

СУДОВА МЕДИЦИНА

© Марченко О. М., Кузнєцова Г. М.

УДК 615.9.36.11

Марченко О. М., Кузнєцова Г. М.

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ СУДОВО-БІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ СЛІДІВ СПЕРМИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ІМІТОВАНИХ УМОВ ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
(м. Київ)

Дана робота виконана в рамках науково-дослідної роботи Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Дослідження механізмів функціонування органів травного тракту та розробка методів їх корекції», № держ. реєстрації 0106U005755.

Вступ. Важливим питанням, що постає на вирішення судово-медичних експертів є наявність сперматозоїдів на речових доказах, які вилучаються слідчими на місці скоєння злочину [4]. Оскільки для пошуку сперми стандартно використовують орієнтовний метод – ультрафіолетове проміння [2], виникає потреба пошуку більш досконалих, доказових методів для ідентифікації клітин сперми. Окрім факторів зовнішнього середовища, таких як температура та вологість, речові докази часто зазнають впливу побутових миючих засобів та інших розчинів, якими зазвичай намагаються знищити сліди сперми на місцях скоєння злочину. Перебуваючи під впливом агресивних факторів, клітини сперми, як і всі живі об'єкти, починають поступово руйнуватись, зменшуючи ймовірність їх ідентифікації серед тих слідів, що залишились [3]. Фрагментовані клітини сперми не придатні для ідентифікації за допомогою стандартного цитологічного методу [1]. Тому важливим є з'ясування строків, в залежності від умов зовнішнього середовища, протягом яких можливо проводити морфологічне дослідження з метою констатації наявності сперми.

Для організації хроматину в ядрах сперматозоїдів слугують низькомолекулярні основні ядерні білки протаміни, тоді як в ядрах всіх інших типів клітин ДНК асоційована з гістонами. Таким чином, протаміни є спермоспецифічними [9], що відкриває можливості чіткої ідентифікації сперматозоїдів, зокрема за допомогою методів імунофлуоресцентного забарвлення, по наявності білків цієї родини [5].

Метою дослідження було вивчення впливу ряду факторів зовнішнього середовища (часу, температури, рН та відносної вологості) на збереження клітин сперми та можливість їх виявлення цитологічним методом чи методом імунофлуоресцентного забарвлення із застосуванням антитіл до людського протаміну 1.

Об'єкт і методи дослідження. Для досліджень використовували сперму здорових чоловіків.

Сперму наносили на марлю, що була просякнута буферними розчинами з рН 3.0, рН 4.0 (цитратні); рН 5.0, рН 6.0 (фосфатні) та інкубували в наступних умовах:

- в термостаті при +25°C та двох режимах вологості (50%, 75%);
- в холодильнику при +10°C та двох режимах вологості (60%, 65%);
- в холодильнику при 0°C та двох режимах вологості (75%, 80%);
- в морозильній камері при -15°C та двох режимах вологості (11%, 15%).

Через 1, 2, 3, 7, 14, 21 добу сперму екстрагували з вирізку марлі надлишком (1-3 краплі) розчину 5% аміаку протягом 18 годин при +4°C. Після центрифугування екстрактанти (центрифуга ОПН – ЗУХЛ 4 хв при 1500 об/хв) з осаду виготовляли мазки, які після повного висихання ділили на 2 групи і забарвлювали:

Антитілами до Protamine 1 (N-14) згідно з протоколом використання антитіл Protamine 1 (N-14) Santa Cruz Biotechnology (стадії демаскування антигенів, інкубації з 1% BSA і козячою сироваткою в PBS, інкубації з первинними антитілами, інкубації з вторинними антитілами, фарбування флуоресцентною міткою FITS Santa Cruz Biotechnology, заключення препаратів).

Гематоксиліном за методом Романовського-Гімзи [7].

Цитологічні препарати досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія) при збільшенні x400.

