## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ДАВНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПЯТЕН КРОВИ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОТИПОВ ГАПТОГЛОБИНА

**Баходиров Бехзод Баходирович** – ассистент
**Бахриев Ибрагим Исомадинович**– к.м.н., доцент
*Ташкентский государственный медицинский университет (Ташкент, Узбекистан)*

***Аннотация. Цель.*** *Оценить влияние давности образования пятен крови и факторов окружающей среды на стабильность и достоверность определения фенотипов гаптоглобина в высушенных следах крови.*

***Материалы и методы исследования.*** *Для проведения исследования у соматически здоровых добровольцев обоего пола в возрасте от 18 до 60 лет осуществляли забор капиллярной крови из пальца с последующим определением фенотипов гаптоглобина в жидком состоянии. Также исследованы системы гаптоглобина в пятнах крови, расположенных на бумаге,* хлопчатобумажной, шерстяной и *смесовой ткани, подвергшихся воздействию прямых солнечных лучей, хранившихся во влажном состоянии и в почве в течение различных периодов времени.*

***Результаты.*** *Исследованием установлено, что, зависимость определяемости фенотипов гаптоглобина от вида предмета-носителя и длительности воздействия факторов внешней среды. При воздействии прямых солнечных лучей при температуре +25…+30°С на пятна крови на бумаге, хлопчатобумажных, шерстяных и смесовых тканях фенотипы гаптоглобина выявляются не более 3-4 суток. В условиях влажной среды при температуре +15…+20°С их определяемость сохраняется до одного месяца, а при хранении в почве при температуре +10…+15°С – до пяти месяцев, после чего выявление становится невозможным.*

***Заключение.*** *Установлена зависимость определения фенотипов гаптоглобина от вида предмета-носителя и длительности воздействия факторов внешней среды.*

***Ключевые слова:*** *судебно-медицинская экспертиза, исследование крови, гаптоглобин, вещественные доказательства, пятна крови.*

## ATROF-MUHIT OMILLARI VA QON DOG‘LARINING HOSIL BO‘LISH MUDDATLARINING GAPTOGLOBIN FENOTIPLARINI ANIQLASHGA TA’SIRI

**Bahodirov Behzod Bahodirovich** – assistent
**Baxriyev Ibragim Isomadinovich** – t.f.n., dotsent
*Toshkent davlat tibbiyot universiteti (Toshkent, O‘zbekiston)*

***Annotatsiya. Maqsad.*** *Quritilgan qon izlarida gaptoglobin fenotiplarini aniqlashning barqarorligi va ishonchliligiga qon dog‘larining hosil bo‘lganiga o‘tgan vaqt hamda atrof-muhit omillarining ta’sirini baholash.*

***Tadqiqot materiali va usullari.*** *Tadqiqot o‘tkazish uchun 18 yoshdan 60 yoshgacha bo‘lgan, somatik jihatdan sog‘lom, har ikki jins vakillaridan kapillyar qon barmoqdan olinib, suyuq holatda gaptoglobin fenotiplari aniqlangan. Shuningdek, qog‘oz, paxta matosi, jun va aralash matolarda joylashgan qon dog‘laridagi gaptoglobin tizimlari o‘rganildi. Ushbu qon dog‘lari to‘g‘ridan-to‘g‘ri quyosh nurlari ta’sirida qolgan, nam holatda saqlangan hamda turli muddatlar davomida tuproqda saqlangan.*

***Natijalar.*** *Tadqiqot natijalariga ko‘ra, gaptoglobin fenotiplarini aniqlash imkoniyati predmet-tashuvchi turi va atrof-muhit omillarining ta’sir davomiyligiga bog‘liqligi aniqlandi. +25…+30 °C haroratda to‘g‘ridan-to‘g‘ri quyosh nurlari ta’sirida qog‘oz, paxta, jun va aralash matolardagi qon dog‘larida gaptoglobin fenotiplari 3-4 sutkadan ortiq aniqlanmaydi. Nam muhitda +15…+20 °C haroratda ularni aniqlash imkoniyati bir oygacha saqlanadi, +10…+15 °C haroratda tuproqda saqlanganda esa besh oygacha davom etadi, shundan so‘ng aniqlash imkonsiz bo‘lib qoladi.*

