



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ivan A. Stojanović

**UTICAJ RAZLIČITIH NAČINA PRANJA
OKRVAVLJENE TKANINE NA EKSPERTIZU
TRAGOVA KRVNIH MRLJA I REZULTAT DNK
ANALIZE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Tekst ove doktorske disertacije stavlja se na uvid javnosti,
u skladu sa članom 30., stav 8. Zakona o visokom obrazovanju
("Sl. glasnik RS ", br. 76/2005, 100/2007 – autentično tumačenje, 97/2008, 44/2010, 93/2012,
89/2013 i 99/2014)

NAPOMENA O AUTORSKIM PRAVIMA:

Ovaj tekst smatra se rukopisom i samo se saopštava javnosti (član 7. Zakona o autorskim i
srodnim pravima, "Sl. glasnik RS ", br. 104/2009, 99/2011 i 119/2012).

**Nijedan deo ove doktorske disertacije ne sme se koristiti ni u kakve svrhe,
osim za upoznavanje sa njenim sadržajem pre odbrane disertacije.**

Niš, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Ivan A. Stojanović

**THE EFFECT OF DIFFERENT WASHING
PROCEDURES OF BLOODSTAINED FABRIC
ON THE EXPERTISE OF BLOOD TRACE
EVIDENCE AND RESULT OF DNA ANALYSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2020.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Goran Ilić, specijalista sudske medicine, Redovni profesor na Katedri za sudsku medicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
Naslov:	Uticaj različitih načina pranja okrvavljene tkanine na ekspertizu tragova krvnih mrlja i rezultat DNK analize
Rezime:	<p>U praksi često se sreću najrazličitiji pokušaji uklanjanja tragova krvi sa dokaznih predmeta u cilju prikrivanja zločina. U istraživanju su korišćeni uzorci okrvavljene pamučne tkanine (ukupno 360 uzoraka), koji su potom oprani kroz jedan od šest različitih ciklusa pranja. Nakon protoka određenog perioda vremena uzorci su analizirani. Analiziran je makroskopski izgled uzoraka, reakcija uzoraka na hemijske testove za dokazivanje prisustva krvi, količina (koncentracija) DNK, indeks degradacije DNK i DNK profili. Mašinsko pranje na temperaturi vode od 95 i 60°C uz primenu deterdženta može ukloniti vidljive, ali ne i nevidljive tragove krvnih mrlja starih do 10 dana, dok se krvne mrlje starosti 30 dana ne mogu ukloniti navedenim načinom kroz jedan ciklus pranja. Bez obzira na način pranja, nakon pranja vidljivi preostali deo krvne mrlje će biti dominantno obodna ivica područja originalne krvne mrlje. Upređnom analizom sa rezultatima DNK analize zaključeno je da se pranjem starijih krvnih mrlja sa pamučne tkanine lakše uklanja DNK, dok se vizuelna karakteristika krvnih mrlja koja potiče od hemoglobina teže uklanja kod starijih krvnih mrlja. Utvrđena je statistička značajnost u indeksu degradacije DNK preostalog u krvnim mrljama nakon pranja i to istovremeno u odnosu na temperaturu pranja (95 i 60°C) i primenu deterdženta, uz postojanje sinergističkog pojačavajućeg efekta ova dva faktora na indeks degradacije DNK, pri čemu ova zakonitost izostaje u grupi uzoraka opranih na 30°C. Komparacijom rezultata zaključeno je da različiti eksperimentalni uslovi u ovom istraživanju, odnosno temperatura vode i deterdžent,</p>

utiču na različite ciljane delove molekula DNK (različiti STR lokusi) i time ubrzavaju degradaciju DNK. Prema tome, degradacija DNK u ranoj fazi ne odvija se uniformno u svim delovima genetskog materijala, ali se ovaj efekat gubi sa protokom vremena i degradacija postaje više uniformna u svim delovima DNK. Ovim istraživanjem utvrđene su određene nove naučne činjenice koje veštacima pružaju jedno novo gledište na prikriivanje tragova izvršenja krivičnog dela.

Naučna oblast:	Medicinske nauke
Naučna disciplina:	Sudska medicina
Ključne reči:	forenzika, krvna mrlja, analiza obrazaca krvnih mrlja, DNK analiza, degradacija DNK, deterdžent, mašinsko pranje
UDK:	340.66:577.212(043.3)
CERIF klasifikacija:	B 770 Судска медицина
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Professor Goran Ilić, MD, PhD, specialist in forensic medicine, Professor, Department of Forensic medicine, Faculty of medicine, University of Niš

Title: The effect of different washing procedures of bloodstained fabric on the expertise of blood trace evidence and result of dna analysis

Abstract: In practice, there are often various attempts to remove traces of blood from items in order to conceal a crime. In the study, samples of bleached cotton fabric (360 samples in total) were used, which were then washed through one of six different washing cycles. After a period of time the samples were analyzed. The macroscopic appearance of the samples, the reaction of the samples to chemical tests for the presence of blood, quantity (concentration) of DNA, DNA degradation index and DNA profiles were analyzed. Machine washing at a temperature of 95 and 60°C using detergent can remove visible but not invisible traces of bloodstains up to 10 days old, while bloodstains aged 30 days cannot be removed in one washing cycle. Regardless of the method of washing, after washing, the visible remaining part of the bloodstain will be the dominant circumferential edge of the area of the original bloodstain. Comparative analysis with the results of DNA analysis revealed that washing older bloodstains from the cotton fabric makes it easier to remove the DNA, while the visual feature of bloodstains originating from hemoglobin is more difficult to remove in older bloodstains. The statistical significance of the DNA degradation index of the material remaining in the bloodstains after washing was revealed at the same time concerning the washing temperature (95 and 60°C) and the application of the detergent, with the existence of a synergistic enhancing effect of these two factors on the DNA degradation index. This pattern is completely absent in the sample group washed at 30°C. By comparing the results, it was concluded that different experimental conditions in this study,

namely water temperature and detergent, affect different target parts of DNA (different STR loci) and thus accelerate the degradation of DNA. Therefore, early-stage DNA degradation does not occur uniformly in all parts of the genetic material, but this effect is lost with the passage of time and degradation becomes more alike in all parts of the DNA. This research identifies certain new scientific facts that provide forensic experts with a new perspective on concealing the traces of crime.

Scientific Field:	Medical sciences
Scientific Discipline:	Forensic medicine
Key Words:	forensic science, bloodstain, bloodstain pattern analysis, DNA analysis, DNA degradation, detergent, machine washing
UDC:	340.66:577.212(043.3)
CERIF Classification:	B770 Legal medicine
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

SADRŽAJ

SADRŽAJ	7
ZAHVALNICA	11
SKRAĆENICE	12
UVOD	13
ANALIZA OBRAZACA KRVNIH MRLJA	13
MEĐUNARODNA ASOCIJACIJA ANALITIČARA OBRAZACA KRVNIH MRLJA	14
SVRHA BPA	14
ISTORIJAT	16
POČECI I RAZVOJ	16
SAVREMENA ISTORIJA	18
FIZIČKE KARAKTERISTIKE FORMIRANJA KAPI KRVI I KRVNE MRLJE	20
FORMIRANJE KAPI KRVI	20
OBLIK KAPI KRVI	20
VELIČINA KAPI KRVI	21
VISINA SLOBODNOG PADA KAPI KRVI	22
TERMINOLOGIJA BPA	24
KLASIFIKACIJA KRVNIH MRLJA	27
PRAKTIČNA PRIMENA NAUČNOG METODA U BPA	31
PASIVNE KRVNE MRLJE	34
KAPI KRVI NA RAVNOJ POVRŠINI	34
KAPI KRVI NA KOSOJ POVRŠINI	35
OBRAZAC KAPANJA	35
OBRAZAC PUTANJE KAPANJA	36
OBRAZAC PROLIVANJA	37
OBRAZAC SLIVANJA	37
LOKVA	38
NATAPANJE	39
TRANSFER	39
PRSKANE KRVNE MRLJE	43
FIZIČKE KARAKTERISTIKE OBRAZACA PRSKANJA	43
MEHANIZMI NASTANKA OBRAZACA PRSKANJA	44

1. Sekundarni mehanizam	45
2. Mehanizam udara	45
3. Mehanizam istiskivanja	48
IZMENJENJE KRVNE MRLJE	53
DIFUZIJA I KAPILARNOST KRVNIH MRLJA	53
STARENJE KRVI	54
SUŠENJE KRVI	55
ZGRUŠAVANJE KRVI	57
RAZBLAŽENE KRVNE MRLJE	58
AKTIVNOSTI ŽIVOTINJA	58
PRAZNINA	59
REDOsled U OBRASCIMA KRVNIH MRLJA	60
POKUŠAJI PRIKRIVANJA TRAGOVA ZLOČINA I UKLANJANJE KRVNIH MRLJA	62
DEGRADACIJA DNK	65
POVOD ZA ISTRAŽIVANJE	67
CILJ	69
HIPOTEZE	70
MATERIJAL I METODE	71
KRV	71
TKANINA	71
OBELEŽAVANJE UZORAKA	71
PRIPREMA UZORAKA	72
KONTROLNI UZORCI	72
MAŠINA ZA PRANJE VEŠA	72
PRANJE	73
DETERDŽENT	73
VIZUELNI PREGLED	73
DOKAZIVANJE PRISUSTVA KRVI	74
IZOLACIJA DNK	74
KVANTIFIKACIJA I INDEKS DEGRADACIJE DNK	74
AMPLIFIKACIJA, ELEKTROFOREZA I ANALIZA DNK PROFILA	74
STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	74
REZULTATI	76
DOKAZIVANJE PRISUSTVA KRVI U UZORCIMA	76

UTICAJ PROTOKA VREMENA NA IZGLED KRVNE MRLJE NA TKANINI PRE PRANJA	77
UTICAJ VREMENA SUŠENJA KRVNE MRLJE NA ANALIZU OPRANE OKRVAVLJENE TKANINE	78
1. Grupa H+ (mašinsko pranje na 95°C uz primenu deterdženta Ariel)	78
2. Grupa H- (mašinsko pranje na 95°C bez deterdženta Ariel)	79
3. Grupa V+ (mašinsko pranje na 60°C uz primenu deterdženta Ariel)	80
4. Grupa V- (mašinsko pranje na 60°C bez deterdženta Ariel)	82
5. Grupa P+ (simulirano ručno pranje na 30°C uz primenu deterdženta Ariel)	84
6. Grupa P- (simulirano ručno pranje na 30°C bez deterdženta Ariel)	86
UTICAJ STAROSTI KRVNE MRLJE, NAČINA PRANJA OKRVAVLJENE TKANINE I PROTOKA VREMENA NAKON PRANJA NA KONCENTRACIJU I DEGRADACIJU DNK MATERIJALA	89
<i>Uticaj temperature vode pranja okrvavljene tkanine na koncentraciju DNK</i>	89
<i>Uticaj temperature vode pranja okrvavljene tkanine na indeks degradacije DNK</i>	89
<i>Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi do pranja</i>	90
<i>Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi do pranja</i>	91
<i>Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do analize uzorka</i>	91
<i>Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do početka analize</i>	93
<i>Uticaj deterdženta na koncentraciju i degradaciju DNK</i>	94
<i>Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja</i>	94
<i>Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja</i>	96
<i>Koncentracija DNK u odnosu na temperaturu vode pranja okrvavljene tkanine i u odnosu na primenu deterdženta za pranje</i>	97
<i>Indeks degradacije DNK u odnosu na temperaturu vode pranja i u odnosu na korišćenje deterdženta za pranje</i>	98
<i>Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja</i>	100
<i>Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja</i>	101
<i>Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja uzoraka do analize i u odnosu na primenu deterdženta za pranje</i>	103
INTENZITET SIGNALA I VELIČINA STR SEGMENTA U DNK PROFILU U ODNOSU NA RAZLIČITE NAČINE PRANJA OKRVAVLJENE TKANINE I PROTOK VREMENA NAKON PRANJA	104
<i>Odnos intenziteta signala i veličine STR segmenta u DNK profilu</i>	105
<i>Korelaciona analiza</i>	109
TRANSFER KRVI IZ PODRUČJA KRVNE MRLJE NA NEOKRVAVLJENE DELOVE PAMUČNE TKANINE	110
DISKUSIJA	113

VIZUELNI EFEKTI PRANJA OKRVAVLJENE PAMUČNE TKANINE I SEKUNDARNI TRANSFER DNK	113
KVANTIFIKACIJA I DEGRADACIJA DNK U KRVNOJ MRLJI NAKON PRANJA	117
DNK PROFILI EKSPERIMENTALNIH UZORAKA I ODNOS STR LOKUSA	120
ZAKLJUČCI	123
PREPORUKE	125
LITERATURA	126
BIOGRAFIJA AUTORA	132

Zahvalnica

Veliku i posebnu zahvalnost iskazujem sledećim osobama:

Prof. dr Goranu Iliću, specijalisti sudske medicine, šefu Katedre za sudsku medicinu i direktoru Zavoda za sudsku medicinu u Nišu, svom mentoru – na nesebičnoj podršci i dobronamernim savetima, koji su u značajnoj meri doprineli da ova disertacija bude izrađena do svoje konačne forme.

Prof. dr Radovanu Karadžiću, specijalisti sudske medicine, bivšem direktoru Zavoda za sudsku medicinu u Nišu – na ukazanom poverenju u realizaciji višegodišnje ideje o uvođenju „traseologije“ u Zavod za sudsku medicinu u Nišu, a što je u krajnjoj meri imalo za rezultat rađanje pionirskih ekperimentalnih ideja iz kojih se rodila i ideja za izradu ove doktorske disertacije.

Dr. sci. Aleksandri Stefanović, molekularnom biologu i fiziologu i šefu DNK laboratorije Zavoda za sudsku medicinu u Nišu – za stručnu pomoć i podršku, kao i za izuzetno vredne naučne savete koji su doprineli pravilnom eksperimentalnom usmerenju aktuelnog istraživanja, te i za izuzetnu stručnu pomoć u pravilnom interpretiranju kompleksnih rezultata istraživanja.

Aniti Jovančov, laboratorijskom tehničaru DNK laboratorije Zavoda za sudsku medicinu u Nišu – za nezamenljivu podršku i pomoć u tehničkom izvođenju obimnog i dugotrajnog eksperimenta, koji je ukupno trajao nešto više od godinu dana, te samim tim i za izuzetno razumevanje i strpljenje do samog kraja istraživanja.

Doc. dr Aleksandri Antović, specijalisti sudske medicine iz Zavoda za sudsku medicinu u Nišu – za iskazanu kolegijalnost i pruženu tehničku pomoć tokom procesa pripreme uzoraka.

Dr Saši Veličkoviću, Dr Mariji Belić, Dr Bogdanu Pinteroviću i Dr Dimitriju Pančiću, doktorima medicine na specijalizaciji iz sudske medicine u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu – za iskazanu kolegijalnost i pruženu tehničku pomoć tokom procesa pripreme i obrade eksperimentalnih uzoraka.