Для встановлення корелятивних зв'язків між терміном збереження клітин сперми та чинниками довкілля визначали коефіцієнти кореляції Пірсона (r). Отримані дані вважали вірогідними при $p < 0.05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Було встановлено, що за умов інкубації зразків сперми при рН носія 3.0 клітини зберігаються у кількості, достатній для ідентифікації морфологічним методом, протягом перших 3 діб при всіх досліджуваних температурах та вологості середовища інкубації, та протягом 7 діб при зниженій вологості. Починаючи

Таблиця 1

Облік клітин сперматозоїдів різними методами за умов рН носія 3. 0 та різних температури та вологості середовища інкубації

Т, °С	Вологість, %	Термін, дні					
		1	2	3	7	14	21
-15	11	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	АТ	АТ
	15	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	АТ	АТ	АТ
0	75	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
	80	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ	АТ
+10	60	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
	65	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ	АТ
+25	50	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	75	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ

Примітка: «Цитол.» – стандартний метод фарбування за Романовським-Гімзою, кількість клітин на препаратах більше 100; «АТ» – імунофлуоресцентний метод фарбування із застосуванням антитіл до протаміну 1, сперматозоїди фрагментовані; «Цитол. /АТ» – застосовані обидва методи, кількість клітин на препаратах менше 100.

Таблиця 2

Облік клітин сперматозоїдів різними методами за умов рН носія 4. 0 та різних температури та вологості середовища інкубації

Т, °С	Вологість, %	Термін, дні					
		1	2	3	7	14	21
-15	11	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	15	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
0	75	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ
	80	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
+10	60	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	65	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
+25	50	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	75	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ

Примітка: «Цитол.» – стандартний метод фарбування за Романовським-Гімзою, кількість клітин на препаратах більше 100; «АТ» – імунофлуоресцентний метод фарбування із застосуванням антитіл до протаміну 1, сперматозоїди фрагментовані; «Цитол. /АТ» – застосовані обидва методи, кількість клітин на препаратах менше 100.

з другого тижня досліду спостерігали фрагментацію клітин, коли ідентифікація сперматозоїдів була можливою лише за використання імунофлуоресцентного методу забарвлення (антитілами до людського протаміну 1) за всіх досліджуваних умов, крім інкубації при температурі +25°C та зниженій вологості. В

останньому випадку клітини зберігалися у кількості, достатній для їх ідентифікації цитологічним методом, протягом усього терміну дослідження (21 добу) (табл. 1, рис. 1, 5А).

При інкубації зразків сперми за різних умов при рН носія 4.0 ідентифікація сперматозоїдів за

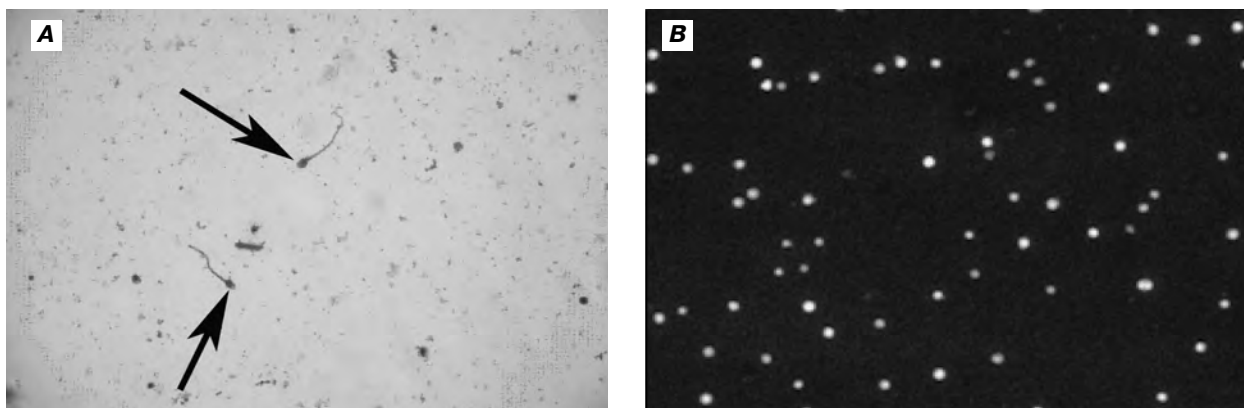


Рис. 1. Мікрофотографія клітин сперми за умов інкубації зразків протягом 21 доби при температурі +25°C, рН носія 3. 0 та відносній вологості 50 % (А) і 75 % (В); забарвлення за Романовським-Гімзою (А), антитілами до людського протаміну 1 (В); x400. Стрілки – цілі сперматозоїди.

