некоторыми сыпучими веществами.

3. Радиальная микрохроматография на бумаге позволяет одновременно исследовать несколько объектов.

4. При исследовании одного объекта биоспецифической адсорбционной хроматографией возможно последовательное определение и наличия, и групповой принадлежности крови в ее микроследах, смешанных с выделениями человека, а также расположенных на ряде текстильных тканей, исключающих применение РАЭ.

5. Достоинством биоспецифической адсорбционной хроматографии является возможность использования в ней разведенных сывороток и отсутствие необходимости в отмывании неспецифично-связанных агглютининов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При исследовании микроследов крови в целях экономии материала целесообразно проведение последовательного определения наличия и групповой принадлежности (системы АВО) крови в одном объекте. Это достигается путем постановки РАЭ в сочетании с предварительным хроматографированием объекта. Наиболее целесообразной данная модификация представляется при исследовании пятен крови, подвергшихся гниению, либо

загрязненных горюче-смазочными и некоторыми сыпучими веществами.

При исследовании большого количества объектов следует использовать метод радиальной хроматографии на бумаге. Сущность метода заключается в следующем. Исследуемый объект хроматографируется (восходящая или радиальная хроматография) с системой растворителя –бутанол-аммиак в соотношении 7:3. Материал (вырезки или ниточки из пятна крови), исследованный хроматографически до проявления хроматограммы, снимается с хроматографической бумаги и без предварительной фиксации исследуется реакцией абсорбции-элюции с целью обнаружения агглютиногенов системы АВО.

2. При исследовании микроследов крови, смешанных с выделениями человека, а также расположенных на бархате, вельвете, китайском или искусственном шелке и др. материалах, не позволяющих определить групповую принадлежность крови при помощи РАЭ, методом выбора является биоспецифическая адсорбционная хроматография. Данный метод позволяет использовать разведение сыворотки и обойтись без отмывания неспецифично-связанных агглютининов. Из объекта исследования и контрольного участка предмета-носителя берется по 3 нити длиной 3-4 мм, либо делаются вырезки размером 1x4 мм, закрепляемые в проколы у стартовых линий на трех одинаковых полосках из хроматографической бумаги. Каждая полоска делится на две половины карандашной линией – для объекта исследования и контроля. Полоски закрепляются бумагодержателями и хроматографируются с системой растворителя (бутанол-аммиак). После испарения влаги полоски вновь помещаются в камеру так, чтобы нижний конец одной из них соприкасался с сывороткой альфа, второй – с сывороткой бета и последний – с экстрактом анти-Н. Сыворотки альфа, бета в разведении 1:32 (при их титре 1:128) и экстракт анти-Н в разведении 1:8 (при титре 1:64) предварительно наливаются в отдельные стеклянные лодочки и устанавливаются на

дно камеры. Хроматографирование производится при комнатной температуре. По истечении 16-18 часов из объектов, без предварительного промывания, элюируются антитела, соответственно с которыми устанавливаются агглютиногены крови системы АВО.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова В.Ю. Иммунологические методики в комплексном анализе микрообъектов судебно-биологической экспертизы: Автореф. дис. канд. мед.наук. М., 2008. 18 с.
2. Ажицкая Н.Н., Голубинская Н.Б., Тишенко С.В., Смуглова Н.В. Изучение влияния этанола на антигены а, в, н при установлении групповой принадлежности крови по зосерологической системе аво как одного из этапов идентификации личности. // таврический медико - биологический вестник, 2013, том 16, №4 (64) с 6-10.
3. Барсегянц Л.О. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств (кровь, выделения, волосы): рук.для судеб, медмков/ Л.О.Барсегянц. М., Медицина 1999. 271 с.
4. Барсегянц Л.О. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств / М., Медицина 2005. 447 с.
5. Барсегянц Л.О. Современное состояние судебно-медицинского исследования вещественных доказательств и пути развития. // Судебно-медицинская экспертиза, 2004. № 5. 25-27 с.
6. Барсегянц Л.О., Крюков В.Н, Солохин А.А и др. Судебно-медицина –М.: Медицина. 1997. 415 с.
7. Васильев Н.И. Модернизированная двухэтапная проба на индивидуальную совместимость при переливании эритроцитов: автореф. дис. канд. мед.наук, – М., 2002. – 24 с
8. Герасимова Н.Д. Распределение эритроцитарных аллоантигенов и антител у онкологических больных: автореф. дис. канд. биол. наук, – М., 2003. – 16 с
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика/ Пер.с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
10. Гуртова С.В., Тучик Л.Н., Курджиева О.Б. Некоторые новые возможности при работе с пятнами крови на вещественных доказательствах. // Сборник научных статей по судебной биологии, Москва, 1999. С. 34-37 с.
11. Гуртовая С.В. К вопросу о возможном влиянии различных моющих средств на определение видовой и групповой принадлежности крови // Сборник работ врачей судебно-медицинских экспертов биологов / подготовлен С.В.Гуртовой; РЦСМЭ МЗ РФ М., 2007. с 16-19.