Skraćenice

BPA – analiza obrazaca krvnih mrlja (eng. Bloodstain pattern analysis)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

FBI – Federalni istražni biro Sjedinjenih američkih država (eng. Federal Bureau of Investigation)

IABPA – Međunarodna asocijacija analitičara obrazaca krvnih mrlja (eng. International association of bloodstain pattern analysts)

STR – kratko tandemsko ponavljanje (eng. Short Tandem Repeats). Javlja se kao lokus u nekodirajućem regionu DNK i predstavlja obrazac sekvence sa dva do sedam nukleotida koji se ponavlja određeni broj puta, pri čemu su ponavljajuće sekvence raspoređene u kontinuiranom nizu neposredno jedna uz drugu

SWGSTAIN – Naučna radna grupa za analizu obrazaca krvnih mrlja (eng. Scientific Working Group for Bloodstain Pattern Analysis)

UVOD

Krv je jedan od najznačajnijih i najčešćih tipova fizičkih dokaza vezanih za forenzičku analizu smrti i nasilja uopšte. Identifikacija i individualizacija krvnih mrlja ljudskog porekla predstavlja srž analize krvi u forenzici, a ovakve analize su se naročito razvijale tokom poslednjih 100 godina. Jedan od ključnih impulsa ekstenzivnom razvoju savremene forenzike predstavlja rad Ser Alek Džefrisa (eng. Sir Alec Jeffreys), koji je tokom 1985. godine postavio osnove današnjem DNK profilisanju. Savremene DNK analize omogućavaju nam da sa gotovo apsolutnom sigurnošću utvrdimo identitet osobe od koje tragovi krvnih mrlja potiču. Međutim, to u savremenoj forenzici nije dovoljno. Pored otkrivanja identiteta osobe koja je izvor krvnih mrlja na dokaznim predmetima, neophodno je razjasniti i mehanizme, odnosno načine i okolnosti koje su uzrokovale nastanak tragova krvi. Danas identifikacija i individualizacija ljudske krvi stoje u uskoj povezanosti sa relativno novom naučnom disciplinom koja se bavi upravo razjašnjenjima mehanizama nastanka tragova krvi, odnosno krvnih mrlja na dokaznim predmetima.

Analiza obrazaca krvnih mrlja

Do skora se u Srbiji forenzička disciplina koja se bavila interpretacijom mehanizma nastanka tragova krvi i svih drugih bioloških tragova arhaično nazivala **traseologija**. Tek pre nekoliko decenija u svetu, u okviru sudskomedicinske i forenzičke nauke, pojavila se posebna naučna disciplina pod nazivom **Analiza obrazaca krvnih mrlja (eng. Bloodstain pattern analysis - BPA)**. Analiza obrazaca krvnih mrlja predstavlja naučnu disciplinu koja koristi znanja i naučne metode iz područja medicine, biologije, fizike i matematike, te na osnovu distribucije, izgleda, oblika i veličine krvnih mrlja pruža objašnjenja o vrsti i mehanizmima aktivnosti pod kojima su te mrlje nastale.

Odgovori o kompleksnoj prirodi mehanizama nastanka krvnih mrlja na dokaznim predmetima proizilaze iz prirode i vrste povreda učesnika kriminalnog akta, rezultata DNK analize, eksperimentalnog rada na polju dinamike fluida i trigonometrijskih proračuna. BPA se vrši neposrednim uvidom mesta zločina i/ili detaljnom analizom fotografija sačinjenih od strane kriminalističkih tehničara, uz detaljan pregled odeće učesnika, povrednih sredstava i drugih predmeta od značaja. Takođe, neophodno je detaljno analizirati obdukcioni zapisnik i/ili medicinsku dokumentaciju, kao i skice, dijagrame i laboratorijske izveštaje. Savremeno

shvatanje BPA bazirano je na savremenom shvatanju nauke, odnosno sve ono što se tvrdi u mišljenju mora biti čvrsto potkrepljeno činjenicama i njihovom sistematičnom analizom. BPA predstavlja novu naučnu disciplinu koja koristi znanja i veštine drugih nauka. Savremeni analitičar obrazaca krvnih mrlja mora poznavati ljudsko telo i njegove bitne anatomske karakteristike i to u prvom redu karakteristike cirkulacije, fizičko-reološke karakteristike krvi, fizičke promene krvi pod uticajem faktora spoljašnje sredine, osnove trigonometrijskih funkcija i načine njihovih primena i dr.

Međunarodna asocijacija analitičara obrazaca krvnih mrlja

Međunarodna asocijacija analitičara obrazaca krvnih mrlja (eng. International association of bloodstain pattern analysts - IABPA) osnovana je 1983. godine. Svrha postojanja IABPA je promocija znanja i veština, kao i razumevanje dokazne snage krvnih mrlja. Asocijacija trenutno okuplja nešto više od 1000 eksperata širom sveta, koji se na naučnim osnovama bave interpretacijom tragova krvi. Većina ovih analitičara je radno angažovana u visoko razvijenim svetskim zemljama (Sjedinjene Američke Države, Kanada, Velika Britanija, Francuska, Nemačka, Holandija, Švedska, Australija i dr.). Na području čitavog Balkana, uključujući i Srbiju, aktuelno su aktivna samo dva analitičara obrazaca krvnih mrlja koji rade upravo u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu, tako da su popularizacija i omasovljenje ove nove naučne discipline na našim prostorima ključni za dalji razvoj sudske medicine i forenzičke nauke uopšte.

Svrha BPA

Kao i svakoj drugoj forenzičkoj disciplini, zadatak BPA je rasvetljavanje činjenica o nekom spornom događaju. Analiza fizičkih karakteristika (izgled, oblik, veličina i distribucija) krvnih mrlja pruža specifične informacije o događajima koji su se dešavali tokom kriminalnog akta. Nakon završetka svih faza odigravanja krivičnog dela sa otvorenim povredama učesnika ostaju tragovi krvi, koji predstavljaju „statičku sliku“ prethodnih dinamičkih i raznolikih dešavanja. Analizom ove „statičke slike“ moguće je otvoriti prozor u prošlost i objektivno sagledati određene aktivnosti tokom izvršenja krivičnog dela. Prozor otvoren od strane BPA ne pruža garanciju da će se uspešno potvrditi pretpostavljene okolnosti predmetnog slučaja, već nasuprot tome, često se dešava da upravo BPA pokaže da

mnogi „očigledni“ ili „nevažni“ tragovi krvi, samo fotografisani od strane kriminalističkih tehničara tokom vršenja uviđaja, upravo budu ključni dokazi da su se događaji u konkretnom slučaju odigrali na drugačiji način od pretpostavljenog.

BPA je bazirana na vrlo jednostavnoj teoriji: Krv je fluid koji na delovanje sile reaguje na predvidljiv način. Naime, tokom kriminalnog akta iz oblasti krvnih delikata, spoljašnji faktori koji deluju na telo žrtve mogu uzrokovati nastanak povrede praćene manifestnim krvarenjem. Tada unutrašnji faktori koji potiču od same krvi (površinski napon, viskoznost i kohezivne unutrašnje sile) reaguju sa faktorima spoljašnje sredine (gravitacija, otpor vazduha i sile koje su uzrokovale povredu). Ove interakcije sa određenom verovatnoćom predodređuju prirodu i način formiranja krvnih mrlja na ciljnom objektu, odnosno ako se delovanje sile ponovi na isti način i pod istim uslovima krv će se ponašati isto. Dakle, nastanak krvnih mrlja i obrazaca krvnih mrlja je **reproducibilan** i **predvidljiv**.

Istorijat

Počeci i razvoj

Pri pokušaju razumevanja BPA najbolje je osvrnuti se najpre na naučni razvoj. S obzirom na to da je BPA u Srbiji zaživela tek pre par godina, a u svetu se ovaj termin pominje već nekoliko decenija unazad, čitava javnost (tužioci, sudije, advokati, kriminalistički tehničari i dr.) o tome govori kao o nečem potpuno novom. Analiza tragova krvi na licu mesta je stara koliko i sama istraga ubistava i drugih dela, jer je nezamislivo istraživati lice mesta krivičnog dela bez analize najupečatljivijih tragova, odnosno tragova krvi. Prema tome, najbolje je BPA sa ovog aspekta definisati kao staro dokazno sredstvo na novi način.

Istorijat BPA počinje pre nekih 150 godina. Može se reći da je BPA preteča svih ostalih forenzičkih disciplina. Evropa se smatra kolevkom razvoja BPA. Prvi naučni časopis u kome su obrađivane teme identifikacija krvi i izgled tragova krvi nađenih na licu mesta bio je *Vierteljahresschrift für gerichtliche* (Kvartalno izdanje sudske medicine), koje je objavljivano u Nemačkoj u periodu od 1850. do 1940. godine. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Lassaigue je napisao 1856. godine *Neue untersuchungen zur erkennung von blutflacken auf eisen und stahl* (Novi način razlikovanja krvnih mrlja od gvožđa i čelika). Ovaj autor je prvi utvrdio i sličnost krvnih mrlja sa mrljama uzrokovanim aktivnostima insekata, primetio je kako ih je moguće razlikovati, ali nije tačno utvrdio mehanizam nastanka takvih mrlja, što je kasnijim istraživanjima objašnjeno. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Jedna od najimpresivnijih knjiga iz tog perioda je napisana 1895. godine od strane Eduarda Piotrowskog sa Univerziteta u Beču pod naslovom *Ueber entstehung, form, richtung und ausbreitung der blutspuren nach hiebwunden des kopfes* (Utvrđivanje porekla, oblika, usmerenosti i distribucije krvnih mrlja uzrokovanih udarcima u predelu glave). U svojim eksperimentima je koristio žive neanestezirane životinjske modele, što bi bilo neprihvatljivo sa današnjeg stanovišta nauke, na koje je delovao različitim povrednim sredstvima i prvi je opisao u svojoj knjizi neke od bitnih karakteristika obrazaca prskanja nastalih mehanizmom udara i samih prskanih mrlja u obrascima. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Hans Gross je 1904. godine napisao knjigu pod nazivom *Handbook fur untersuchungsrichter als system der kriminalistik*, u kojoj je pored analize prirode različitih obrazaca krvnih mrlja opisao i načine prikupljanja i dokumentovanja dokaznog materijala. Ova knjiga se smatrala refentnom u tom periodu, da bi 1924. godina bila prevedena na engleski jezik. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Dr W.F. Hesselink je razmatrao različite bitne stvari vezane za analizu krvnih mrlja u knjizi pod nazivom *Blutspuren in der kriminalistischen praxis* (Krvne mrlje u kriminalističkoj praksi) iz 1931. godine. Razmatrao je mogućnosti da se utvrdi da li karakteristike sasušenih krvnih mrlja na odeći mogu ukazati da li je odeća nošena u vreme nastanka mrlje. Takođe, razmatrao je i mogućnosti utvrđivanja starosti krvnih mrlja. Na kraju je utvrdio da su primenjivane tehnike neprecizne. S druge strane, razmatrao je mehanizme i načine nastanka krvnih mrlja, te je u sklopu okolnosti konkretnih slučajaja u svetlu drugih forenzičkih dokaza razmatrao i mogućnosti rekonstrukcije kritičnog događaja. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Još jedan od značajnih radova iz tog perioda je rad iz 1939. godine objavljen na XXII Kongresu sudske medicine pod nazivom *Etudes des gouttes de sang projecte*, koji su uradili Dr Victor Balthazard, R. Piedelievre, Henri Desolille i L. Derobert. Autori su po prvi put ukazali da nije bitno sagledavati samo krvnu mrlju, već je podjednako važno sagledati i karakteristike povrede koja je izvor nastanka krvnih mrlja, putanju krvi do ciljne površine i promene krvi prilikom formiranja mrlje. Balthazard je ukazao na značaj sagledavanja dinamike krvoprolića, za razliku od „sterilnih“ uslova u laboratorijama. On je utvrdio i način određivanja upadnog ugla kapi krvi, koji se koristi i dan danas. Navedena grupa autora je razvila i „metodu kanapa“ za određivanje područja nastanka obrasca prskanja. Takođe, isti autori su utvrdili da karakteristike ciljne površine u značajnoj meri mogu uticati na izgled krvnih mrlja. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Dr Paul Leland Kirk je takođe značajna ličnost u razvoju BPA. Bio je radno aktivan kao analitičar od 1935. do 1967. godine, a 1953. godine je izdao knjigu pod nazivom *Crime Investigation* u kojoj je obrađivana i BPA. Tokom rada je ukazivao na neophodnost sveobuhvatnog pristupa licu mesta izvršenja krivičnog dela. U jednom od čuvenih slučajeva na kojima je radio („Sheppard case“) upotrebio je celovit pristup analizi i na osnovu obrazaca odbacivanja i praznina, odnosno nedostajućih krvnih mrlja prvi primenio određivanje pozicije

napadača i pravca zamahivanja povrednim sredstvom. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Savremena istorija

Rad Dr Kirka tokom 60-ih godina prošlog veka inspirisao je mnoge autore čiji je kasniji rad doveo do preporoda BPA. Broj autora zainteresovanih za ovu oblast progresivno i ubrzano je rastao, nastajale su profesionalne organizacije i udruženja, a BPA je dobila značajno mesto i priznatost na sudskim procesima.