***Xulosalar.*** *Gaptoglobin fenotiplarini aniqlash predmet-tashuvchi turi va atrof-muhit omillarining ta’sir davomiyligiga bog‘liqligi aniqlandi.*

***Kalit so‘zlar:*** *sud-tibbiy ekspertiza, qon tadqiqoti, gaptoglobin, ashyoviy dalillar, qon dog‘lari.*

## THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS AND THE AGE OF BLOODSTAINS ON THE DETERMINATION OF HAPTOGLOBIN PHENOTYPES

**Bahodirov Behzod Bahodirovich** – assistant
**Bakhriyev Ibragim Isomadinovich** – Ph.D., associate professor
*Tashkent State Medical University (Tashkent, Uzbekistan)*

***Abstract. Objective.*** *To assess the influence of the age of bloodstains and environmental factors on the stability and reliability of determining haptoglobin phenotypes in dried blood traces.*

***Materials and Methods.*** *The study was conducted using capillary blood samples collected from the finger of somatically healthy volunteers of both sexes aged 18 to 60 years, followed by determination of haptoglobin phenotypes in the liquid state. In addition, haptoglobin systems were examined in bloodstains deposited on paper, cotton, wool, and blended fabrics that were exposed to direct sunlight, stored under humid conditions, or buried in soil for various periods.*

***Results.*** *The study established that the detectability of haptoglobin phenotypes depends on the type of substrate and the duration of exposure to environmental factors. When bloodstains on paper, cotton, wool, and blended fabrics were exposed to direct sunlight at temperatures of +25…+30°C, haptoglobin phenotypes could be detected for no more than 3-4 days. Under humid conditions at +15…+20°C, detectability was preserved for up to one month, whereas storage in soil at +10…+15°C allowed detection for up to five months, after which identification became impossible.*

***Conclusion.*** *The determination of haptoglobin phenotypes is dependent on the type of substrate and the duration of exposure to environmental factors.*

***Keywords:*** *forensic medical examination, blood analysis, haptoglobin, physical evidence, bloodstains.*

**Введение.** Гаптоглобин (Hp) является плазменным белком, синтезируемым преимущественно в печени, основной функцией которого является связывание свободного гемоглобина, высвобождающегося при разрушении эритроцитов. Образование стабильного комплекса «гаптоглобин-гемоглобин» предотвращает развитие окислительного повреждения тканей и обеспечивает направленный транспорт гемоглобина к клеткам ретикулоэндотелиальной системы для последующей утилизации. В судебно-медицинском аспекте особый интерес представляет возможность выявления и исследования гаптоглобина в различных биологических объектах, в том числе в сухих пятнах крови (dried blood spots, DBS), что расширяет диагностические возможности при экспертизе вещественных доказательств биологического происхождения (1, 2, 3).

Гаптоглобин относится к белкам острой фазы воспаления и играет значимую роль в механизмах неспецифической иммунной защиты организма. Белок характеризуется выраженным генетическим полиморфизмом и представлен тремя основными фенотипами – Hp 1-1, Hp 2-1 и Hp 2-2, что обусловливает межиндивидуальные различия его физико-химических и функциональных свойств. Указанные особенности определяют судебно-медицинскую значимость фенотипирования гаптоглобина при исследовании следов крови, в том числе с целью идентификации биологического материала, оценки его сохранности, а также интерпретации влияния факторов внешней среды и давности образования следов. Исследование системы гаптоглобина при производстве судебно-биологических экспертиз повышает информативность и доказательственную значимость экспертных выводов. Определение фенотипов гаптоглобина в пятнах крови применяется при экспертизах по установлению биологического родства, выявлению фактов подмены детей, оценке одногруппности лиц по системе АВО, а также при сомнительных результатах определения групповой принадлежности крови. Данный метод используется для минимизации влияния предмета-носителя, при отсутствии контрольных образцов, а также при исследовании смешанных пятен крови человека и животных либо крови человека с другими биологическими выделениями (4, 5, 6).