Облік клітин сперматозоїдів різними методами за умов рН носія 5. 0 та різних температури та вологості середовища інкубації

Т, °С	Вологість, %	Термін, дні					
		1	2	3	7	14	21
-15	11	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	15	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
0	75	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	80	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
+10	60	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	65	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ
+25	50	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	75	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ

Примітка: «Цитол.» – стандартний метод фарбування за Романовським-Гімзою, кількість клітин на препаратах більше 100; «АТ» – імунофлюоресцентний метод фарбування із застосуванням антитіл до протаміну 1, сперматозоїди фрагментовані; «Цитол. /АТ» – застосовані обидва методи, кількість клітин на препаратах менше 100.

допомогою цитологічного методу була можливою по закінченні 7 діб незалежно від температури та вологості середовища інкубації, до 14-ї доби за умов зниженої вологості при всіх досліджуваних температурах, до 21-ї доби за умов зниженої вологості при всіх температурах за винятком 0°C. Повну фрагментацію

сперматозоїдів, що унеможливило їх ідентифікацію цитологічним методом, спостерігали за умов підвищеної вологості при температурах -15-+10°C, починаючи з 2 тижня, та при 0°C за усіх режимів вологості на 3 тижні. Варто зазначити, що за умов інкубації при +25°C клітини сперми залишалися придатними

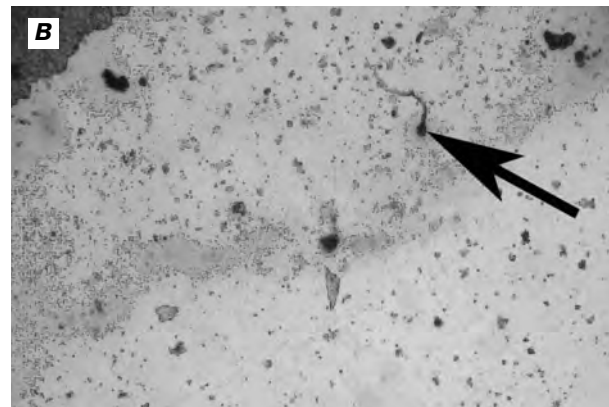
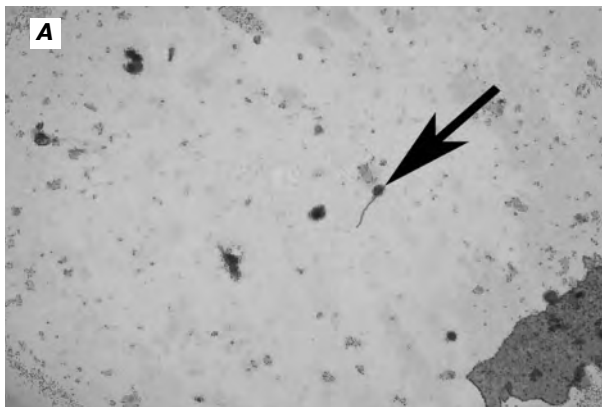


Рис. 2. Мікрофотографія клітин сперми за умов інкубації зразків протягом 21 доби при рН носія 4. 0, температурі -15°C (А), +25°C (В) та відносній вологості 11 % (А) і 75 % (В); забарвлення за Романовським-Гімзою; x400. Стрілки – цілі сперматозоїди.