Mnogi smatraju Herbert MacDonell-a ocem savremene BPA, koji je dosta doprineo značajnom usponu discipline u tom periodu. MacDonell i Lorraine Bialousz, nakon obavljanja opsežnih istraživanja, 1970. godine objavili su svoja istraživanja pod nazivom *Flight Characteristics and Stain Patterns of Human Blood*. MacDonell je 1973. godine organizovao prvi formalni edukacioni program iz BPA i osnovao je prvi institut za krvne mrlje u Jackson-u u državi Misisipi u SAD. Naredni rad je objavljen 1982. godine pod nazivom *Bloodstain Pattern Interpretation*, a MacDonell je objavio i treću knjigu 1993. godine pod nazivom *Bloodstain Patterns*. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

IABPA je osnovana 1983. godine. Te godine je MacDonell organizao prvi napredni kurs BPA, a učesnici kursa su nakon toga osnovali IABPA. (www.iabpa.org; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Journal of Forensic Science objavio je 1986. godine dva rada pod nazivom *Blood Droplet Dynamics I and II*. Grupa autora je ispitivala karakteristike kapljica krvi u letu i njihovo ponašanje prilikom kontakta sa ciljnom površinom. Učinjen je veliki napredak u razumevanju ponašanja krvi izložene delovanju sile. (Pizzola PA et al., 1986)

William Eckert i Stuart James objavili su 1989. godine knjigu pod nazivom *Interpretation of Bloodstain Evidence at Crime Scenes*. Mada je knjiga pretrpela ozbiljne kritike, ovo se može smatrati prvom knjigom koja objedinjuje znanja iz oblasti BPA. Drugo izdanje ove knjige je objavljeno 1998. godine uz veoma povoljne kritike, tako da je drugo izdanje postalo veoma važna referenca. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Tom Bavel i Ross Gardner objavili su 1990. godine knjigu pod nazivom *Bloodstain Pattern Analysis: Theory and Practice: a Laboratory Manual*. Drugo izdanje knjige ovih autora objavljeno je 1997. godine pod nazivom *Bloodstain Pattern Analysis with an Introduction to Crime Scene Reconstruction*, a treće poslednje izdanje je objavljeno 2008. godine pod istim naslovom. (Bevel T et Gardner RM, 2008)

Stuart James je zajedno sa grupom veoma uticajnih autora objavio 1998. godine knjigu pod nazivom *Scientific and Legal Applications of Bloodstain Pattern Analysis*, koja je naročito namenjena sudijama, tužiocima i advokatima, a predstavlja kompilaciju odabranih poglavlja BPA i posebno razmatra praktičnu primenu BPA u sudskim procesima. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Anita Wonder je objavila svoju knjigu 2001. godine pod nazivom *Bloodstain Dynamics*. U svojoj knjizi je obuhvatila situacije koje se smatraju kontroverznim, te tako navodi da može utvrditi karakteristike obrasca prskanja na osnovu samo jedne prskane mrlje iz obrasca. Ukoliko se zanemare ovakve stvari, knjiga je veoma dobar izvor korisnih informacija, te se i smatra veoma vrednom referencom. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Federalni istražni biro u SAD (FBI) oformio je 2002. godine SWGSTAIN, odnosno grupu koja je okupljala stručnjake širom sveta i imala je zadatak da istraži i definiše jasne smernice u BPA. (SWGSTAIN, 2009 et 2011; www.swgstain.org)

Stuart James, Paulette Sutton i Paul Kish objavili su 2005. godine knjigu pod nazivom *Principles of Bloodstain Pattern Analysis Theory and Practice*, koja se i dan danas smatra jednom od najznačajnijih knjiga u edukaciji novih analitičara. (James SH et al., 2005)

Fizičke karakteristike formiranja kapi krvi i krvne mrlje

Formiranje kapi krvi

Krv se po površini nekog objekta kreće pod uticajem gravitacije i teži da dosegne što niži položaj, te da time smanji svoju potencijalnu energiju. Kada krv dospe do najnižeg položaja na nekom objektu ona ne pada odmah sa tog objekta, već se krv postepeno nakuplja, odnosno akumulira u tom najnižem položaju. Akumuliranje krvi u najnižoj tački nekog objekta se odvija zahvaljući kohezivnim silama unutar same krvi, odnosno silama privlačenja između istorodnih molekula, kao i adhezivnim silama, odnosno silama privlačenja između sastavnih molekula krvi i površine objekta na kojoj se krv nalazi. Ove kohezivne i adhezivne sile uzrokuju postojanje površinskog napona tečnosti i samim tim krvi, a deluju nasuprot sili gravitacije. Međutim, kako se krv i dalje sliva niz objekat pod uticajem gravitacije, u navedenoj najnižoj tački objekta dolazi do progresivnog nakupljanja sve veće i veće količine krvi. U trenutku kada sila gravitacije, koja progresivno tokom vremena raste, jer je zavisna od mase krvi nakupljene na najnižem delu objekta, premaši kohezivne i adhezivne sile u samoj krvi, dolazi do odvajanja određene količine krvi i formiranja kapi krvi koja zatim nastavlja kretanje pod uticajem gravitacije. (Bevel T et Gardner RM, 2008; Breithaupt J, 2001; James SH et al., 2005; Pizzola PA et al., 1986; Raymond MA et al., 1995)

Oblik kapi krvi

Nakon odvajanja od izvora kap krvi u slobodnom padu je najpre blago izdužena, odnosno blago elipsasta. Kako slobodna kap nastavlja kretanje pod uticajem gravitacije, odnosno pada ka tlu, nastupaju oscilacije kapi koje su uzrokovane površinskim naponom. Površinski napon je uzrokovan prethodno navedenim kohezivnim silama unutar krvi, odnosno kohezivnim silama na samoj površini kapi krvi koji potiču od molekula krvi sa same granice ka drugoj sredini to jest vazduhu. Površinski napon teži da slobodnoj kapi krvi stvori minimalnu kontaktnu površinu prema vazduhu, a to je upravo oblik sfere. Međutim, s obzirom na to da pri slobodnom padu kapi krvi postoji otpor vazduha koji usporava kretanje kapi, to je oblik kapi krvi blago spljošten na donjem kraju. Što je kap krvi veća to će i oscilacije kapi neposredno nakon njenog odvajanja od izvora biti veće i to će uticaj otpora vazduha na spljoštenost dna kapi biti veća. Krv je četiri puta viskozija od vode, tako da i oscilacije kapi krvi u poređenju sa kapi vode znatno brže budu amortizovane od trenutka

odvajanja kapi od njihovog izvora. S druge strane, eksperimentalnim radovima je pokazano da se za potrebe BPA i daljih istraživanja može zanemariti uticaj otpora vazduha na sferični oblik kapi krvi u slobodnom padu, odnosno uticaj nije merljiv metodama koje se primenjuju u svakodnevnom radu analitičara. Ovo se naročito odnosi na kapi krvi koje nastaju u sklopu obrazaca prskanja uzrokovane udarnim mehanizmom, jer su tada kapi izuzetno male i samim tim oscilacije kapi i uticaj otpora vazduha na oblik kapi je zanemarljiv. Primera radi, oscilacije kapi krvi uglavnom budu amortizovane tokom prvih 0,05 sekundi njihovog puta, dok kapi krvi prečnika oko 2 mm tokom leta ne osciluju za više od 1% svog prečnika. (Bevel T et Gardner RM, 2008; Breithaupt J, 2001; James SH et al., 2005; Pizzola PA et al., 1986; Raymond MA et al., 1995)

Veličina kapi krvi

Prihvaćeni standard za potrebe kliničkog rada je da u 1 ml krvi ima 20 kapi krvi, odnosno da je prosečna veličina kapi krvi 50 μ l. Međutim, za potrebe BPA to nije dovoljno. Primećeno je da prilikom profuznog krvarenja dolazi do formiranja većih kapi krvi od standardnih. S druge strane, usporeno krvarenje ne utiče na formiranje manjih kapi krvi. Istraživanja u BPA su pokazala da veličina kapi krvi zavisi od karakteristika objekta koji je izvor nastanka kapi krvi. Trenutak nadmašivanja površinskog napona (kohezivnih i adhezivnih sila) kapi krvi od strane sile gravitacije ($F=g \cdot m$; g-ubrzanje zemljine teže, m-masa kapi krvi) je trenutak koji određuje upravo veličina kapi krvi koja se postepeno akumulira i povećava slivanjem krvi u najniže delove objekta na kome se nalazi tečna krv. Ako se kapi krvi formiraju na većoj površini, to će uzrokovati veći površinski napon krvi koja se akumulira i samim tim slobodne kapi krvi koje nastaju biće veće. Primer za to su kapi krvi koje se formiraju na masivnom kraju čekića, na oblom kamenu, na masivnoj zaobljenoj drvenoj motki i sl., gde će kapi biti naglašenije veće, dok će formirane kapi krvi sa vrha noža ili vlasi kose biti znatno manje. Takođe, pored oblika i veličine samog objekta sa koga nastaju kapi krvi, na veličinu nastalih kapi krvi ima veliki uticaj i hemijska karakteristika površine izvornog objekta. Ukoliko se na površini izvornog objekta nalaze hemijska sredstva koja smanjuju adhezivne sile krvi, kao što je na primer mast i masno tkivo koje se često sreću u realnim forenzičkim slučajevima, to će nastale kapi krvi biti manje u prečniku, odnosno sila gravitacije će brže odvajati pojedinačne kapi krvi od objekta na kome se nalazi tečna krv.

Maksimalni volumen stabilne kapljice krvi u slobodnom padu iznosi oko 60 μ l. S druge strane, postoji i minimalni volumen kapljice koja može biti formirana samo uticajem gravitacije i iznosi oko 12 μ l, što znači da gravitacija zbog male mase kapljica ne deluje dovoljno velikim intenzitetom sile na krv da bi spontano došlo do formiranja kapljice u slobodnom padu. Kapljice volumena oko 10 μ l u slobodnom padu mogu biti formirane uz potresanje predmeta na kome se krv nakuplja. Prečnik kapljica krvi nastalih samo uticajem gravitacije kreće se od 3 do 5,5 mm, dok rezultirajuća krvna mrlja na ciljnoj površini može biti prečnika do čak 25 mm. S druge strane, volumen kapljica krvi nastalih mehanizmom prskanja uglavnom je mali i kreće se reda veličine ispod 0,007 ml, a njihov prečnik kreće se najčešće u rasponu od 0,125 do 2 mm i to sa prosečnim prečnikom kapljice od oko 0,74 mm. Ovo nije apsolutni raspon veličina kapljica za sve obrasce prskanja, već u praksi može doći i do značajnih odstupanja od navedenih veličina. Prikaz navedenih veličina kapljica omogućava nam da razumemo zašto su ovalne krvne mrlje nastale slobodnim kapanjem krvi sa okrvavljenog objekta veće u poređenju sa ovalnim mrljama koje nastaju mehanizmima prskanja. Dakle, isključivo dejstvo gravitacije uzrokuje nastajanje velikih kapljica krvi u slobodnom kretanju. (Attingera D et al., 2013; Bevel T et Gardner RM, 2008; Breithaupt J, 2001; James SH et al., 2005; Pizzola PA et al., 1986; Raymond MA et al., 1995)

Visina slobodnog pada kapi krvi

Na predmete u slobodnom padu deluje sila zemljine teže ($F=g \cdot m$). To praktično znači da bi u vakumu tela u slobodnom padu imala konstantno ubrzanje sve dok ne padnu na tlo i time njihovo kretanje bude zaustavljeno. Međutim, u realnim situacijama kada je u pitanju BPA otpor vazduha ne može i ne sme biti ignorisan. Sa progresivnim ubrzanjem kapi krvi u slobodnom padu dolazi do znatnog progresivnog povećanja otpora vazduha. U jednom trenutku sila otpora vazduha i sila zemljine teže imaju istu vrednost, tako da kap krvi u slobodnom padu nastavlja kretanje konstantnom brzinom, odnosno više ne ubrzava tokom slobodnog pada. Ta brzina kapi krvi u slobodnom padu se naziva maksimalna krajnja brzina. Za „tipičnu“ kap krvi od 50 μ l maksimalna krajnja brzina se postiže pri slobodnom padu sa visine od oko 5-6 metara. Prilikom pada kapi krvi na podlogu dolazi do formiranja krvne mrlje. Što je bila veća brzina kapi krvi to će i nastala krvna mrlja na podlozi biti veća. Sa praktičnog stanovišta gotovo da nema merljive razlike pri padu kapi krvi sa visine od oko 1,5 m i prethodno navedenih 5-6 metara koji su pokazani eksperimentima. Bitan ograničavajući

faktor nastanka sve većih i većih krvnih mrlja je pored malog povećanja brzine kapi krvi u slobodnom padu sa veće visine i sam volumen kapi krvi. Praktičan primer za to je nemogućnost da se okreči cela soba sa jednom kapi boje, ma koliko ona bila jako zamahnuta ka ciljnom zidu. (Attingera D et al., 2013; Bevel T et Gardner RM, 2008; Breithaupt J, 2001; James SH et al., 2005; Pizzola PA et al., 1986)

Terminologija BPA

U prošlosti se svaki ekspert u oblasti BPA koristio uglavnom sebi svojstvenom terminologijom, tako da je neretko dolazilo do nesporazuma i nejednake formalne interpretacije krvnih mrlja sa mesta zločina. Preblem nedostatka jedinstvene terminologije prepoznat je od strane Federalnog istražnog biroa Sjedinjenih američkih država (eng. Federal Bureau of Investigation - FBI), koji je okupio priznate eksperte u oblasti BPA i sačinjena je Naučna radna grupa za analizu obrazaca krvnih mrlja (eng. Scientific Working Group for Bloodstain Pattern Analysis - SWGSTAIN). Prvi sastanak radne grupe je održan 2002. godine. U daljem radu načinjena je preporuka terminologije za potrebe BPA, koja je i dan danas priznata i primenjuje se u praksi analitičara. Terminologija je zvanično napisana na engleskom jeziku, a aktuelno je prevedena na svega 15 jezika, među kojima se nalazi i srpski jezik. Zvanični pristup terminologiji na srpskom jeziku u oblasti BPA dostupan je na internet stranici IABPA (<http://www.iabpa.org/serbian>, Tabela 1). Formiranje zvanične terminologije na srpskom jeziku je samo prvi korak u popularizaciji BPA u Srbiji.

Tabela 1. SWGSTAIN terminologija prevedena na srpski jezik

English	Srpski	Opis
Accompanying drop	Prateća kap	Mala kap krvi koja nastaje kao nusprodukt formiranja glavne kapi krvi.
Altered Stain	Izmenjena mrlja	Krvna mrlja sa karakteristikama koje ukazuju na to da se desila neka fizička promena.
Angle of Impact	Upadni ugao	Oštar ugao (alfa), u odnosu na površinu ciljnog objekta, pod kojim je kap krvi udarila u ciljni objekat.
Area of Convergence	Područje konvergencije	Područje u kojem se seku prave provučene kroz dužu osovinu pojedinačnih mrlja, a koje predstavlja dvodimenzionalnu poziciju izvora krvi.
Area of Origin	Područje nastanka	Trodimenzionalna pozicija mesta odakle je nastalo prskanje krvi.
Backspatter Pattern	Obrazac povratnog prskanja	Obrazac prskane krvi nastao od kapi krvi koje su putovale u suprotnom smeru od smera delovanja sile; povezano sa ulaznom ranom projektila u telo.
Blood clot	Ugrušak krvi	Želatinozna masa nastala kompleksnim mehanizmom koji uključuje eritrocite, fibrinogen, trombocite i

		ostale faktore koagulacije.
Bloodstain	Krvna mrlja	Depozit (nakupina) krvi na nekoj površini.
Bloodstain pattern	Obrazac krvnih mrlja	Grupisanje ili distribucija krvnih mrlja koje kroz pravilnost ili ponavljajuću formu, redosled ili raspored ukazuju na način njihovog nastanka.
Bubble Ring	Prsten mehurića	Kontura unutar krvne mrlje koja je uzrokovana prisustvom mehurića vazduha u krvi.
Cast-off Pattern	Obrazac odbacivanja	Obrazac krvne mrlje nastao od kapi krvi odbačenih sa zamahnutog predmeta.
Cessation Cast-off Pattern	Obrazac zaustavnog odbacivanja	Obrazac krvne mrlje nastao od kapi krvi odbačenih sa predmeta u pokretu pri naglom zaustavljanju tog predmeta.
Directionality	Usmerenost	Karakteristika krvne mrlje koja ukazuje na pravac iz kojeg je krv naneta na ciljni objekat.
Directional Angle	Ugao usmerenosti	Ugao (gama) između uzdužne osovine prskane mrlje i definisane referentne linije na ciljnom objektu.
Drip Pattern	Obrazac kapanja	Obrazac krvne mrlje nastao kapanjem tečnosti u drugu tečnost, od kojih je makar jedna krv.
Drip Stain	Kapljična mrlja	Krvna mrlja nastala od kapi krvi, a koja je formirana uticajem gravitacije.
Drip Trail	Putanja kapanja	Obrazac krvne mrlje nastao kretanjem izvora sa koga krv kaplje između dve tačke.
Edge Characteristic	Obodna karakteristika	Fizička karakteristika obodne ivice krvne mrlje.
Expiration Pattern	Obrazac iskašljavanja	Obrazac krvne mrlje nastao od krvi izbačene pod pritiskom vazdušne struje iz nosa, usta ili rane.
Flow Pattern	Obrazac slivanja	Obrazac krvne mrlje nastao pomeranjem nakupljene krvi na ciljnom objektu pod uticajem gravitacije ili pomeranjem samog ciljnog objekta.
Forward Spatter Pattern	Obrazac prskanja prema napred	Obrazac krvne mrlje nastao od kapi krvi koje su se kretale u istom pravcu sa pravcem delovanja sile.
Impact Pattern	Obrazac udarca	Obrazac krvne mrlje nastao pri udaranju predmetom po tečnoj krvi.
Insect Stain	Insektna mrlja	Krvna mrlja nastala aktivnošću insekata.
Mist Pattern	Obrazac	Obrazac krvne mrlje nastao raspršivanjem krvi do