12. Гуртовая С.В. // Сборник работ врачей судебно-медицинских экспертов биологов / подготовлен С.В.Гуртовой; РЦСМЭ МЗ РФ М., 2005. 38 с.
13. Гуртовая С.В. Применение обти-теста для определения наличия и вида крови в пятнах/ С.В. Гуртова, Л.Н. Тучик, О.Б. Курджиева // Судеб. – мед. экспертиза 1999. №5. 23-25 с.
14. Гуртовая С.В., Первушина Е.А., Первушина Ю.В. Определение наличия крови в следах на вещественных доказательствах при помощи диагностических полосок гемофан фирмы «Лакхема» // Судеб. – мед. экспертиза 1997. №3. 29 с.
15. Донсков С.И., Дубинкин И.В., Пискунова Т.М. О различии анти-Kell антител, полученных от одного донора // Проблемы гематологии. – 2000. – № 2. – С. 20
16. Иванов П.Л. Судебно-биологическая экспертиза реалии и перспективы/ П.Л.Иванова, В.А.Клевно // Судеб. – мед. экспертиза 2006. №1. С 19-24.
17. Колоколова Г.П. Диагностика группы АВО системы АВО (Н) в следах слюны, спермы и секрета влагалища с помощью реакции смешанной агглютинации / Г.П.Колоколова // Судеб. – мед. экспертиза 2006. №4. С 32-34.
18. Коноваленко А. В., Сидоров В. Л., Ягмуров О. Д. Возможность объективного учета колориметрической методики с использованием бензидиновой пробы при ориентировочном установлении наличия крови на вещественных доказательствах // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Том 17 №2 2015 с 71-74.
19. Лапенков М.И., Гуртовая С.В., Александрова В.Ю. Капинос Т.А. Комбинация методов реакции абсорбции-элюции и гель-фильтрации для установления групповой принадлежности пятен крови // Судеб. – мед. экспертиза 2009. №3. С 29-33.
20. Леонова Е.Н., Власюк И.В. Роль вещественных доказательств биологического происхождения при решении ситуационных вопросов // Дальневосточный медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С. 93-95.
21. Леонова Е.Н., Власюк И.В. Важность следов крови, оставленных животными на месте обнаружения трупа при уточнении обстоятельств происшествия // Дальневосточный медицинский журнал. – 2015. – № 1. – С. 47-50.

22. Липунова Е. А. Физиология крови: моногр. исслед. / Е. А. Липунова, Скоркина М. Ю. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.
23. Люминесцентные методы исследования крови и спермы в пятнах на вещественных доказательствах// Библиотека судебно-медицинского эксперта. Выпуск 4. Спб.: Изд-во НИИХ СПбГУ, 2000.С 38
24. Меркулова Н.Н., Хромова Е.А. Распространенность иммунных антител системы АВО среди ханты – коренного населения Среднего Приобья // Трансфузиол. – 2001. – № 4. – С. 32–37.
25. Меркулова Н.Н., Хромова Е.А., Минеева Н.В. Сравнительная оценка использования сульфидредуцентов для выявления IgG-антител к антигенам эритроцитов АВО // Гематол. и трансфузиол. – 2004. – № 3. – С. 16–18.
26. Минеева Н.В., Меркулова Н.Н., Хромова Е.А., Боброва И.А.Случаи выявления редких вариантов антигена А // Гематол. и трансфузиол. – 2003. – № 1. – С. 39–41.
27. Михайлова Н.М.Перекрестные реакции антигенов и антител системы АВО: автореф. дис. канд. мед.наук. – М., 2003.
28. Михайлова Н.М., Васильев Н.И. Распределение групп крови АВО, Rh, Kell у жителей Смоленской области // Вестник службы крови России. – 2002. – №3. – С. 26–28.
29. Минеева Н. В. Группы крови человека. Санкт-Петербург, 2004. – 188с.
30. Назаров Г.Н., Пашина Г.А. Медико-криминалистическое исследование следов крови: практическое руководство. – Н. Новгород: Изд-во НгМА, 2003. – 258 с.
31. Пермяков А. В. Патоморфология и танатогенез алкогольной интоксикации / А. В. Пермяков, В. И. Витер. – Ижевск: Экспертиза, - 2002. - 91 с.
32. Петров В. И., Пантелеева Н. В., Мурзич В. И. Практические аспекты исследования свойств крови в рамках медицинской судебной экспертной деятельности // Военная медицина. – 2018. №1. С 119-124.
33. Пиголкин Ю.И., Леонова Е.Н., Дубровин И.А., Нагорнов М.Н. Новая рабочая классификация следов крови // Суд.-мед. эксперт. – 2014. – № 1. – С. 11-14.
34. Потапов М. И. О Судебно-медицинской номенклатуре органотканевых антигенов. СМЭ. -2001. - №2. – С. 26 -27.