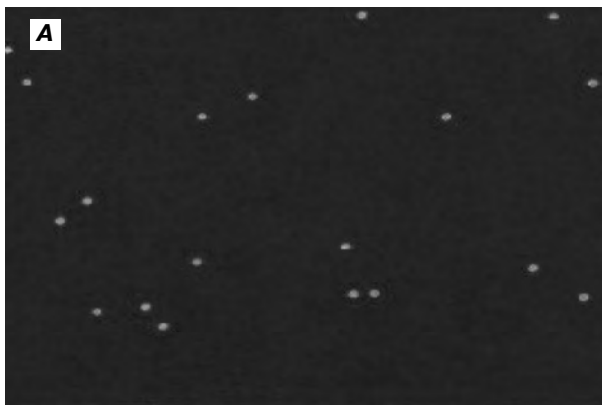


Рис. 3. Мікрофотографія клітин сперми за умов інкубації зразків протягом 21 доби при рН носія 4. 0, температурі 0°C та відносній вологості 75 % (А) і 80 % (В); забарвлення антитілами до людського протаміну 1; x400.

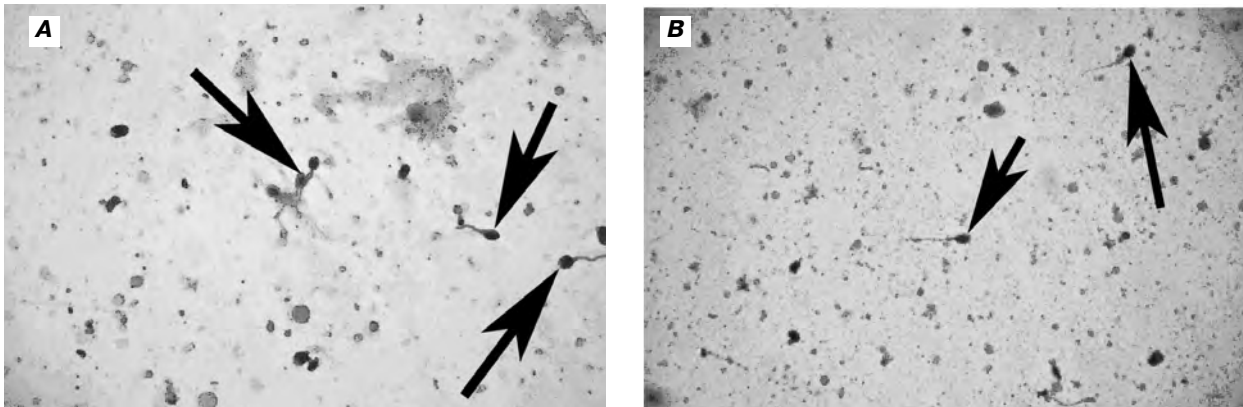


Рис. 4. Мікрофотографія клітин сперми за умов інкубації зразків протягом 21 доби при рН носія 5. 0, температурі -15°C (A), $+25^{\circ}\text{C}$ (B) та відносній вологості 11 % (A) і 75 % (B); забарвлення за Романовським-Гімзою; $\times 400$.
Стрілки – цілі сперматозоїди.