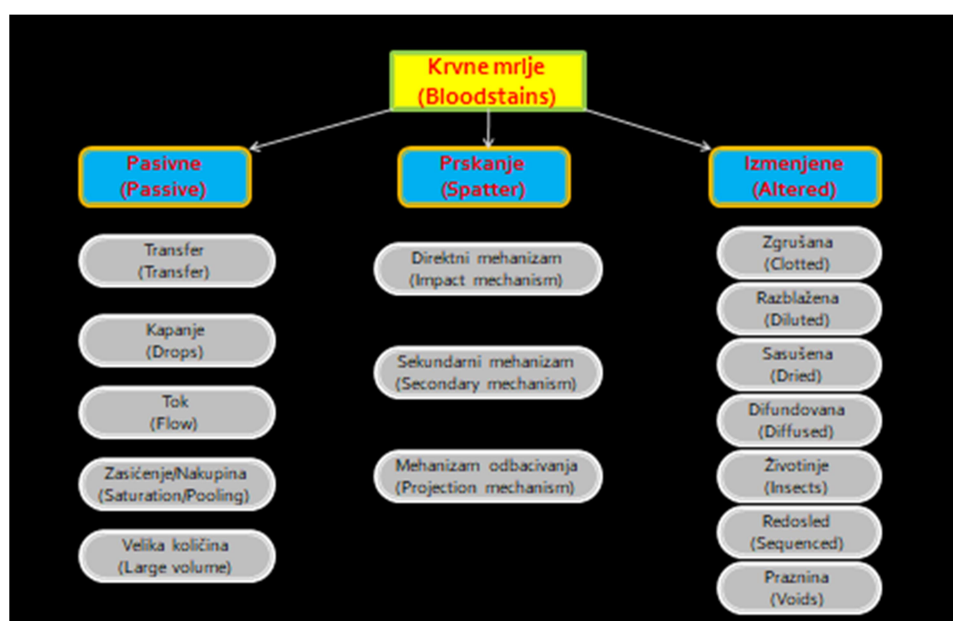
	raspršivanja	mikro-kapljica, a kao rezultat velikog intenziteta primenjene sile.
Parent Stain	Glavna mrlja	Krvna mrlja od koje je nastala satelitska mrlja.
Perimeter Stain	Perimetarska mrlja	Izmenjena mrlja koja se sastoji samo od obodne karakteristike prvobitne mrlje.
Pool	Lokva	Krvna mrlja nastala nakupljanjem tečne krvi na ciljnom objektu.
Projected Pattern	Obrazac istiskivanja	Obrazac krvne mrlje nastao izbacivanjem krvi pod pritiskom.
Satellite Stain	Satelitska mrlja	Mala krvna mrlja koja je nastala prilikom formiranja glavne mrlje u trenutku kontakta kapi krvi sa ciljnim objektom.
Saturation Stain	Saturaciona mrlja	Krvna mrlja nastala natapanjem apsorbujućeg materijala tečnom krvlju.
Serum Stain	Serumska mrlja	Mrlja nastala od tečne frakcije krvi (serum) koja je izdvojena prilikom koagulacije krvi.
Spatter Stain	Prskana mrlja	Krvna mrlja nastala od kapi krvi raspršene kroz vazduh delovanjem spoljašnje sile na tečnu krv.
Splash Pattern	Obrazac prolivanja	Obrazac krvne mrlje nastao padanjem ili prolivanjem određene količine krvi na ciljnu površinu.
Swipe Pattern	Obrazac brisanja	Obrazac krvne mrlje nastao transferom krvi sa okrvavljenog predmeta na drugu površinu, sa karakteristikama koje ukazuju na relativno kretanje između ta dva predmeta.
Target	Ciljni objekat	Površina na koju je krv naneta.
Transfer Stain	Transferna mrlja	Krvna mrlja nastala kontaktom okrvavljenog predmeta i ciljne površine.
Void	Praznina	Odsustvo krvi u inače kontinuiranoj krvnoj mrlji ili obrascu krvne mrlje.
Wipe Pattern	Obrazac razmazivanja	Obrazac izmenjene krvne mrlje nastao pomeranjem nekog predmeta kroz postojeću vlažnu krvnu mrlju.

Klasifikacija krvnih mrlja

Postoje određene suštinske razlike između krvnih mrlja i obrazaca krvnih mrlja. Svaka mrlja nastala od određenog izvora krvi naziva se krvna mrlja. Ukoliko se u izgledu krvne mrlje ili u specifičnoj distribuciji većeg broja krvnih mrlja uoči određena pravilnost ili karakterističnost, onda se može govoriti o obrascu krvnih mrlja. Obrazac krvnih mrlja ukazuje svojom specifičnošću na način i okolnosti koje su uzrokovale nastanak tih tragova krvi.

Pored napora različitih autora da se formira klasifikacija krvnih mrlja, danas postoji nekoliko različitih klasifikacija i neusaglašen stav vodećih stručnjaka kako bi zvanična jedinstvena klasifikacija trebalo da izgleda. Aktuelno najprihvatljivija klasifikacija krvnih mrlja i obrazaca krvnih mrlja objavljena je u knjizi autora Stuart James, Paul Kish i Paulette Sutton pod nazivom *Principles of Bloodstain Pattern Analysis – Theory and Practice* (Tabela 2). Krvne mrlje i obrasci krvnih mrlja klasifikovani su na osnovu svog **izgleda**, odnosno fizičkih karakteristika (oblik, veličina, lokalizacija, koncentrisanost i distribucija) i na osnovu **mehanizma** koji je uzrokovao njihov nastanak. Klasifikacija je izvršena na **pasivne mrlje**, **prskane mrlje** i **izmenjene mrlje**. Dalje su ove grupe mrlja klasifikovane u zavisnosti od mehanizma koji bi ih mogao izazvati, tako da bi analitičar na kraju procesa evaluacije mrlja mogao da donese zaključak o mehanizmu kojim je određena mrlja nastala. (James SH et al., 2005)

Tabela 2. Klasifikacija krvnih mrlja (James SH et al., 2005)



Druga najpoznatija klasifikacija krvnih mrlja objavljena je u knjizi autora Tom Bevel i Ross Gardner pod nazivom *Bloodstain Pattern Analysis with an Introduction to Crime Scene Reconstruction*. Ova klasifikacija je donela jedan nov način sagledavanja krvnih mrlja, ali ima dosta manjkavosti u objašnjavanju nekih čestih bitnih pojava u BPA (Bevel T et Gardner RM, 2008). Međutim, uz klasifikaciju autori su formirali veoma vredan algoritam odlučivanja za potrebe praktičnog rada pri analizi vrste krvnih mrlja, koji predstavlja jednu novinu na ovom polju (Tabele 3 i 4).

Početno pitanje u algoritmu koje analitičar sebi postavlja je: „*Da li trag predstavlja krvnu mrlju?*“ Ukoliko je odgovor na ovo pitanje „*Da*“, koji se odgovor dobija preliminarnim i konfirmatornim hemijskim testovima za krv, odnosno kada se potvrdi da trag zaista potiče od krvi prelazi se na naredni korak u algoritmu. Naredno pitanje je: „*Da li su primarne krvne mrlje kružne/elipsaste?*“ Pri ovom koraku je jako važno razlikovati primarnu, odnosno glavnu krvnu mrlju od ponekad pridruženih sekundarnih prskanih mrlja. Neophodno je sagledavati samo primarni supstrat krvne mrlje jer on predstavlja srž odgovora na korak u algoritmu i od pravilnog odgovora u ovom ključnom koraku zavisi i pravilna dalja klasifikacija krvne mrlje u jednu od dve velike i suštinski različite grupe.

Pozitivan odgovor na ovo pitanje algoritma vodi u grupu *Prskanih mrlja*. U ovoj grupi raspored obrasca prskanja može imati dominantno linijski izgled i može predstavljati *Obrazac arterijskog prskanja*, *Obrazac odbacivanja* ili *Obrazac putanje kapanja*. Ukoliko *Prskane mrlje* u obrascu nemaju linijski raspored onda govorimo o grupi gde se nalaze *Obrazac udarca*, *Obrazac iskašljavanja* i *Kapanje krvi*, koje može biti pojedinačno i nasumično u grupi bez pravilnosti.

Negativan odgovor na prvo ključno pitanje vodi u grupu *Neprskanih mrlja*. Ukoliko su margine ovih mrlja pravilne onda predmetna mrlja može biti tipa *Slivanja*, *Lokve*, *Saturacije* ili *Transfera tipa slike u ogledalu*. Nepravilne margine krvne mrlje ukazuju dalje da ista može predstavljati *Obrazac kapanja*, *Obrazac prolivanja*, *Transfernu mrlju*, *Obrasac brisanja* i *Obrazac razmazivanja-probrisavanja*.

Detaljna pitanja i način prolaska analitičara kroz algoritam prilikom odlučivanja o klasifikaciji analiziranih krvnih mrlja bliže su prikazani na Tabelama 3 i 4 (Bevel T et Gardner RM, 2008, p. 66, 70).

Tabela 3. Algoritam odlučivanja u grupi prskanih primarnih krvnih mrlja

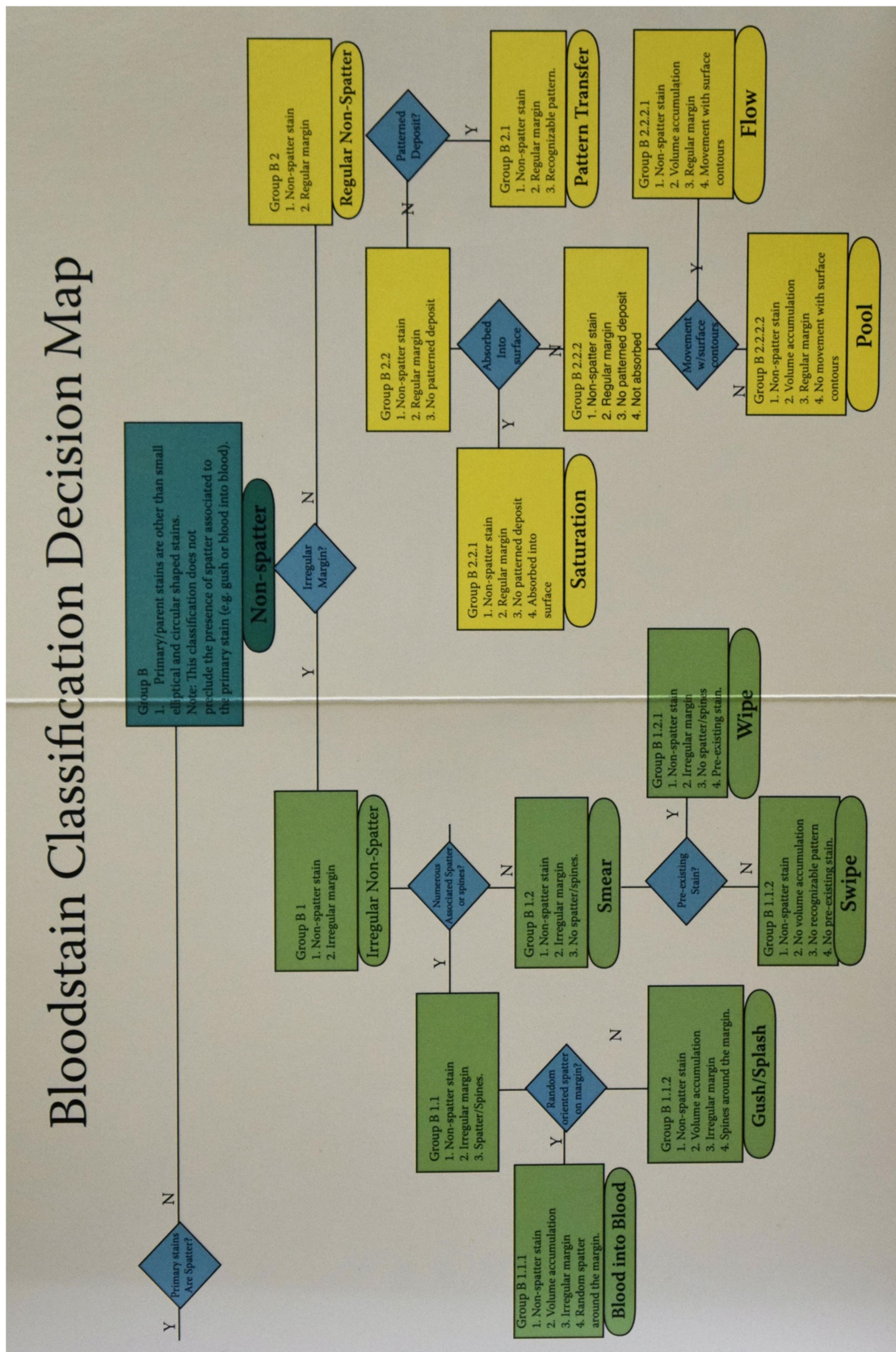
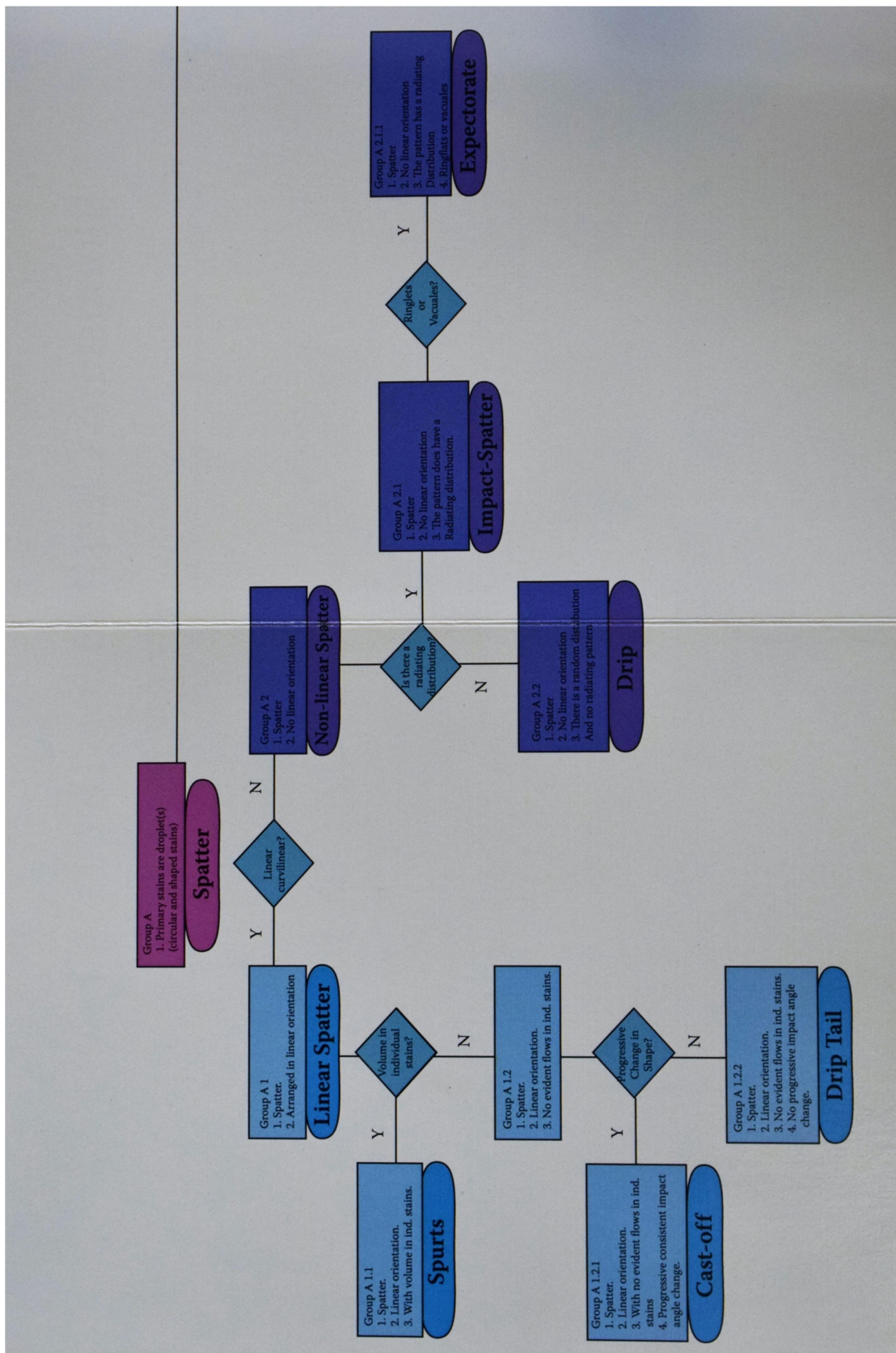