В судебно-биологической практике нередко возникает необходимость определения фенотипов гаптоглобина как в образцах крови лиц, проходящих по уголовным делам, так и в пятнах крови на вещественных доказательствах. В отдельных случаях их выявление затруднено вследствие отсутствия чёткой разгонки фракций гаптоглобина на фореграммах, что может быть обусловлено условиями изъятия, хранения и давностью поступления биологических объектов на экспертное исследование (2, 5, 7, 8).

В процессе экспертной практики, особенно при ограниченном количестве исследуемого материала, первоочередное значение имеет выбор оптимальной системы дифференцирования, который определяется состоянием пятен крови, в том числе их размерами, степенью насыщенности и другими морфологическими характеристиками. При этом возможность выявления фенотипов гаптоглобина зависит не только от типа предмета-носителя, на котором локализуется пятно крови, но и от воздействия на него различных физических и химических факторов.

**Цель исследования.** Оценить влияние давности образования пятен крови и факторов окружающей среды на стабильность и достоверность определения фенотипов гаптоглобина в высушенных следах крови.

**Материалы и методы исследования.** Для проведения исследования у соматически здоровых добровольцев обоего пола в возрасте от 18 до 60 лет осуществляли забор капиллярной крови из пальца с последующим определением фенотипов гаптоглобина в жидком состоянии.

В дальнейшем среди обследованных лиц формировали группы с фенотипами гаптоглобина Hp 2-1 и Hp 2-2 (по 20 человек), а также группу с фенотипом Hp 1-1 (10 человек). У отобранных добровольцев повторно производили забор венозной крови из локтевой вены в объёме 10 мл, которую непосредственно после взятия, до начала свертывания, без применения антикоагулянтов и консервирующих растворов наносили на исследуемые предметы-носители: фрагменты бумаги, хлопчатобумажной, шерстяной и смесовой тканей (табл. 1).

***Таблица 1.***

**Количество исследованных образцов крови, проведенныхисследований и пятен на каждом виде предмета-носителя**

| № | Вид предмета-носителя | Количество исследованных образцов крови | Количество проведенных исследований | Общее количество исследованных пятен |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Хлопчатобумажная ткань | 50 | 22 | 1100 |
| 2 | Смесовая ткань | 50 | 22 | 1100 |
| 3 | Шерстяная ткань | 50 | 22 | 1100 |
| 4 | Бумага | 50 | 22 | 1100 |
| 5 | Всего | 200 | 22 | 4400 |

Образованные пятна крови высушивали на плоской горизонтальной невпитывающей поверхности в сухом затемнённом помещении при комнатной температуре в течение 4-6 часов. Из каждого вида бумаги и ткани формировали опытные и контрольные образцы: опытные фрагменты подвергали воздействию изучаемых неблагоприятных факторов, тогда как контрольные образцы хранили в сухом помещении при комнатной температуре (табл. 2).

***Таблица 2.***

**Количество образцов и пятен крови, проведенных исследований и общее количество исследованных пятен на каждый фактор внешней среды**

| № | Наименование фактора внешней среды | Количество исследованных образцов крови | Количество исследованных пятен крови | Количество проведенных исследований | Общее количество исследованных пятен |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Воздействие прямых солнечных лучей | 50 | 200 | 6 | 1200 |
| 2 | Хранение во влажном состоянии | 50 | 200 | 7 | 1400 |
| 3 | Хранение в земле | 50 | 200 | 9 | 1800 |
| 4 | Всего | 150 | 600 | 22 | 4400 |

Исследование выполняли методом электрофореза в вертикальных пластинах полиакриламидного геля (ПААГ). Входной электрофорез проводили последовательно при напряжении 100V в течение 1 часа, затем при напряжении 250V в течение 1 часа. Основной электрофорез осуществляли при напряжении 300V на протяжении 2,0-2,5 часа. Процесс электрофореза завершали после смещения фронта гемоглобина на расстояние 4,5-5,0 см от линии старта и достижения визуально различимой зоны альбумина, представленной коричневато-желтой фракцией у нижнего края гелевой пластины. По окончании электрофореза буферный раствор удаляли, прибор разбирали, а гелевые пластины помещали для окрашивания в лоток, содержащий 200 мл 10% раствора уксусной кислоты с добавлением 70-80 мг бензидина; через 40 минут в раствор вносили 20-25 капель пергидроля. Учёт результатов начинали непосредственно после добавления пергидроля и перемешивания раствора и продолжали в течение 1 часа.