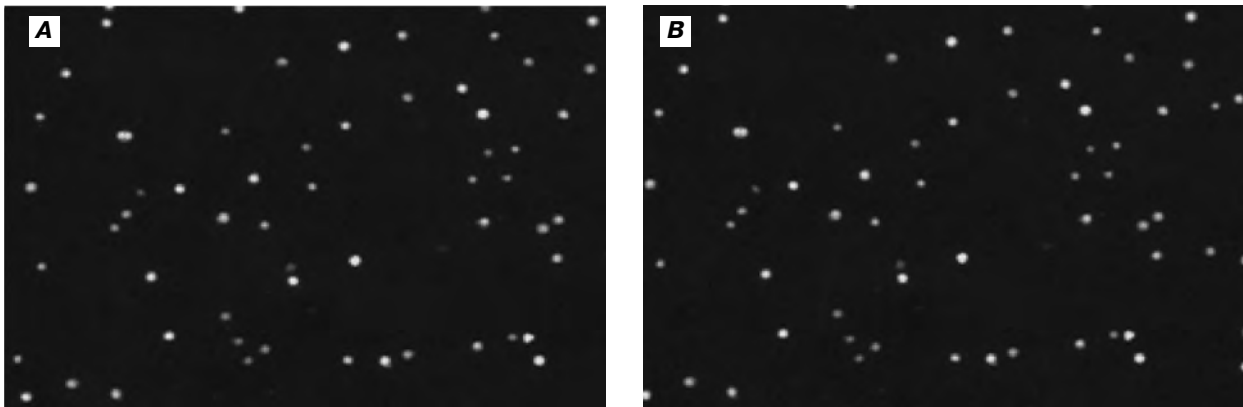


Рис. 5. Мікрофотографія клітин сперми за умов інкубації зразків протягом 21 доби при температурі $+10^{\circ}\text{C}$, рН носія 3. 0 (A) і 5. 0 (B) та відносній вологості 60 % (A) і 65 % (B); забарвлення антитілами до людського протаміну 1; $\times 400$.

для ідентифікації їх цитологічним методом протягом усього періоду дослідження (табл. 2, рис. 2,3).

При інкубації зразків сперми за різних умов при рН носія 5.0 клітини були збережені у достатній кількості для їх ідентифікації за допомогою цитологічного методу до 7 доби за усіх досліджуваних умов, до 21 доби за умов інкубації при зниженій вологості та всіх температурних режимів. Ідентифікація сперматозоїдів була можливою тільки за допомогою імунофлюоресцентного методу після 14-ї доби при інкубації зразків за умов підвищеної вологості та температури -15°C , 0°C , та після 21 доби – за умов температури $+10^{\circ}\text{C}$. За умов інкубації при $+25^{\circ}\text{C}$ клітини сперми також залишалися придатними для ідентифікації їх цитологічним методом протягом усього періоду дослідження (табл. 3, рис. 4, 5B).

При інкубації зразків сперми за умов рН носія 6.0 сперматозоїди були придатні до ідентифікації їх цитологічним методом до 7 доби включно незалежно від температури та вологості середовища інкубації, та до 21 доби включно при інкубації за умов зниженої вологості. При температурі середовища інкубації $+25^{\circ}\text{C}$ клітини сперми зберігались у достатній кількості для ідентифікації їх цитологічним методом протягом усього періоду дослідження (табл. 4, рис. 6).

При аналізі корелятивних зв'язків між терміном збереження сперматозоїдів у кількості, достатній для ідентифікації їх морфологічним методом, і умовами інкубації було встановлено, що термін збереження клітин сперми прямо корелює з рН носія та температурою середовища інкубації та обернено – з його відносною вологістю. При цьому сила корелятивного зв'язку терміну збереження з рН носія – слабка ($\rho=0.377$, $p=0.033$), з температурою середовища інкубації – середня ($\rho=0.479$, $p=0.006$), з його відносною вологістю – середня за всіх температурних режимів ($\rho=-0.504$, $p=0.003$) та сильна за температури нижчої за $+25^{\circ}\text{C}$ ($\rho=-0.779$, $p<0.001$).

Попередні дослідження [8] показали, що умови зовнішнього середовища (температура, вологість, рН носія) істотно впливають на ступінь збереження сперматозоїдів. Найбільша кількість цілих клітин, придатних для виявлення за допомогою стандартного методу фарбування за Романовським-Гімзою, зберігається у середовищі з природним для клітин сперми значенням рН 7,2 незалежно від його температури та вологості. При дослідженні впливу кислих значень рН носія на збереження сперматозоїдів нами було встановлено, що перші три доби не є критичними для біологічного сліду сперми незалежно

Облік клітин сперматозоїдів різними методами за умов рН носія 6. 0 та різних температури та вологості середовища інкубації

T, °C	Вологість, %	Термін, дні					
		1	2	3	7	14	21
-15	11	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	15	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
0	75	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	80	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ	АТ	АТ
+10	60	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	Цитол. /АТ
	65	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ	АТ	АТ
+25	50	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ
	75	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол.	Цитол. /АТ

Примітка: «Цитол.» – стандартний метод фарбування за Романовським-Гімзою, кількість клітин на препаратах більше 100; «АТ» – імунофлуоресцентний метод фарбування із застосуванням антитіл до протаміну 1, сперматозоїди фрагментовані; «Цитол. /АТ» – застосовані обидва методи, кількість клітин на препаратах менше 100.