Tabela 4. Algoritam odlučivanja u grupi neprskanih primarnih krvnih mrlja



Praktična primena naučnog metoda u BPA

Analitičar BPA mora biti upoznat sa osnovama funkcionisanja naučne metodologije i sa načinima na koji se naučni metod može implementirati u realnim forenzičkim slučajevima. Praktično pojednostavljenje značaja naučne metodologije može se izraziti putem fraze koja se često sreće tokom školovanja analitičara BPA i specijalista sudske medicine, a to je da „*sve što se tvrdi u mišljenju mora biti potkrepljeno adekvatnim činjeničnim stanjem u nalazu*“. Neophodno je da svaki analitičar zna koja sve pitanja i kojim redosledom mora sebi i drugima postaviti da bi uspešno evaluirao predmet veštačenja. Postoje definisane smernice koje funkcionišu kao praktični vodič analitičarima (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Sistematičan pristup veštačenju – analizi tragova krvi odgleda se u sledećim koracima analitičara:

1. **Upoznavanje sa licem mesta** – Analitičar najpre mora da se upozna sa celokupnim prostorom u kome se kritični događaj odigrao i šta se sve u kom delu prostora nalazi. Takođe, sastavni deo prvog koraka je i upoznavanje sa podacima o okolnostima slučaja.
2. **Identifikacija obrazaca i traganje sa diskretnim obrascima** – Kriminalni akt je često veoma dinamičan i sastoji se od različitih faza događaja, tako da su krvne mrlje od veoma velikog značaja često prikrivene malom veličinom, lokacijom ili beznačajnim izgledom. U ovoj fazi analitičar mora odrediti granice krvnih mrlja i odrediti koje mrlje čine sastavne delove jednog obrasca.
3. **Klasifikacija obrazaca** – Klasifikacija je ključni korak u analizi obrazaca krvnih mrlja i samim činom klasifikacije opredeljujemo mehanizam njihovog nastanka. U pojedinim slučajevima nije moguće uraditi potpuno preciznu klasifikaciju svake mrlje, te je tada najbolje zadržati se na opštijim terminima iz klasifikacije i tako sprečiti mogućnost opredeljenja pogrešnog mehanizma nastanka krvne mrlje.
4. **Određivanje usmerenosti i pravca kretanja objekta pri nastanku obrasca** – U ovom koraku je potrebno odrediti usmerenost krvne mrlje, odnosno iz kog pravca je došlo do formiranja krvne mrlje, tj. iz kog pravca je doletela krv. Takođe, kod drugih tipova krvnih mrlja potrebno je utvrditi da li njihov izgled ukazuje na pravac i smer relativne kretanje između ciljane površine na kojoj je

krvna mrlja nađena i objekta koji je uzrokovao nastanak te mrlje. Krvne mrlje koje su najčešće predmet u ovom koraku su prskane mrlje, kapljične mrlje, transferi i slivanje.

5. **Određivanje područja konvergencije i područja porekla** – Primenom matematičkih trigonometrijskih proračuna analitičar treba da u obrascu prskanja, nastalom direktnim mehanizmom, odredi područje u kojem se seku prave provučene kroz dužu osovinu pojedinačnih prskanih mrlja, a koje predstavlja dvodimenzionalnu poziciju izvora krvi, kao i da odredi trodimenzionalnu poziciju mesta odakle je nastalo prskanje krvi.
6. **Određivanje odnosa i međuzavisnosti između obrazaca i drugih dokaza** – Nakon što su svi pojedinačni obrasci krvnih mrlja i same krvne mrlje sagledane i analizirane ponaosob, sada je neophodno da se sve mrlje sagledaju u jednom širem kontekstu. Sada je potrebno odrediti da li su i kako krvne mrlje međusobno povezane i da li postoji prostorna ili vremenska kauzalnost među njima.
7. **Evaluacija potencijalnih izvora nastanka analiziranih krvnih mrlja** – Analitičar u ovom koraku mora ponovo analizirati sve raspoložive podatke o okolnostima slučaja, kao i naročito podatke iz obdukcionog zapisnika i medicinske dokumentacije o povredama svih učesnika, ali i rezultate DNK analize i rezultate serološko-forenzičkog testiranja mrlja. Uporednom analizom sa utvrđenim krvnim mrljama i obrascima sada je potrebno odrediti koji su tragovi krvi mogli nastati iz kojih potencijalnih izvora krvi. Takođe, neophodno je sagledati i konkretne okolnosti, odnosno mikroklimatske i klimatske faktore, ali i druge potencijalne izvore nastanka izmenjenih krvnih mrlja u određenom smislu. Dakle, pitanje koje analitičar sebi treba da postavi u ovom koraku je: „Šta je uzrokovalo ove mrlje?“
8. **Definisanje potencijalnih scenarija** – Ovo je završni krunski korak u analizi. U zavisnosti od okolnosti konkretnog slučaja, analitičar je sada u mogućnosti da opredeli jedan ili više potencijalnih scenarija o tome kako se pojedine faze ili događaj u celini odigrao. Dakle, završni rezultat BPA je upravo rekonstrukcija dela ili celokupnog događanja tokom odigravanja krivičnog

dela. Nakon određivanja šta se sve dogodilo, jedan od ključnih zadataka analitičara je određivanje redosleda i vremenskih okvira odigravanja prethodno definisanih faza krivičnog dela.

Pasivne krvne mrlje

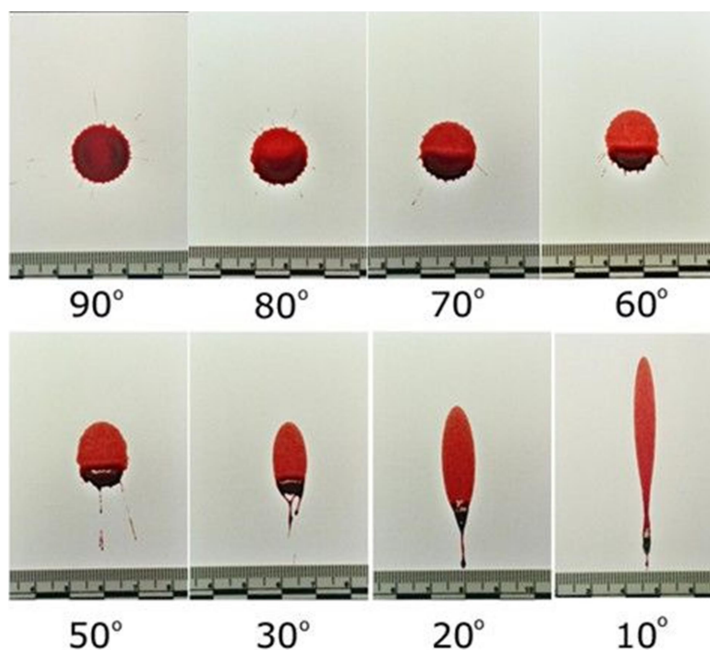
Pasivne krvne mrlje imaju fizičke karakteristike kojima ukazuju da su nastale bez znatnijeg spoljašnjeg delovanja neke sile, izuzev sile gravitacije i trenja, kao i pod uticajem karakteristika površine na koju se krvne mrlje formiraju. Predstavljaju veoma raznoliku grupu krvnih mrlja i obrazaca koji su gotovo uvek zastupljeni na mestu krvoprolića.

Kapi krvi na ravnoj površini

Kap krvi u slobodnom padu zadržava oblik sfere sve dok neka spoljašnja sila ne deluje na nju i ne naruši površinski napon kapi. U realnim slučajevima, krv može kapati iz rane, odeće natopljene krvlju, kose, povrednog sredstva i dr. Teorijski gledano, s obzirom na to da kap krvi pri slobodnom padu ima oblik sfere, to će krvna mrlja na horizontalnoj podlozi imati oblik kruga. Prečnik nastale krvne mrlje zavisi od brzine (rastojanja sa koga pada) i volumena kapi krvi i od karakteristika ciljne površine. Sa porastom brzine, odnosno rastojanja sa koga pada kap krvi dolazi do nastanka sve većih mrlja. Brzina kapi krvi u slobodnom padu je proporcionalna nastaloj mrlji, ali samo do određene vrednosti preko koje sa dodatnim povećanjem brzine ne dolazi do povećanja i prečnika nastale mrlje. Uzrok nastanka ove pojave je volumen kapi krvi (*ilustrativni primer: Kap farbe nije dovoljna da oboji celu prostoriju ma koliko velikom brzinom bila ispaljena ka zidu*). Ukoliko je ciljna površina čvrsta, glatka i neporozna (npr. staklo, porcelan, keramika, glatki karton, glatka plastika i dr.), površinski napon kapi krvi teže će biti narušen, te će se formirati pravilna kružna krvna mrlja čiji prečnik zavisi od razdaljine sa koje je kap krvi pala. Nasuprot tome, ukoliko je ciljna površina gruba, neravna i porozna (npr. beton, neobrađeni komad drveta, zemlja, tkanine i dr.), površinski napon kapi krvi biće lako narušen te će pri padu kap krvi uslovno rečeno „eksplozirati“. Nastala krvna mrlja imaće nepravilan oblik, neravne ivice, šiljke i satelitske prskane mrlje. Izgled mrlje zavisi od karakteristika ciljne površine, a minimalno od volumena i brzine kapi krvi u slobodnom padu. (Attingera D et al., 2013; Bevel T et Gardner RM, 2008; Breithaupt J, 2001; James SH et al., 2005; Pizzola PA et al., 1986)

Kapi krvi na kosoj površini

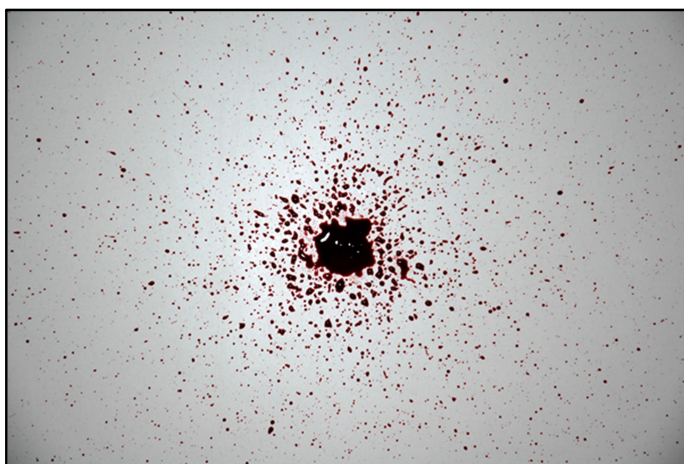
Kap krvi pri slobodnom padu često kontaktira ciljnu površinu pod određenim uglom, te je tada krvna mrlja ovalnog ili elipsastog oblika (Slika 1). Sa povećanjem ugla pod kojim kap krvi u slobodnom padu kontaktira ciljnu površinu krvna mrlja je izduženija. Distalni kraj nastale krvne mrlje može biti izdužen i sužen, šiljolik, sa tačkastom pridodatkom sitnom prskanom mrljom ili linijski sa pridodatkom prskanom tačkastom mrljom. Oblik krvne mrlje ukazuje na pravac iz koga je kap krvi došla, te se na osnovu odnosa širine i dužine kapi krvi može odrediti ugao pod kojim je kap krvi kontaktirala ciljnu površinu. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005; Pizzola PA et al., 1986)



Slika 1. Kapi krvi na površini pod različitim uglom (James SH et al., 2005, p. 74-76)

Obrazac kapanja

Obrazac kapanja nastaje kada kapi krvi slobodno padaju sa objekta na kome se nalazi tečna krv na horizontalnu površinu, pri čemu kapi krvi padaju u prethodno nakupljene kapi krvi ili lokvu na ciljnoj površini (Slika 2). Ovaj obrazac je veliki i nepravilne veličine sa sitnim kružnim ili ovalnim satelitskim sekundarnim prskanim mrljama oko velike centralne mrlje. Ukoliko krv kaplje u krv sa visine manje od 30 cm na glatku, čvrstu i neporoznu površinu neće nastati navedeni obrazac kapanja. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 2. Obrazac kapanja (<https://hemospat.com>, nd)