Фотодокументирование полученных фореграмм осуществляли с использованием прибора для бестеневой съёмки «МФН-2» и цифровой фотокамеры «Olympus Camedia C-770 Ultra Zoom».

**Результаты исследования и их обсуждение.** Для изучения возможности определения фенотипов гаптоглобина в пятнах крови на предметах-носителях, подвергшихся воздействию прямых солнечных лучей, использовали образцы крови 50 живых лиц с заранее установленными фенотипами гаптоглобина. Кровь наносили на бумагу, хлопчатобумажную, шерстяную и смесовую ткани, после чего образцы высушивали при комнатной температуре. В исходном состоянии во всех пятнах фенотип гаптоглобина определялся без затруднений.

Далее предметы-носители с пятнами крови экспонировали на открытой солнечной площадке в летний период в течение 10 часов ежедневно при температуре воздуха +30…+35°C. Ежедневно из каждого пятна вырезали фрагмент размером 1,0×1,5 см (от центра к периферии), который измельчали, обрабатывали 15% раствором сахарозы на электродном буфере с добавлением 1% раствора трипсина и на следующие сутки проводили электрофоретическое определение фенотипов гаптоглобина.

После одних суток инсоляции во всех пятнах отмечалось лишь незначительное снижение интенсивности фракций гаптоглобина, при этом фенотипирование не вызывало затруднений. По истечении двух суток интенсивность фракций снижалась во всех образцах; фенотип гаптоглобина определялся во всех пятнах на бумаге и шерстяной ткани, в большинстве пятен на хлопчатобумажной ткани, однако в 30% случаев на смесовой ткани и в 10% случаев на хлопчатобумажной ткани фенотип установить не удалось. После трёх суток воздействия прямых солнечных лучей фенотип гаптоглобина определялся лишь в отдельных пятнах – в 28% на бумаге и в 10% на хлопчатобумажной ткани; в остальных образцах разгонка фракций отсутствовала. После четырёх суток инсоляции разгонка фракций гаптоглобина не выявлялась ни в одном из исследованных пятен.

В контрольной группе образцов, не подвергавшихся воздействию солнечных лучей, определение фенотипов гаптоглобина во всех пятнах затруднений не вызывало.

Для изучения влияния хранения пятен крови во влажном состоянии на возможность определения фенотипов гаптоглобина использовали образцы крови 50 соматически здоровых добровольцев с заранее установленными фенотипами. Кровь наносили на бумагу, хлопчатобумажную, шерстяную и смесовую ткани, высушивали при комнатной температуре и определяли фенотип гаптоглобина в исходном состоянии, который во всех образцах выявлялся без затруднений. Далее образцы помещали в чашки Петри, слегка смачивали проточной водой и хранили в прохладном помещении (+15…+20°C). Через заданные интервалы времени из каждого пятна вырезали фрагмент размером 1,0×1,5 см (от центра к периферии) для электрофоретического исследования фенотипа гаптоглобина.

После одной недели фенотип гаптоглобина определялся во всех пятнах, однако в отдельных образцах наблюдалось снижение интенсивности фракций. Через две недели разгонка фракций не выявлялась в 10% пятен на смесовой ткани и в 14% на шерстяной; интенсивность фракций на смесовой ткани была значительно снижена, в остальных пятнах фенотип выявлялся без затруднений. На 19-й день разгонка фракций отсутствовала в 54% пятен на шерстяной и в 42% на смесовой ткани, в остальных пятнах фракции были слабовыражены. В пятнах на бумаге и хлопчатобумажной ткани определение фенотипа оставалось беспроблемным.

В начале четвертой недели разгонка фракций сохранялась практически во всех пятнах на бумаге (не выявлялась лишь в 8%), тогда как на хлопчатобумажной, шерстяной и смесовой тканях фракции не определялись. К 26-му дню фенотип гаптоглобина не удалось выявить ни в одном из исследованных пятен. В контрольной группе, не подвергавшейся влажному хранению, фенотипы гаптоглобина определялись без затруднений во всех образцах.