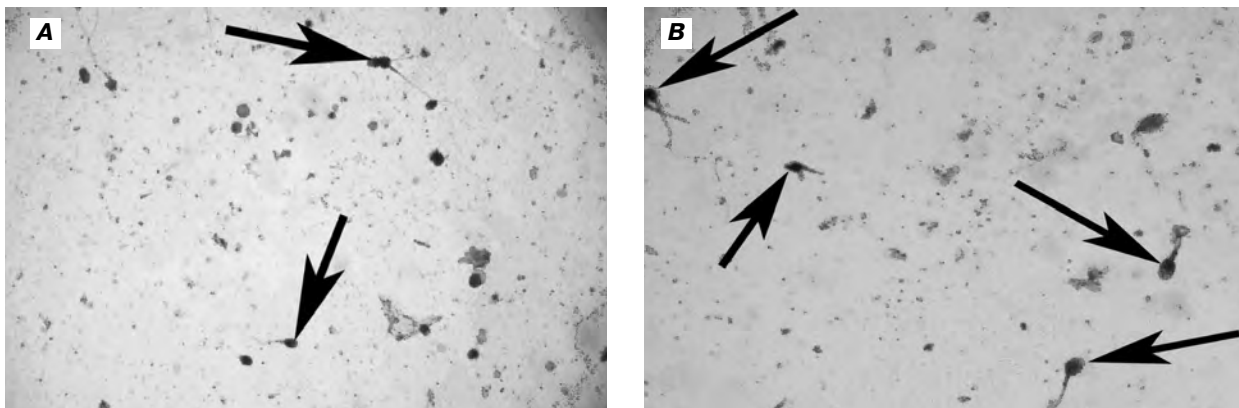


Рис. 6. Мікрофотографія клітин сперми за умов інкубації зразків протягом 21 доби при рН носія 6. 0, температурі +25°C та відносній вологості 50 % (А) і 75 % (В); забарвлення за Романовським-Гімзою; x400. Стрілки – цілі сперматозоїди.

від температури та відносної вологості середовища інкубації, оскільки залишається можливою ідентифікація сперматозоїдів за допомогою цитологічного методу, що вказує на низьку пошкоджуючу дію закислення середовища. При аналізі впливу різних факторів середовища інкубації на збереження клітин сперми було показано, що термін збереження цілих сперматозоїдів у кількості, достатній для їх ідентифікації цитологічним методом, збільшувався зі збільшенням значень рН носія (від сильно (3. 0) до слабо (6. 0) кислого). При аналізі впливу температурного режиму було встановлено, що термін збереження цілих сперматозоїдів є приблизно однаковим за температур, нижчих за +25°C, тоді як при +25°C він різко зростає. Підвищена відносна вологість середовища інкубації була фактором, що сприяє різкому скороченню терміну ідентифікації сперматозоїдів за допомогою цитологічного методу, що може бути пояснене більш оптимальними умовами для розвитку бактерійної флори, яка спричиняє деградацію біологічного матеріалу [6].

Варто зазначити, що найбільш критичними умовами для збереження клітин сперми були

температури $\leq 0^\circ\text{C}$ при підвищеній вологості, що може бути пояснене кристалізацією води при заморожуванні і відповідно пошкодженням клітин кристаликами льоду. Найоптимальнішою для збереження біологічного сліду сперми була температура +25°C, при якій навіть підвищена вологість середовища інкубації не відіграла суттєвої ролі. Імовірно, така температура є достатньо близькою до температури тіла для сприяння збереження клітин цілими і в той же час недостатньо високою для стимулювання росту бактерійної флори [9].

Як бачимо, найкращими для збереження клітин сперми є умови, що максимально наближаються до фізіологічних, але при цьому не є сприятливими для розмноження бактерійної флори: рН близька до нейтральної, температура найближча до температури тіла, відносна вологість середовища не підвищена.

Таким чином, зі зростанням рН предмету-носія (від кислого до нейтрального) збереженість клітин сперми зростає, так само як і при зростанні температури до кімнатної, тоді як підвищення вологості навколишнього середовища негативно впливає на збереження сперматозоїдів.