35. Прошутин В.Л., Чирков В.Е., Вавилов А.Ю. Современное состояние научных исследований по проблеме определения давности образования следов крови на вещественных доказательствах // Проблемы экспертизы в медицине. – Ижевск, 2005. – №4 – С. 47-49
36. Ройт Л. Иммунология: пер. с англ./ Л. Ройт, Дж. Брюсстофф, Д. Мейл, - Москва: Мир, 2000. -592с.
37. Сахаров Р.С., Кондратова И.В., Федулова М.В., Крестьянова И.Н. О серологически выявляемом наличии в следах крови резус-отрицательных лиц резус-антигена В. //Суд.-мед. экспертиза, 2002, №2, с. 25-28
38. Сахаров Р.С., Федулова М.В. Применение протеаз для повышения чувствительности выявления антигенов системы АВО реакцией абсорбции-элюции при исследовании следов выделений человека. //Суд.-мед. экспертиза, 1999, №6, с. 29-32
39. Сахаров Р. С., Федулова М.В., Гуреева Н.Б. и соавторы. Применение протеаз для повышения чувствительности выявления антигенов системы АВО реакцией абсорбции-элюции в следах крови. //Суд.-мед. экспертиза, 1998, №5, с. 73-74
40. Сборник работ судебно-медицинских экспертов-биологов (наблюдения из практики, предложения результаты научных разработок) / подготовлен С.В.Гуртовой; РЦСМЭ МЗ РФ М., 2005. 37с.
41. Свирский М.С. Изучение методов абсорбции-элюции и смешанной агглютинации в судебно-медицинских целях: автореф. дисс. канд. мед.наук / М.С.Свирский. М., 1999. 24 с.
42. Сидоров В.Л. Физико-химические и иммунологические аспекты исследования пятен крови и спермы на объектах носителях: автореф. дисс. канд. биол. наук / М.С.Свирский. СПб., 2000. 22 с.
43. Сидоров В. Л., Ягмуров О. Д. Использование метода иммуноферментного анализа в экспертизе вещественных доказательств // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Том 17 №3 · 2010 с 74-76.
44. Сидоров В.Л. О новых возможностях определения наличия крови и спермы в следах на вещественных доказательствах на анализаторе жидкости «Флюорат-02-3М» // Судеб. – мед. экспертиза 2000. № 4. С 29-30.
45. Чукавина Т. Е., Гуртовая С. В., Рамишвили А.

Д.Сохраняемость антигенов M, N и P в образцах сухой крови при длительном их хранении // Проблемы экспертизы в медицине. – Ижевск, 2006. – № 1. – С. 21-23

46. Шамонова Т. Н. Следы крови человека в криминалистическом учении о следах // Вестник криминалистики. – М.: Спарк, 2004. – Вып. 4. – С. 71-80.

47. Экспертные методики исследования тканей и выделений человека: учеб.пособие. М.: ЭКЦ МВД России, 2006. 72 с.

48. Яхно Т.А., Яхно В.Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей // Журнал технической физики. – 2009. – № 8. – С. 133-141.