Для изучения влияния хранения пятен крови в почве на возможность определения фенотипов гаптоглобина образцы крови наносили на бумагу, хлопчатобумажную, шерстяную и смесовую ткани, помещали в почву на глубину около 20 см и хранили в темном прохладном помещении (+10…+15°C). В течение первых восьми недель фенотипы гаптоглобина определялись без затруднений.

На девятой неделе интенсивность фракций снижалась, но в большинстве пятен диагностика оставалась возможной; фенотип не удалось определить в 10% случаев на хлопчатобумажной и в 20% на смесовой ткани. Через три месяца окраска фракций была менее интенсивной, а на смесовой ткани в 14% наблюдений разгонка фракций отсутствовала. В середине четвертого месяца интенсивность фракций значительно снижалась: фенотип не определялся в 34% пятен на бумаге, 38% на хлопчатобумажной, 54% на смесовой и 56% на шерстяной ткани.

К концу четвертого месяца количество пятен с положительным результатом уменьшилось: фенотип гаптоглобина определялся лишь в 28% случаев на бумаге, 14% на хлопчатобумажной, 10% на смесовой и 8% на шерстяной ткани. На 20-й неделе разгонка фракций отсутствовала во всех образцах. В контрольной группе фракции гаптоглобина сохранялись в большинстве пятен, хотя на смесовой ткани и в отдельных пятнах на бумаге, хлопчатобумажной и шерстяной ткани разгонка фракций отсутствовала.

**Выводы.** Таким образом, установлена зависимость возможности определения фенотипов гаптоглобина от вида предмета-носителя и длительности воздействия факторов внешней среды на вещественные доказательства. При воздействии прямых солнечных лучей при температуре +25…+30°C на пятна крови, расположенные на бумаге, хлопчатобумажных, шерстяных и смесовых тканях, определение фенотипов гаптоглобина возможно в течение не более 3-4

суток, после чего фракции гаптоглобина не выявляются. В условиях влажной среды при температуре +15…+20°С фенотипы гаптоглобина в аналогичных объектах сохраняют определяемость до одного месяца. При хранении пятен крови на указанных предметах-носителях в почве при температуре +10…+15°С возможность определения фенотипов гаптоглобина сохраняется до пяти месяцев, по истечении которых их выявление становится невозможным.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Барсегянц Л.О. Современное состояние судебно-медицинского исследования вещественных доказательств //Судебно-медицинская экспертиза, 2004, №2, С. 34-40.

2. Морева М.Л. Романов А.В. Практические аспекты дифференцирования следов крови по системе гаптоглобина //Судебно-медицинская экспертиза, 2003, С. 44-48.

3. Николенко О.В., Свирский М.С. Определение фракции гемоглобина и гаптоглобина при исследовании пятен крови методом электрофореза в вертикальных пластинах полиакриламидного геля //Судебно-медицинская экспертиза. 1981, №2, С. 41-44.

4. Пашинская К.О. Состояние транспортных систем крови и иммунной системы у практически здоровых жителей Европейского Севера //Журнал медико-биологических исследований. 2024. Т. 12, № 3. С. 347-357.

5. Фаворская Е.Г. Судебно-медицинское определение фенотипов гаптоглобина в следах крови на различных носителях, подвергшихся воздействию некоторых факторов внешней среды. //Автореферат дисс… к.м.н. 2011, с. 26.

6. Шевченко А.Ю. и др. (2010). Возможности использования белков крови в судебной медицине //Судебно-медицинская экспертиза, №4, 45-49.

7. Barni F. et al. (2007). Genetic and protein markers in blood stains after long-term aging //Forensic Science International, 168(2-3), 139-147.

8. Bowman B. H., Kurosky A. (1982). Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation //Advances in Human Genetics, 12, 189-261.

9. Koch W. et al. (2002). Genotyping of the com mon haptoglobin Hp1/2 polymorphism based on PCR //Clinical Chemistry, 48(9), 1377-1382.

10. Yano K. et al. (2003). Haptoglobin genotype and its clinical significance //Clinica Chimica Acta, 337 (1-2), 13-20.