Obrazac putanje kapanja

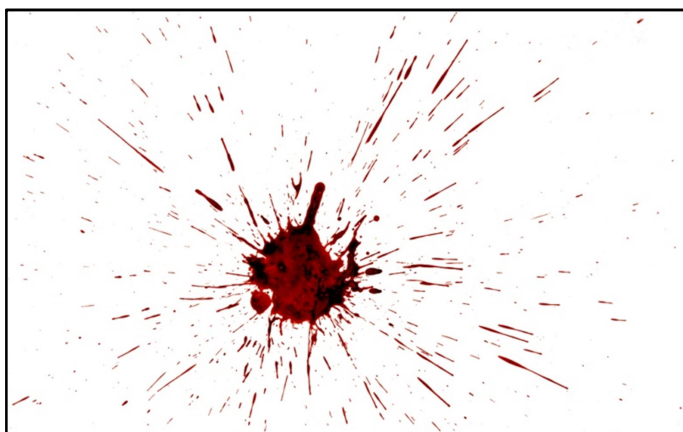
Obrazac putanje kapanja nastaje kada kapi krvi slobodno padaju sa okrvavljenog objekta koji se pomera u bočnom pravcu (Slika 3). Primer za ovakav obrazac je povređena osoba koja aktivno krvari i koja se kreće. Pojedinačne krvne mrlje ponekad mogu pokazivati usmerenost, pod uslovom da se objekat na kome se nalazi tečna krv kreće dovoljno brzo, te se može odrediti pravac kretanja osobe koja je uzrokovala nastanak obrasca. Ukoliko izvor nastanka ovog obrasca nije povređena osoba, odnosno izvor aktivno ne krvari, to će obrazac imati određenu dužinu i završiće se na određenom rastojanju od mesta krvoprolića. Primer za ovakve skraćene obrasce putanje kapanja je beg napadača sa okrvavljenim povrednim sredstvom dalje od mesta krvoprolića. Kada je izvor nastanka ovog obrasca osoba kod koje postoji aktivno krvarenje, onda ovi obrasci ponekad mogu biti izuzetno dugi i najduži izmereni obrazac u praksi je dug čak 2 km. (James SH et al., 2005)



Slika 3. Obrazac putanje kapanja (<https://aboutforensics.co.uk>, nd)

Obrazac prolivanja

Obrazac prolivanja nastaje kada krv u količini većoj od 1 ml bude izložena delovanju minimalne sile. Primer za ovakav obrazac je gaženje krvi na podu ili slobodan pad krvi sa visine od najmanje 10 cm pod uticajem sile gravitacije (Slika 4). Ovaj obrazac se karakteriše većom centralnom mrljom i dugim uzanim prskanim mrljama. Prskane mrlje izlaze iz centralne mrlje pod uglom manjim od 40° . Takođe, ove prskane mrlje pokazuju obrnutu usmerenost, odnosno usmerenost prskanih mrlja koja pokazuje suprotan pravac od mesta pada krvi na podlogu ili mesta gaženja krvi. Obrnuta usmerenost je uzokovana veoma oštrim uglom pod kojim se kapi krvi odvajaju od centralne mrlje i velikom incidencom sudara pojedinačnih kapi krvi odvojenih od centralnog izvora. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 4. Obrazac prolivanja (Bevel T et Gardner RM, 2008)

Obrazac slivanja

Obrazac slivanja je nakupina krvi sa relativno pravilnim konturama koja se pomera po čvrstoj površini pod uticajem gravitacije i kontura podloge. Izmene obrazaca slivanja su česte u realnim slučajevima i uglavnom su uzrokovane promenom položaja osobe ili objekta na kome se nalazi tečna krv. Obrasci slivanja imaju veliki praktični značaj u identifikaciji naknadne fingirane promene položaja leša, kao i u utvrđivanju položaja i aktivnosti žrtve tokom odigravanja kritičnog događaja. Takođe, hemijske karakteristike podloge po kojoj se krv sliva mogu uticati na definitivni izgled obrazaca slivanja, u smislu izgleda i neprirodnih promena pravca ovakvih obrazaca. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 5. Obrazac slivanja (<http://aboutforensics.co.uk>, nd)

Lokva

Lokva je nakupina krvi na podlozi, čiji je oblik određen konturama same podloge (Slika 6). Ovaj obrazac je uglavnom povezan sa obilnim krvarenjem žrtve u približno nepromenjenom položaju povređene osobe. Takođe, ovaj obrazac je često povezan sa obrascima slivanja, kao i sa naknadnom izmenjenošću same lokve u smislu koagulacije krvi i separacije seruma, te i sa eventualnim sasušivanjem krvi. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 6. Lokva (<http://www.sharan-camera.com>, nd)

Natapanje

Natapanje je obrazac krvne mrlje koji podrazumeva apsorpciju krvi od strane podloge na kojoj se krv nakupila (Slika 7). Ovaj obrazac je takođe povezan uglavnom sa obilnim krvarenjem žrtve. U praksi ovakve mrlje se često sreću na odeći, tepisima, dušecima i krevetima. Obrasci natapanja sem identifikacije predmeta koji je bio u bliskom kontaktu sa tečnom krvlju, retko imaju neku značajniju primenu u praksi. Ovi obrasci više imaju ulogu u prikrivanju drugih obrazaca, nego što sami imaju neki praktični značaj. Obrasci su često povezani sa izmenjenim krvnim mrljama po tipu koagulacije krvi i difuzije krvi kroz tkaninu ciljnog objekta, odnosno objekta na kome je krvna mrlja nađena. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 7. Natapanje (<https://4.files.edl.io>, nd)

Transfer

Krvne mrlje po tipu transfera nastaju kontaktom predmeta okrvavljenih tečnom krvlju sa ciljnim objektima, odnosno objektima na kojima je krvna mrlja nađena. Termin transfer se koristi i da označi fizičku izmenjenost originalne krvne mrlje kontaktom ili provlačenjem neokrvavljenog objekta kroz tečnu krv, koja suštinski spada u izmenjene krvne mrlje (SWGSTAIN Terminology). Suština krvnih mrlja po tipu transfera je kontakt dve površine od kojih je bar jedna okrvavljena tečnom krvlju.

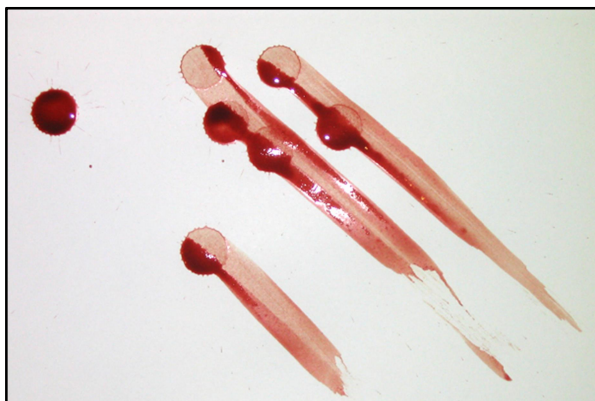
Razmaz krvi (eng. smear) je termin koji se često koristi da označi neodređen i nekarakterističan transfer krvi sa okrvavljenog objekta na ciljni objekt na kome je krvna mrlja nađena. Nađena krvna mrlja ne ukazuje na karakteristike objekta koji je uzrokovao nastanak

mrnje. **Obrazac brisanja** (eng. swipe pattern) spada u grupu transfera i poseduje specifične karakteristike na osnovu kojih se može odrediti pravac kretanja okrvavljenog predmeta u odnosu na ciljni objekat na kojem je krvna mrlja nađena (Slika 8). Često se kod ovakvih obrazaca može utvrditi i priroda okrvavljenog objekta, naročito kada se radi o kosi ili određenoj tkanini. Određivanje pravca kretanja okrvavljenog objekta se određuje na osnovu pet karakteristika (nepravilna demarkacija na strani početnog kontakta, omeđenost, ispruganost, bleđenje i izbijanje u mlazu). (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 8. Obrazac brisanja (<https://hemospat.com>, nd)

Obrazac razmazivanja (eng. wipe pattern) se karakteriše provlačenjem neokrvavljenog objekta kroz prethodno postojeću tečnu krv na ciljnoj površini na kojoj je krvna mrlja nađena (Slika 9). Kod obrazaca brisanja i razmazivanja pažljivom analizom moguće je odrediti prirodu objekta koji je učestvovao u nastajanju nađenih obrazaca, a u praksi su to često prsti, šaka, tkanina, kosa i dr. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 9. Obrazac razmazivanja (<https://hemospat.com>, nd)

Obrazac vučenja (eng. drag pattern) je podvrsta obrasca probrisavanja i nastaje kada lokva krvi bude izmenjena ili izvor krvarenja bude pomeran vučenjem žrtve ili drugim objektom po podlozi (Slika 10). Takođe, u ovom obrascu je uglavnom moguće opredeliti pravac delovanja sile, odnosno usmerenost obrasca, te time opredeliti pravac u kome je npr. žrtva vučena po podu. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 10. Obrazac vučenja

Ponekad u praksi prilikom nastajanja krvnih mrlja po tipu transfera može doći do oslikavanja kontura objekta koji je bio okrvavljen tečnom krvlju (Slika 11), te se takvi obrasci nazivaju **obraci slike u ogledalu** (eng. mirror image). Ovi obrasci mogu biti povezani sa obrascima brisanja i razmazivanja i sa klasičnim transferima, kada se raspoznaju konture objekta koji je učestvovao u nastanku ovih obrazaca (najčešće: šaka, stopalo, prst, obuća, specifična tkanina, povredno sredstvo i dr.). (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 11. Obrazac slike u ogledalu (<http://bloodspatter.com>, nd)

Navedene krvne mrlje i obrasci iz grupe transfera posebnu veliku primenu imaju prilikom identifikovanja vozila i vozača koji su pobjegli sa lica mesta saobraćajne nezgode, te

tada treba posebno pažljivo pregledati volan, menjač, papučice gasa, kvačila i kočnice, patosnice, ručice vrata i centralne konzole, gde se inače često nalaze tragovi koji jasno ukazuju da su predmetno vozilo i vozač bili na mestu saobraćajne nezgode. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Prskane krvne mrlje

Prskane krvne mrlje pokazuju specifičnu usmerenost, različitu veličinu i povezane su sa delovanjem spoljašnje sile na izvor tečne krvi, uz delovanje gravitacije i trenja. Pojedinačne razasute krvne mrlje pokazuju karakterističnu usmerenost koja je upravljena prema lokaciji izvora odakle je krv rasprskana, odnosno prema mestu delovanja sile na objekat okrvavljen tečnom krvlju. Prskane krvne mrlje mogu nastati različitim mehanizmima i gotovo redovno se sreću na licu mesta izvršenja krivičnog dela. Minimum uslova za nastanak prskanih mrlja je postojanje tečne krvi i delovanje spoljašnje sile koja je dovoljno velikog intenziteta da prevaziđe fizičke sile privlačenja koje postoje u samoj krvi. Nakon delovanja odgovarajuće sile dolazi do prenosa kinetičke energije povrednog sredstva na krv, te dolazi do razbijanja tečne krvi u sitne kapljice. Ove sitne kapljice se kreću u različitim pravcima dalje od mesta delovanja sile, različite su veličine i sferičnog su oblika. S obzirom na to da gravitacija i otpor vazduha konstantno deluju na ove sitne kapljice krvi tokom njihovog leta, to je putanja njihovog kretanja manje ili više parabolična, a ne linijska. Nakon kontakta ovih sitnih kapljica krvi sa ciljnom površinom, projekcija sferičnih kapljica će biti kružna, ovalna ili elipsasta u zavisnosti od upadnog ugla, te se sada takve mrlje nazivaju **prskanim mrljama**. Prskane krvne mrlje pored specifične usmerenosti često pokazuju i vidljive razlike u veličini i specifičnoj distribuciji, koja govori o različitim mehanizmima njihovog nastanka. Veličina prskanih krvnih mrlja je zavisna od volumena sitnih kapljica krvi koje su putovale kroz vazduh, ali i od početnog ukupnog volumena tečne krvi i od specifičnosti dejstvujuće sile. Veći intenzitet sile koji deluje na tečnu krv uzrokuje da se krv razbije u sitnije kapljice, dok će sa druge strane manja sila uzrokovati nastanak uglavnom većih kapljica krvi. Veće kapljice krvi, pošto imaju povoljan odnos njihove mase i površine, putovaće dalje i duže, za razliku od malih kapljica koje putuju kraće zbog intenzivnijeg delovanja otpora vazduha. (Attingera D et al., 2013; Bevel T et Gardner RM, 2008; Breithaupt J, 2001; James SH et al., 2005; Pizzola PA et al., 1986)

Fizičke karakteristike obrazaca prskanja

Kada se na licu mesta identifikuju krvne mrlje neophodno je najpre opisati njihovu veličinu, oblik i distribuciju. Takođe, neophodno je razmotriti i karakteristike ciljne površine gde se krvne mrlje nalaze, kao i koncentraciju i raspored. Pošto u obrascima prskanja koji nastaju različitim mehanizmima postoje prskane mrlje različite veličine (male, srednje i

velike), to se preporučuje da se u praktičnom radu ne donose zaključci o mehanizmu nastanka određenog obrasca prskanja samo na osnovu veličine pojedinačnih prskanih mrlja. Uvek su neophodne dodatne informacije da bi analitičar mogao da opredeli specifični mehanizam nastanka određenog obrasca prskanja. Da bi odredio mehanizam nastanka obrasca prskanja, analitičar najpre mora na licu mesta da identifikuje obrazac, odnosno da utvrdi koje sve prskane mrlje pripadaju određenom obrascu. Često na licu mesta postoji više obrazaca prskanja, koji mogu biti čak i naslagani jedan preko drugog, odnosno da se preklapaju, te je tada i indentifikacija svakog obrasca ponaosob prilično komplikovana. Utvrđivanje koja prskana mrlja pripada svakom pojedinačnom obrascu se vrši na osnovu usmerenosti svake prskane mrlje ponaosob, jer posebni obrasci prskanja imaju specifičnu usmerenost pojedinačnih prskanih mrlja (npr. obrazac udarca, obrazac odbacivanja, obrazac zaustavnog odbacivanja, obrazac iskašljavanja i dr.). (Bevel T et Gardner RM, 2008; Breithaupt J, 2001; James SH et al., 2005)

Oblik pojedinačnih prskanih mrlja u obrascu prskanja zavisi od: putanje leta pojedinačnih kapljica krvi neposredno pre kontakta sa ciljnom površinom, tehničkih karakteristika ciljne površine (glatka-neravna, apsorbujuća-neapsorbujuća, čvrsta-mekana) i oblika ciljne površine koji određuje upadni ugao pojedinačnih kapljica krvi. Na osnovu oblika i izgleda pojedinačnih prskanih mrlja u obrascu prskanja može se odrediti trodimenzionalni deo prostora u kome je sila delovala na tečnu krv koja je bila izvor nastanka obrasca prskanja. Ovo ima izuzetno veliki forenzički značaj u svakodnevnom radu analitičara. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Mehanizmi nastanka obrazaca prskanja

Mehanizmi nastanka obrazaca prskanja su podeljeni u tri grupe:

1. Sekundarni mehanizam
2. Mehanizam udara
3. Mehanizam istiskivanja

Obrazac prskanja nastao sekundarnim mehanizmom se dovodi u vezu kada kapljice krvi padaju na ciljnu površinu ili u krv koja se već nalazi na ciljnoj površini, uz neophodno prevazilaženje površinskog napona krv intenzitetom sile tj. kinetičkom energijom krvi koja pada. Obrazac prskanja nastao mehanizmom udara nastaje kada objekat direktno deluje,

odnosno udara u izvor tečne krvi. Obrazac prskanja može nastati i mehanizmom istiskivanja kada dolazi do narušavanja fizičkih karakteristika krvi bez direktnog delovanja sile, odnosno bez udarca određenog objekta po izvoru tečne krvi.