49. Akane A, Mizukame H, Shiono H. Classification of standard alleles of the MN blood group system // Vox Sang. – 2000. – V. 79. – P. 183–187.

50. An J. H., Shin K. J., Yang W. I., Lee H. Y. Body fluid identification in forensics // BMB Rep. – 2012. – Vol. 45. – № 10. – P. 545–553.

51. Bevel T. and Ross M. Gardner Bloodstain Pattern Analysis. – Boca Raton: CRC Press, 2008. – 440 p

52. Biwasaka, H. Detection of ABH blood group antigens from minute human hairs using polyvinylidene difluoride membrane with elution ELISA method/ H.Biwasaka, N. Nakayashiki // Jpn/ J.Legal. Med. – 1998 Vol. 52, N 1. P 37-41.

53. Blood grouping of mixed bloodstains using immunocytochemical methods/ Y.Bunai et al.// J.Forensic. Sei. 1999. Vol. 44, N 1. P 100-104.

54. Busutil, A. Assessment of Lewis blood group antigens and secretor status in autopsy specimen / A. Busutil [et al] // Forensic Sci. Int. 2003. □ Vol. 61. 3. P. 133-140

55. Buck U, Kneubuehl B, Nather S, Albertini N, Schmidt L, Thali M (2011) 3D bloodstain pattern analysis: Ballistic reconstruction of the trajectories of blood drops and determination of the centres of origin of the bloodstains. Forensic Sci Int 206(1-3): 22-28.

56. Butler JM (2012) Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology. Burlington, Mass, Elsevier Academic Press, Massachusetts, USA.

57. Carter AL, Forsythe Erman J, Hawkes V, Akira Brian Yamashita Lewis blood group antigens and secretor status in autopsy specimen / A. Busutil [et al] // Forensic Sci. Int. 2006. □ Vol. 61. 3. P. 133-140



58. Castello A., Frances F., Verdu F. An Alternative to the Human Hemoglobin Test in investigation of Bloodstains Treated with Active Oxygen: The Human Glycophorin A Test // *The Scientific World JOURNAL*. – 2011. – Vol. 11. – P. 907–916.
59. Cooling L.L.W., Zhang D., Koerner T.A.W. Human platelets express gangliosides with LKE activity and ABH blood group activity // *Transfusion*. – 2001. – V. 41. – P. 504–516
60. Cooling L., Gu Y. Identification of two new single-nucleotide polymorphism in FUT3 associated with the Lewis-null phenotype // *Transfusion*. – 2003. – V. 43. – N 12. – P. 1760–1761
61. Colligan D.A., Mackie A., Fraser R.H. Production of murine monoclonal anti-Fy [Abstract]// *Transfus. Med.* – 2000. – V. 10 (Suppl. 1.). – P.6
62. Chiaroni J., Legrand D, Dettori I., Ferrera V. Analysis of ABO discrepancies occurring in French hospitals // *Transfusion*. – 2004. – V. 44. – P. 860–863.
63. Cho D., Kim S.-H., Jeon M.-L. et al. A novel B var allele (547 G>A) demonstrate differential expression depending on the co-inherited ABO allele // *Vox Sang.* – 2004. – V. 84. – P. 187–198.
64. Cho D., Kim S.-H., Jeon M.-L. et al. The serological and genetic basis of the cis-AB blood group in Korea // *Vox Sang.* – 2004. – V. 87. – P. 41–43.
65. Eiz-Vesper B., Seltsam A., Blasczyk R. ABO glycosyltransferases as potential source of minor histocompatibility antigens in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation // *Transfusion*. – 2005. – V. 45. – P. 960–964
66. Estalote A.C., Palatnik M., Chester M.A. et al. The ABO blood group system: a novel B subgroup allele // *Vox Sang.* – 2003. – V. 83 (Suppl. 2). – P. 18
67. Fernandez-Jimenez M.C., Jimenez-Marco M.T., Hernandez D. et al. Treatment with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in pregnancies complicated with anti-PP1Pkor anti-K immunization: a report of two patients // *Vox sang.* – 2000. – V. 80. – P. 117–120
68. Garratty G., Glynn S.A., McEntire R. ABO and Rh (D) phenotype frequencies of different racial/ ethnic groups in the United States // *Transfusion*. – 2004. – V. 44. – P. 703–706.