Висновки.

1. Метод стандартного забарвлення цитологічних препаратів з метою пошуку слідів сперми за умов кислих значень рН предмету-носія є більш доцільним, ніж метод імунофлюоресцентного забарвлення, при давності скоєння злочину не більше 3 діб.

2. При високій температурі доквілля та імовірному контакті речового доказу з сильно-кислими розчинами стандартне забарвлення за Романовським-Гімза є методом вибору при ідентифікації слідів сперми протягом 2 тижнів з моменту передбачуваного скоєння статевих злочину, а при відсутності такого контакту – протягом 3 тижнів.

3. Метод ідентифікації слідів сперми за допомогою імунофлюоресцентного забарвлення з використанням моноклональних антитіл до людського протаміну 1 є переважним за умов температури доквілля менше 0°C при імовірному контакті речового доказу з сильно-кислими розчинами при давності

скоєння злочину понад 3 доби, а при відсутності такого контакту – понад 1 тиждень.

4. Метод пошуку слідів сперми за допомогою імунофлюоресцентного забарвлення є доцільним за умов підвищеної вологості навколишнього середовища при давності скоєння злочину понад 3 доби при імовірності дії на речовий доказ сильно кислих розчинів, та понад 1 тиждень при відсутності такої дії.

5. Вибір методу забарвлення цитологічних препаратів з метою пошуку клітин сперми, придатних для ідентифікації в судово-біологічній експертизі щодо статевих злочинів, має здійснюватись залежно від умов доквілля та рН розчину, яким обробляли досліджуваний матеріал.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження впливу факторів зовнішнього середовища відіграє важливу роль в судово-експертній практиці. Отримані експериментальні дані є обґрунтуванням для проведення подальших досліджень з урахуванням додаткових чинників (UV-випромінювання, бактеріальної флори) та можуть бути основою для схеми-алгоритму експертного дослідження.

Література

1. Горальський Л. П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир : Полісся, 2005. – 288 с.
2. Иванина Т. В. К вопросу о сохранности спермы в следах на вещественных доказательствах / Т. В. Иванина, З. И. Тараскина, А. А. / Иванина / Актуальные вопросы судебной медицины и права. – 2011. – Вып. 2. – С. 112-118.
3. Марченко О. М. Вплив кислотності, температури і вологості середовища на збереження клітин сперми / О. М. Марченко, Н. О. Карпезо, В. К. Рибальченко // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2012. – №3. – С. 55-62.
4. Матвеев В. И. Исследование пятен спермы спектрографическим методом / В. И. Матвеев, В. А. Татаренко // Судебно-медицинская экспертиза. – 1961. – № 1. – С. 31-35.
5. Пиголкин Ю. И. Сексуальное насилие: теории, подходы и методы исследования / Ю. И. Пиголкин, О. А. Дмитриева, Н. Г. Щитов, Г. Б. Дерягин. – М.: МИА, 2008. – 456 с.
6. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
7. Янковский В. Э. Диагностику механизмов и морфологии поврежденных мягких тканей / В. Э. Янковский // Судебно-медицинская экспертиза. – М., 2002. – С. 13-17.
8. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins // Genome Biol. – 2007. – V. 8, N. 9. – P. 227-231.
9. Liu L. Protamine extraction and analysis of human sperm protamine 1/protamine 2 ratio using Acid gel electrophoresis / L. Liu, K. Aston, D. Carrell // Methods Mol. Biol. – 2013. – Vol. 927. – P. 445-450.

УДК 615. 9. 36. 11

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ СУДОВО-БІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ СЛІДІВ СПЕРМИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ІМІТОВАНИХ УМОВ ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Марченко О. М., Кузнєцова Г. М.

Резюме. Досліджено вплив кислих значень рН предмету-носія за різних температурних режимів (від -15°C до +25°C) та різній вологості середовища інкубації на збереження клітин сперми. Встановлено, що за умов кислих значень рН предмету-носія більш доцільним є метод стандартного забарвлення цитологічних препаратів при давності скоєння злочину не більше 3 діб. Показано також, що найбільш критичними чинниками для клітин сперми є підвищена вологість доквілля та температура $\leq 0^\circ\text{C}$.