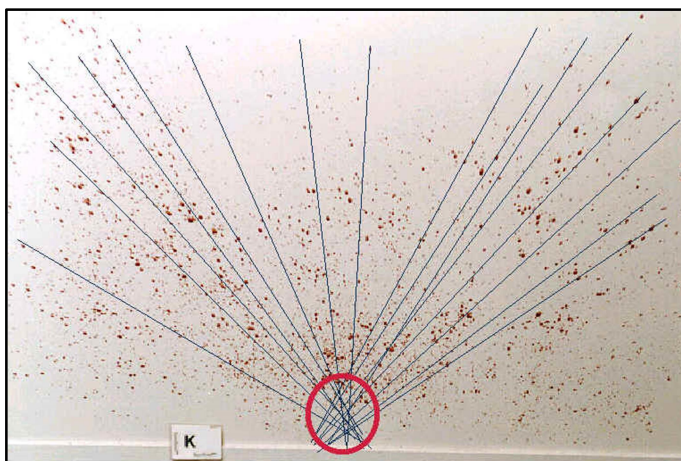
1. Sekundarni mehanizam

Sekundarni mehanizam nastanka obrasca prskanja se još naziva i „sekundarni udar“, a postoji kada kapljice krvi u padu „udaraju“ u ciljnu površinu ili u tečnu krv prethodno nakupljenu na ciljnoj površini. Postoji specifična distribucija prskanih mrlja oko periferije glavne mrlje i te prskane mrlje se nazivaju satelitske ili sekundarne prskane mrlje. Oblik, veličina, distribucija, količina i lokacija satelitskih prskanih mrlja je zavisna od načina nastanka ovog obrasca. Satelitske prskane mrlje nastaju tako što se sitne kapljice krvi odvajaju od glavne mrlje i putuju zatim po jasno naglašenoj paraboličnoj putanji. Ukoliko ove sekundarne kapljice krvi na kraju svoje putanje kretanja kontaktiraju horizontalnu ili vertikalnu površinu, nastaju posebni karakteristični obrasci. Na horizontalnoj površini pojedinačne prskane mrlju su kružne ili ovalne, uglavnom promera 1-4 mm. Ove obrasce je relativno jednostavno identifikovati kada je glavna mrlja prisutna u vreme vršenja BPA od strane analitičara. Međutim, ponekad okolnosti odigravanja krivičnog dela dovode do situacije da glavna mrlja iz različitih razloga bude uklonjena ili se nalazi na nekom udaljenom mestu, te je tada znatno otežana interpretacija ovakvih obrazaca i pouzdano opredeljenje mehanizma njihovog nastanka. Naročito je teško utvrditi tačan mehanizam nastanka prskanih mrlja na obući i završnim delovima nogavica napadača, naročito onda kada osumnjičeni ne poriče da se nalazio na licu mesta i da je bio u neposrednoj blizini žrtve (npr. ukazivanje pomoći, navodna samoodbrana i dr.). Razlike između sekundarnog mehanizma i mehanizma udarca su veoma suštinske i značajne za razvoj sudskog procesa. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

2. Mehanizam udara

Kada određeni obrazac krvnih mrlja bude definisan kao obrazac prskanja, na osnovu veličine, oblika i distribucije mrlja, uglavnom je dalje moguće klasifikovati obrazac kao obrazac udarca. Da bi tačan način nastanka određenog obrasca prskanja mogao biti utvrđen, neophodna je uporedna analiza karakteristika samog obrasca, priroda povreda žrtve i

specifičnih okolnosti samog slučaja. U slučajevima tuča kada žrtva zadobija povrede delovanjem tupine povrednog sredstva (npr. udarci pesnicama, šutiranjem, udarci palicama, metalnim boksom i sl.) prvi udarci po pravilu ne dovode do nastanka obrazaca prskanja. Ovo iz razloga što je neophodno da najpre nastane neka od povreda iz kojih će aktivno curiti krv, te tek kada povredno sredstvo ponovo deluje po ekspanziranoj tečnoj krvi može doći do nastanka obrazaca prskanja. Prema tome, analizom ovakvih slučajeva može se utvrditi da je minimalni broj udaraca napadača za jedan veći od broja nađenih obrazaca prskanja na licu mesta. Na osnovu fizičkih karakteristika obrazaca prskanja moguće je utvrditi trodimenzionalni deo prostora u kome se žrtva nalazila u trenutku zadobijanja udarca, odnosno delovanja sile na okrvavljeni deo tela žrtve (Slika 12). Na izgled obrasca prskanja utiču sledeći faktori: fizičke karakteristike povrednog oruđa (oblik, težina, veličina, površina i dr.), broj udaraca, intenzitet dejstvujuće sile, pravac dejstvujuće sile, lokalizacija rana, pokreti žrtve i napadača tokom povređivanja i količina krvi ekspanzirane dejstvujućoj sili. (Slemko J, nd; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

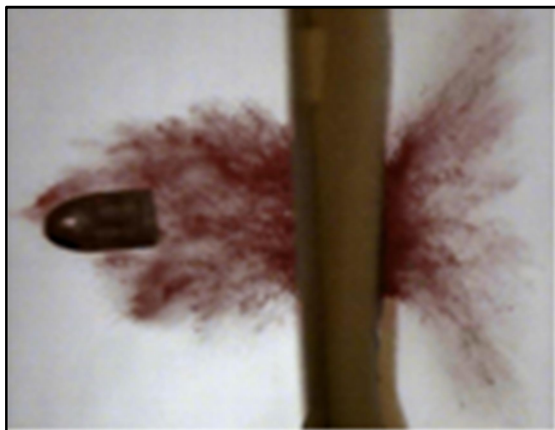


Slika 12. Obrazac prskanja nastao mehanizmom udara sa prikazom područja konvergencije (Slemko J, nd)

Na napadaču se često može naći prskana krv žrtve, ali to ne mora biti i pravilo. Količina i distribucija prskanih mrlja koje se nađu na odeći i telu napadača zavisna je od relativnog međusobnog položaja napadača i žrtve, pravca dejstvujućeg povrednog sredstva, broja i mesta udaraca nanetih žrtvi i prirode zadobijenih povreda (Laan N et al., 2015). Prskane mrlje na napadaču često mogu biti teško vidljive golim okom, ali identifikacija ovih mrlja može biti ključna za rešavanje forenzičkih slučajeva. Stoga se preporučuje redovni pregled odeće potencijalnog napadača uvek kada ima tragova krvi na mestu izvršenja krivičnog dela ili kada ima otvorenih povreda na žrtvi u smislu postojanja aktivnog krvarenja

(Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Kada se prskane mrlje traže na tamnoj odeći preporučuje se upotreba stereomikroskopa i infracrvene kamere u cilju lakšeg nalaženja, identifikacije i bolje vizuelizacije samih mrlja i njihovog zbirnog rasporeda, kao i upotreba pojačavajućih hemijskih sredstava za vizuelizaciju krvnih mrlja (Tobe SS et al., 2007; Vennemann M et al., 2014).

Specifični obrasci prskanja nastali mehanizmom udara su obrasci koji nastaju kod povreda nanetih vatrenim oružjem (Slika 13). Od mesta ulazne rane ka oružju, odnosno suprotno od smera kretanja projektila, dolazi do nastanka obrasca prskanja koji se naziva **obrazac povratnog prskanja**. Ovaj obrazac ima veliku praktičnu primenu u identifikaciji povrednog oružja i određivanju rastojanja usta cevi od mesta ulazne rane, kao i značajnu ulogu u identifikaciji napadača. Prilikom povređivanja glave u oko trećini samoubilačkih slučajeva se nalaze prskane mrlje u smislu povratnog obrasca prskanja na šaci/šakama, dok je nalaz ovakvog obrasca nekarakterističan za slučajeve ubistava (Comiskey PM et al, 2017; Betz et al, 1995). Od mesta izlazne rane u smeru kretanja projektila takođe dolazi do prskanja krvi koja uzrokuje nastanka **obrasca prskanja prema napred**. Ovaj obrazac ima veliku praktičnu primenu za određivanje trodimenzionalnog položaja žrtve u prostoru u trenutku zadobijanja strelne rane. Takođe, ovaj obrazac se koristi i za utvrđivanje specifične situacije prolaska jednog projektila kroz dva različita dela žrtve, kao što su npr. šaka i potom grudni koš (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Oba navedena obrasca imaju specifičan konični pravac pružanja od mesta ulazne, odnosno izlazne rane. Izgled ovih obrazaca u značajnoj meri zavisi od kalibra i brzine ispaljenog projektila, rastojanja usta cevi vatrenog oružja od mesta ulazne rane, broja i karakteristika strelnih rana, pozicije žrtve, kao i blokirajućeg efekta kose, kape, odeće i drugih akcesoara na telu.



Slika 13. Prskanje krvi kod strelnih rana (Comiskey PM et al, 2017)

Veličina pojedinačnih prskanih mrlja kod obrazaca uzrokovanih strelnim ranama može biti ponekada izuzetna mala, reda veličine manje od 0,1 mm, mada uvek u obrascima postoje prskane mrlje različitih veličina. Kada ove naročito sitne mrlje dominiraju obrascem prskanja, takav obrazac se naziva **obrazac raspršivanja** (Slika 14). Ovakvi obrasci se uglavnom sreću u sklopu strelnih rana, ali nisu specifični za njih. U obrascu raspršivanja dominiraju izuzetno male kapljice krvi koje, zbog nepovoljnog odnosa mase i površine samih kapljica, imaju relativno kratak domet i to najčešće do oko 50-ak cm, za razliku od većih kapljica krvi koje imaju svakako veći domet. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

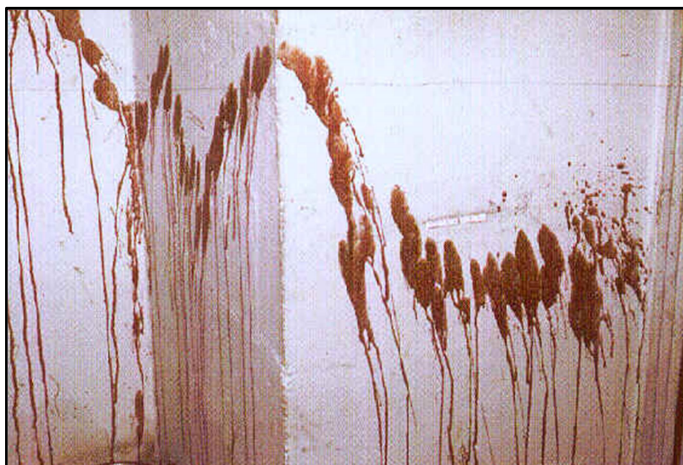


Slika 14. Obrazac raspršivanja (James SH et al., 2005, p. 134)

3. Mehanizam istiskivanja

Mehanizam istiskivanja podrazumeva raznoliku grupu obrazaca krvnih mrlja po tipu prskanja, koji nastaju delovanjem sile ali bez direktnog delovanja na samu krv, odnosno bez direktnog udara. U praksi, često se sreću slučajevi kada obrasci prolivanja (grupa pasivnih mrlja) i obrasci prskanja nastali mehanizmom istiskivanja (grupa prskanih, aktivno nastalih mrlja) imaju veoma velike sličnosti u izgledu, naročito u situaciji kada su izvor krvi i ciljna površina blizu jedna druge, odnosno nalaze se na malom međusobnom rastojanju. Postoje tri glavna načina nastanka obrazaca prskanja mehanizmom istiskivanja i to: arterijsko i vensko krvarenje, iskašljavanje krvi i odbacivanje krvi sa zamahnutog okrvavljenog predmeta. (Bandyopadhyay SK et Chowdhury GR, 2017; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Arterijski obrasci krvnih mrlja nastaju mehanizmom istiskivanja krvi pod pritiskom iz povređenog arterijskog krvnog suda (Slika 15). Ovi obrasci u praksi uglavnom pokazuju određene specifičnosti u izgledu, na osnovu kojih se mogu razlikovati od drugih obrazaca prskanja. Često se sreće svetlije crvena boja krvnih mrlja, bleđa polja po obodu krvnih mrlja, šiljolike mrlje u okolini glavnih, oscilatorne karakteristike obrazaca uzrokovane varijacijama arterijskog krvnog pritiska (parabolične ili cik-cak linije). U obrascu prskanja se nalaze pojedinačne mrlje različite veličine, ali se često sreću i mrlje veće od 1 cm. Ponekad kod ovih obrazaca prskanja može postojati centralna mrlja kružnog, izduženog ili nepravilnog oblika i često je povezana sa obrascima slivanja. Opredeljenje ovakvog obrasca na licu mesta mora biti povezano sa dijagnozom povrede arterijskog krvnog suda u obdukcionom zapisniku ili medicinskoj dokumentaciji. **Venski obrasci krvnih mrlja** uzrokovani su oboljenjima vena (sindrom insuficijencije površnih vena nogu povezan sa rupturom varikoziteta), kao i sa ezofagealnim varikozama i hemoroidima. Njihov značaj je u tome što mogu ličiti na arterijske obrasce i time otežati analizu određenog slučaja. Pošto su povezani sa oboljenjima, a ne sa povredama vena, nemaju veći praktični forenzički značaj. (Bandyopadhyay SK et Chowdhury GR, 2017; Barrett K et al., 2015; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 15. Obrazac arterijskog prskanja (Bandyopadhyay SK et Chowdhury GR, 2017)

Obrasci iskašljavanja krvi (Slika 16) nastaju mehanizmom istiskivanja krvi pod pritiskom vazduha iz prirodnih otvora disajnih puteva ili rana povezanih sa respiratornim traktom. Veličina i oblik pojedinačnih prskanih mrlja veoma varira u ovim obrascima koji jako mogu ličiti na obrasce prskanja nastale drugim mehanizmima. Brzina kretanja kapljica krvi prilikom iskašljavanja krvi može biti veoma velika (reda veličine 1.5-29 m/s), te može doći i do formiranja obrasca raspršivanja koji se uglavnom vezuje za strelne rane (Attingera