69. Hamada, K. A simple dot enzyme-linked immunosorbent assay for ABO blood typing of biological fluid and stains : effects of heating samples / K. Hamada [et al] // Leg. Med. (Tokyo). □ 2002. □ Vol. 4. P. 217-222.
70. Hanson E. K., Lubenow H., Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs // Anal Biochem. – 2009. – Vol. 15. – № 2. – P. 303–314.
71. Hurley I. P. , Cook R., Laughton C. W. et al. Detection of human blood by immunoassay for applications in forensic analysis//Forensic. Sci. Int. – 2009. – Vol. 10. – № 1–3. P. 91–97.
72. Illes MR, Carter AL, Latusus PL, Yamashita AB (2005) Use of the Back TrackComputer Program for bloodstain pattern analysis of stains from downward-moving drops. Can Soc Forensic Sci 38(4): 213-218.
73. Immel C.C, Mc'Person M, Hay S.N.et al. //Severe hemolytic anemia due to auto anti-N//Immunohematology–2005. – V. 21. – P. 63–65
74. James SH, Kish PE, Sutton TP (2005) Principles of Bloodstain Pattern Analysis: Theory and Practice, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA.
75. James SH, Eckert WG (1998) Interpretation of Bloodstain Evidence at Crime Scenes, CRC, Boca Raton, Florida, USA.
76. Katamatic Crew V., Poole J., Banks J. et al. LU21: a new antigen in the Lutheran blood group system // Vox Sang. – 2004. – V. 87. – P. 109–113
77. Karger B, Rand S, Fracasso T, Pfeiffer H (2008) Bloodstain pattern analysis--casework experience. Forensic Sci Int 181(1-3): 15-20.
78. Karger B, Rand SP, Brinkmann B (1998) Experimental bloodstains on fabric from contact and from droplets. Int J Legal Med 111(1): 17-21.
79. Knock C, Davison M (2007) Predicting the position of the source of blood stains for angled impacts. J Forensic Sci 52(5): 1044-1049.
80. Lee A.H., Reid M.E. ABO blood group system: a review of molecular aspects // Immunohematology. – 2000. – V. 16. – N 1. – P. 1–6.
81. Lomas-Francis C., Hu Z., Hue-Roye K. et al. Novel single nucleotide change in GYPA in a person who made an alloantibody to a new high prevalence MNS antigen called ENEV // Transfusion. – 2006. – V. 46. – 25A (Abstract)
82. Mather, J. Evaluation of the BioSign membrane tests for the identification of semen stains in forensic casework / J. Mather [et al] // N. Z. Med. J. □2002. Vol. 8. 1147. □P. 48-49.

83. McDonald D.F., Thompson J.M., Lowe J.A. A murine monoclonal antibody agglutinates P1-ve cord blood red cells of pp phenotype [Abstract] // *Transfus. Med.* – 1996. – V. 6 (Suppl. 2). – P. 2
84. Moore CC (2002) Three-dimensional models for bloodstain pattern analysis. *J Forensic Identification* 52(2): 183-203.
85. Palacajomsuk P. Review: molecular basis of MNS blood group variants // *Immunoematology.* – 2006. – V. 22. – P. 171–182
86. Peschel O, Kunz SN, Rothschild MA, Mutzel E (2011) Blood stain pattern analysis. *Forensic Sci Med Pathol* 7(3): 257-270.
87. Pflug, W. ABO and Lewis typing of stains on nitrocellulose membranes using a new dot-blot ELISA technique / W. Pflug, G. Bassler, B. Eberspacher // *Forensic Sci. Int.* □1989. □Vol. 43. 2. P.171-182.
88. Raymond MA, Smith ER, Liesegang J (1996) The physical properties of blood-forensic considerations. *Sci Justice* 36(4): 153-160.
89. Rieben, R. Specificity of monoclonal antibodies against ABH and related structures tested by ELISA with synthetic glycoconjugates / R. Rieben [et al] // *Transfus. Clin. Biol.* 1997. □ Vol. 4. 1. P. 47-54.
90. Saferstein R (2015) *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science.* Pearson Education, Inc, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
91. Seo, Y. A sandwich enzyme immunoassay for liver-specific antigen and its forensic evaluation / Y. Seo, K. Takahama // *Nippon Hoigaki Zassi.* □1992. Vol. 46. P. 169-176.
92. Seo, Y. A highly sensitive sandwich enzyme immunoassay for human liver-specific antigen (LSA) and its forensic application / Y. Seo, K. Takahama // *Nippon Hoigaki Zassi.* 1994. Vol. 48. 3. P. 150-155.
93. Seo, Y. A Sandwich enzyme immunoassay for brain S-100 protein and its forensic application / Y. Seo, E. Kakizaki, K. Takahama // *Forensic Sci. Int.* □1997. □Vol. 6. 2. □P. 145-154.
94. Schroeder, W. A. High performance liquid chromatographic separation of globin chains of nonhuman hemoglobins / W. A. Schroeder [et al] // *Hemoglobin.* □1985. Vol. 9. 5. P. 461-482.
95. Schweers B. A. et al. Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (Rapid Stain Identification – Blood) // *Forensic Sci. Int. Genet.* –2008. – Vol. 2. – № 3. – P. 243–247
96. Tahir, M. A. Gm (11) grouping of dried bloodstains / M. A. Tahir //