Ключові слова: сперматозоїди, протамін 1.

УДК 615. 9. 36. 11

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СЛЕДОВ СПЕРМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИМИТИРОВАННЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Марченко О. Н., Кузнєцова Г. Н.

Резюме. Исследовано влияние кислых значений рН предмета-носителя при различных температурных режимах (от -15°C до + 25°C) и различной влажности среды инкубации на сохранность клеток спермы. Установлено, что в условиях кислых значений рН предмета-носителя более целесообразным является метод

стандартной окраски цитологических препаратов при давности совершения преступления не более 3 суток. Показано также, что наиболее критическими факторами для клеток спермы являются повышенная влажность окружающей среды и температура $\leq 0^{\circ}\text{C}$.

Ключевые слова: сперматозоиды, протамин 1.

UDC 615. 9. 36. 11

Application of Methods for Forensic Research of Sperm Traces Depending on Simulated Environmental Factors

Marchenko O. M., Kuznietsova H. M.

Abstract. Investigation of the effects of environmental factors: term, temperature, pH, humidity on sperm cells preservation and detection by cytological or immunofluorescent staining method was aimed.

Materials and methods. The study was conducted on samples of human semen. The semen were deposited on the gauze saturated by buffer solutions with pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and incubated in the following conditions: In the incubator at + 25°C and two humidity regimens (50 %, 75 %); In the refrigerator at + 10 °C and two humidity regimens (60 %, 65 %); In the refrigerator at 0°C and two humidity regimens (75 %, 80 %); In the freezer with two modes -15°C and two humidity regimens (11 %, 15 %).

After the 1, 2, 3, 7, 14, 21 day sperm cells were extracted from gauze by excess (1-3 drops) of 5% ammonia solution for 18 hours at 4°C. Then extractants were centrifuged (centrifuge OPN-ZUHL 4 min. at 1500 rev/min), the specimens from the precipitate were prepared and stained with: 1) hematoxylin according by Romanowsky-Giemsa method; 2) immunofluorescent staining by antibodies to human protamine 1 (Santa Cruz Biotechnology).

The data obtained let us to conclude that the standart (according to Romanowsky-Giemsa) staining method is preferable compared to immunofluorescent one when the carrier has acidic pH and less than 3 days after crime have passed. When the temperature is warm (+25°C) and the carrier contact with strongly acidic solution occurs, the Romanowsky-Giemsa staining method is appropriate to indicate the semen traces within 14 days since the crime, otherwise – within 21 days. When the temperature is cool (0°C and less) and the carrier contact with strongly acidic solution occurs, the immunofluorescent staining method is appropriate to indicate the semen traces when more than 3 days since the crime have passed, otherwise – more than 7 days. In case of increased humidity immunofluorescent staining method for sperm detection should be chosen for more than 3 days since the crime have passed when carrier contact with strongly acidic solution occurs, otherwise – for more than 7 days.

Thereby the method of semen traces detection in forensic researches should be carried out depends on environmental conditions and carrier pH.

Conclusions. Method stemming traces of semen (sperm), exposed to acidic values of the subject vehicle (pH 3,4,5,6) is more appropriate than the method of staining with antibodies due to low damaging effect appropriate pH.

In the studied samples are exposed to acidic buffer solutions of pH: citrate and phosphate, whose impact on the preservation of sperm examined within three weeks of the experiment, significant differences were found.

According to the data of morphological studies of sperm cells, the effect of humidity is a factor which is one of the significant effects on sperm damage over time.

Prospects for future research. Investigation of the influence of environmental factors plays an important role in forensic practice. The data obtained could be the base for further research with regard to additional factors (UV-radiation, bacterial flora) and could contribute to forensic research algorithm formation.

Keywords: sperm cells, protamine 1.

Рецензент – проф. Старченко І. І.

Стаття надійшла 12. 09. 2014 р.