J. Forensic Sci. 1984. Vol. 29. 4. P. 1178-1182.

97. Tajima, M. Comparative studies between counter immunoelectrophoresis and microprecipitation method of identification of human minute bloodstains / M. Tajima, K. Tokiwa, S. Katsura // Z. Rechtsmed. □ 1988. □ Vol. 99. 4. P. 227-233.

98. Takahama, K. Medico-legal studies on detection of organspecific antigens. Article in Japanese / K. Takahama // Nippon Hoigaku Zasshi. □ 1993. □ Vol. 47. 6. P. 445-455.

99. Takahama, K. Forensic application of organ-specific antigens / K. Takahama // Forensic Sci. Int. □ 1996. □ Vol. 22. □ 2. P. 63-69.

100. Tsutsumi, H. Identification of human urinary stains by enzyme-linked immunosorbent assay for human uromucoid / H. Tsutsumi [et al] // J. Forensic Sci. 1988. Vol. 33. 1. P. 237-243.

101. Uchimoto M. L., Beasley E., Coult N. et al. Considering the effect of stem-loop reverse transcription and real-time PCR analysis of blood and saliva specific microRNA markers upon mixed body fluid stains // Forensic Sci. Int. Genet. – 2013. – Vol. 7. – № 4. – P. 418–421.

102. Validation of the Back Track suite of programs for bloodstain pattern analysis. J Forensic Ident 56(2): 242-254.

103. Virkler K., Lednev I. K. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene // Forensic Sci. Int. – 2009. – Vol. 188. – № 1–3. – P. 1–17.

104. Yamamoto F. Review: ABO blood group system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes // Immunohematology – 2004. – V. 20. – P. 3–15.

105. Zhang, W. J. Allele frequencies and species specificity of six short tandem repeat loci in Chinese population. Article in Chinese /W. J. Zhang [et al]. 2004. P. 587-590.

106. Zubakov D., Hanecamp E., Kokshoom M. et al. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples // Int. J. Legal Med. – 2008. – Vol. 122. – № 2. – P. 135–142.

**АБДУЛЛАЕВ БАХТИЁР САИДОВИЧ  
АМАНОВА ГУЛАФЗАЛ УЗБЕКБОЕВНА  
ИСМОИЛОВ ЖАСУР МАРДОНОВИЧ**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ  
ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ И ГРУППЫ  
КРОВИ В СЛЕДАХ**

**МОНОГРАФИЯ**

**ИЗДАТЕЛЬСТВО “ТІВВІҮОТ КО’ЗГУСИ”**

*Ответственный редактор — Дилдора ТУРДИЕВА*

*Корректор — Олим РАХИМОВ*

*Технический редактор — Акмал КЕЛДИЯРОВ*

*Дизайн и верстка — Зарина НУСРАТУЛЛАЕВА*

**Отпечатано в типографии “ТІВВІҮОТ КО’ЗГУСИ” 140100.**

**г. Самарканд, ул. Амир Темура, 18.**

**Подписано в печать 24.02.2021. Протокол 7**

**Формат 60x84<sup>1/16</sup>. Гарнитура “Times New Roman”. усл. печ. л. 6,28**

**Тираж: 500 экз. Заказ № 179 от 29.04.2021**

**Тел/фах: 0(366)2335415 e-mail: [sammi@mail.ru](mailto:sammi@mail.ru), [www.sammi.uz](http://www.sammi.uz)**