D et al., 2013). U praksi se obrasci iskašljavanja preklapaju sa obrascima prskanja uzrokovanim drugim mehanizmima (udarci čvrstim predmetom, strelne rane, ubadanja i dr.). Opređenje ovakvog obrasca na licu mesta izvršenja krivičnog dela mora biti povezano sa odgovarajućim povredama koje prati prisustvo krvi u nosu, ustima, disajnim putevima i/ili prisustvu rana čiji je prostor u kontinuitetu sa respiratornim traktom, a što mora biti evidentirano u obdukcionom zapisniku ili medicinskoj dokumentaciji. Karakteristika obrazaca iskašljavanja krvi je prisustvo mehurića vazduha ili prstena (konture) mehurića u pojedinačnim prskanim mrljama u obrascu, kao i prisustvo mukusnih pruga i izmenjenost krvi po tipu razblaživanja mrlja pljuvačkom, uz visoku koncentraciju amilaze u krvnim mrljama, ili drugim sekretom žlezda respiratornog trakta. Obrasci iskašljavanja krvi mogu nastati i u sklopu različitih rana trbuha praćenih povredom zida creva, kao i prilikom lekarske intervencije prema žrtvi i naročito u sklopu primene mera reanimacije. Naime, u takvim slučajevima tečna krv nakupljena u prostoru rane na trbuhu može biti pomešana sa gasovima iz šupljine povređenog creva, te tokom disajnih pokreta žrtve ili primenom mera reanimacije takva krv može biti istisnuta pod pritiskom iz same rane i uzrokovati nastanak obrasca iskašljavanja. Zbog toga je izuzetno važno obrasce iskašljavanja interpretirati isključivo u sklopu okolnosti konkretnog slučaja i telesnih povreda koje je žrtva zadobila kritičnom prilikom. (Breithaupt J, 2001; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 16. Obrazac iskašljavanja (<https://hemospat.com>, nd)

Obrasci odbacivanja (Slika 17) nastaju prilikom lučnog zamahivanja okrvavljenim predmetom (šaka, povredno oruđe i dr.) i odvajanjem tečne krvi delovanjem centrifugalne sile. Ovi obrasci se često sreću kod tuča i ubistava gde su povrede nastale višekratnim delovanjem tupine povrednog oruđa. Veličina pojedinačnih prskanih mrlja može znatno

varirati u ovim obrascima, ali su najčešće veličine 4-8 mm. Jači zamah okrvavljenim predmetom uzrokuje manje kapljice i obrnuto, sporiji zamah uzrokuje nastanak većih kapljica. Karakteristika ovih obrazaca je raspored pojedinačnih prskanih mrlja tako da obrazac izgleda kao uska ili nešto šira pruga (npr. čekić, drvena palica i sl.) ili su linijskog izgleda (npr. nož), koja je i blago zakrivljena. U praksi ovi obrasci se najčešće sreću na plafonu, zidovima i na leđima napadača. Ponekad je moguće odrediti pravac zamahivanja okrvavljenim predmetom. Na početku obrasca odbacivanja nalaze se veće kapljice i to je uzrokovano manjom početnom brzinom predmeta koji ubrzava i većom količinom krvi na samom predmetu. (Breithaupt J, 2001; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 17. Obrazac odbacivanja (Halverson M, 2012)

Poseban specifični oblik obrasca odbacivanja je **obrazac zaustavnog odbacivanja** (Slika 18) koji nastaje naglim zaustavljanjem okrvavljenog predmeta u pokretu i odvajanjem tečne krvi od predmeta delovanjem inercije. Obrasci odbacivanja i zaustavnog odbacivanja pružaju veoma vredne informacije o međusobnom položaju žrtve i napadača tokom povređivanja, kao i broju zamaha te samim tim posredno i eventualnom broju udaraca. Ponekad karakteristike obrasca odbacivanja mogu ukazivati na stranu tela napadača iz koje je zamahnut okrvavljeni predmet, te posredno ukazivati na ruku napadača u kojoj je bilo povredno sredstvo. Ovakve analize se rade sa posebnom pažnjom, a rezultati ne moraju biti potpuno pouzdani (primer: držanje povrednog oruđa sa dve ruke i zamahivanje povrednim oruđem preko suprotnog ramena u odnosu na ruku kojom se drži povredno oruđe). (Breithaupt J, 2001; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 18. Obrazac zaustavnog odbacivanja (Halverson M, 2012)

Izmenjenje krvne mrlje

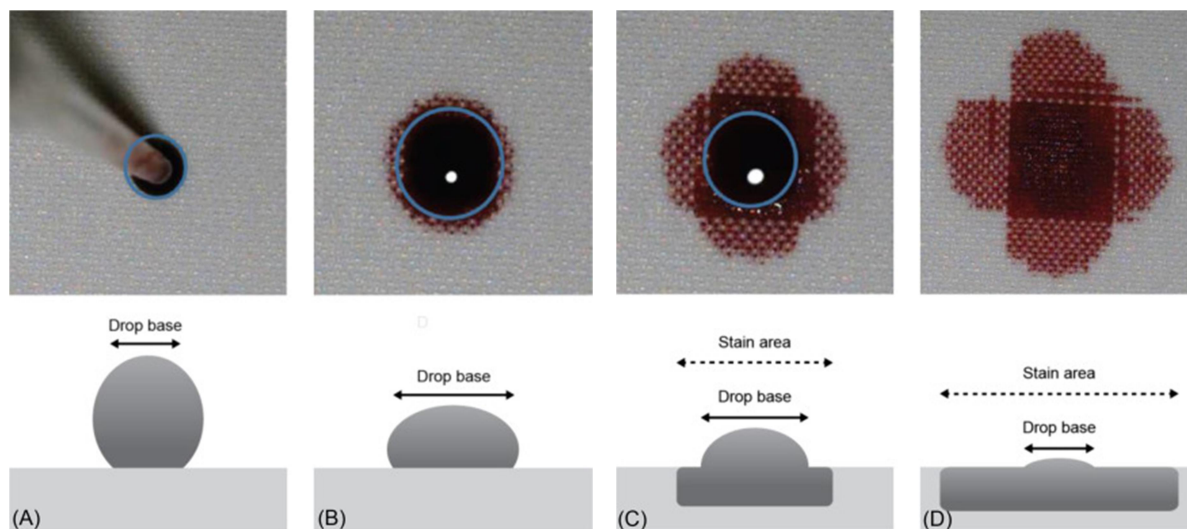
U taksonomiji krvnih mrlja posebno mesto zauzimaju izmenjene krvne mrlje (eng. altered bloodstains). Izmenjene krvne mrlje imaju izgled koji ukazuje da je krv i/ili obrazac prošao kroz određenu fizičku i/ili fiziološku promenu. Nastaju delovanjem sekundarnih faktora na već prethodno primarno formiranu krvnu mrlju, čime je njihova originalna morfologija promenjena u određenom smislu (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Dakle, svaka originalna krvna mrlja može biti promenjena u određenom smislu deovanjem sekundarnih faktora. Ovi sekundarni faktori mogu biti antropogenog i prirodnog porekla. Antropogeni mehanizam sekundarne promene krvne mrlje najčešće podrazumeva pokušaj prikriivanja tragova od strane izvršioca krivičnog dela (izazivanje požara, spaljivanje, pranje, brisanje, primena izbeljivača i sl.), ali i delovanjem policije, medicinskih radnika i drugih lica na mestu izvršenja krivičnog dela. U antropogene faktore se ubrajaju i sami unutrašnji faktori koji potiču od žrtve kao što su: koagulacija krvi, razblaživanje krvi telesnim tečnostima kao što su mokraća i cerebrospinalna tečnost. Izmena krvnih mrlja sekundarnim delovanjem prirodnih faktora nastaje pri kiši, snegu, visokoj vlažnosti, toploti, temperaturama nižim od 0°C, premeštanjem krvi delovanjem gravitacije, degradacijom zbog protoka vremena. Takođe, u prirodne faktore koji mogu uticati na primenu originalne prirode krvnih mrlja spada i dejstvo insekata i životinja.

U svakodnevnom radu analitičari obrazaca krvnih mrlja redovno se sreću sa izmenjenim krvnim mrljama i obrascima, koji često imaju krucijalni značaj za rešavanje određenih kriminalnih slučajeva. Interpretacija ovih tragova ponekad zahteva i empirijski eksperimentalni rad sa uslovima i okolnostima pod kojima su takve mrlje nađene da bi se bolje razumeo njihov nastanak. Ovakav pristup je neophodan jer u disciplini analize obrazaca krvnih mrlja još uvek nema razvijenih algoritama i konkretnih pravila za tačno opredeljivanje vremenske dinamike promena vezanih za izmenjene krvne mrlje. Stoga se nameće potreba opsežnih, sistematskih i eksperimentalnih istraživanja u ovom području sudske medicine.

Difuzija i kapilarnost krvnih mrlja

Difuzija predstavlja kretanje tečnosti iz područja veće koncentracije u područje niže koncentracije (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). **Kapilarnost** se definiše kao mogućnost tečnosti da kvasi određeni materijal. Površinski napon tečnosti je odgovoran

za kretanje same tečnosti kroz pore čvrstih predmeta i materijala (Breithaupt J, 2001). Difuzija krvi kroz tkanine je najbrža i najevidentnija u prvih 5 minuta ekspozicije tkanine tečnoj krvi, dok se u kasnijem periodu difuzija dalje nastavlja ali značajno sporije (De Castro TC, 2017). Efekti difuzije i kapilarnosti krvi, u realnim slučajevima, često se sreću na posteljini, dušecima i odeći (Slika 19).



Slika 19. Difuzija krvne mrlje (De Castro TC, 2017)

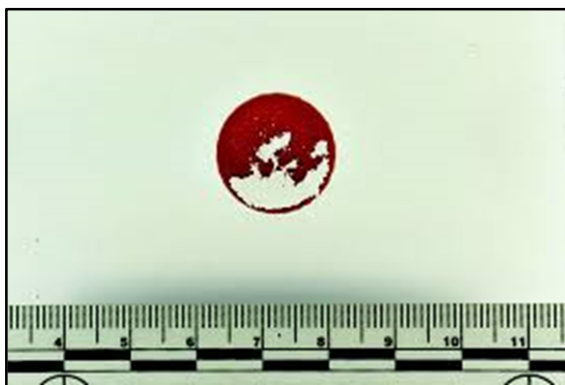
Starenje krvi

Nakon deponovanja krvi na određenu ciljnu površinu i formiranja krvne mrlje počinje proces starenja krvi. Boja krvi je najpre svetlije ili tamnije crvena, potom crvenkastobraonkasta, u narednoj fazi može dobiti određenu nijansu zelenkaste boje i u završnoj fazi krvne mrlju su tamnobraon do crne boje (Anderson S et al., 2005; Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Ekspozicija krvnih mrlja direktnom uticaju sunčevih zraka znatno ubrzava promenu izgleda mrlja, te samim tim utiče na ubrzano starenje krvi. Topla i vlažna sredina uz prisustvo bakterija može na različite načine izmeniti vremenske okvire i ponekad redosled promena u krvnim mrljama. Takođe, prisustvo gljivica može biti uzročnik netipičnih promena u krvnim mrljama, tako da mrlja može izgledati kao da je izmenjena provlačenjem maljavog dela tela ili kose kroz originalnu mrlju. Podloga na kojoj se krvne mrlje nalaze mora uvek biti uzeta u obzir prilikom davanja mišljenja o starosti mrlje, jer može uticati na vizuelnu interpretaciju boje i samim tim starosti mrlje. (Anderson S et al., 2005; Nakao KI et al., 2013)

Sušenje krvi

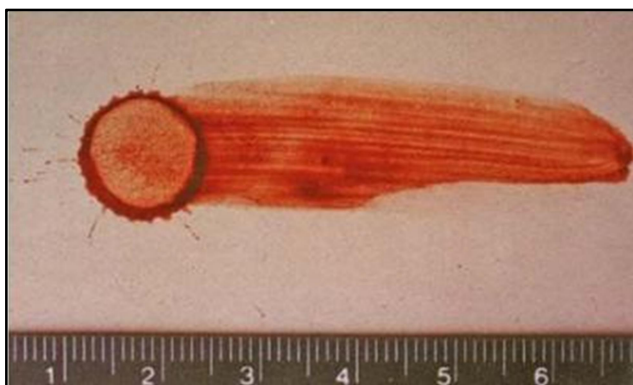
Nakon formiranja krvne mrlje odmah otpočinje proces **sušenja krvi**. Dinamika sušenja krvi zavisi od količine krvi u krvnoj mrlji, tipa krvne mrlje, karakteristika ciljne podloge i faktora spoljašnje sredine. Prskane mrlje na neporoznoj površini, u sobnim uslovima, suše se za nekoliko minuta. Viša temperatura, niža vlažnost vazduha i strujanje vazduha ubrzavaju proces sušenja krvi. Ciljne površine poroznih karakteristika, koje se natapaju krvlju, značajno produžavaju vreme sušenja krvi. (Ramsthaler F et al., 2012)

Tokom procesa sušenja krvi na određenoj ciljnoj površini dolazi i do promena u ćelijama krvi. Eritrociti najpre postaju sitno nazubljeni, skvrčeni, okruglasti sa bodljastom površinom, te u narednoj fazi dolazi do lize ćelije, odnosno raspadanja eritrocita (Ramsthaler F et al., 2012). Kada proces sušenja bude završen, ponekad centralni deo mrlje može biti veoma diskretnim delovanjem sile pretvoren u prah i nestati, a za sobom ostavlja samo ram ili okvir prvobitne mrlje i naziva se **skeletizirana krvna mrlja** (Slika 20). (James SH et al., 2005; Ramsthaler F et al., 2012)



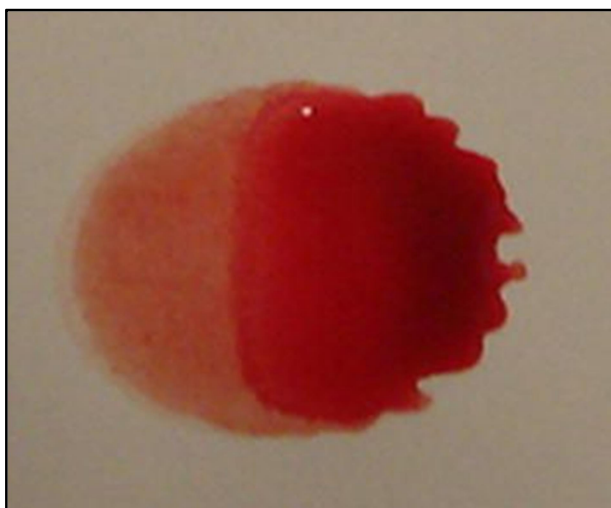
Slika 20. Skeletizirana krvna mrlja (James SH et al., 2005, p. 185)

Od ovakvih mrlja treba razlikovati drugu specifičnu podgrupu izmenjenih krvnih mrlja. Naime, proces sušenja krvi u krvnim mrljama se odvija od periferije mrlje ka njenom centralnom delu. Kada tokom procesa sušenja određeni objekat bude provučen kroz tako delimično sasušenu, a delimično još uvek tečnu krv, nastaje takođe izmenjena krvna mrlja koja poseduje samo perifernu odnosno obodnu ivicu, ali se razlikuje od skeletizirane mrlje po tome što ima i obrazac razmazivanja u sebi kao pridodatu karakteristiku (Slika 21). (James SH et al., 2005; Ramsthaler F et al., 2012)



Slika 21. Krvna mrlja izmenjena razmazivanjem (James SH et al., 2005, p. 186)

Sušenje krvi ima veoma veliku praktičnu primenu u identifikaciji naknadnih aktivnosti, naročito u smislu pomeranja predmeta i fingiranja situacije od strane napadača. Naime, kada krv dospe na neki mobilni cilj na licu mesta, na još uvek tečnu krv u mrlji deluje sila gravitacije tako da dolazi do određene preraspodele krvi u svežoj krvnoj mrlji i formiranja gušćeg dela krvi u najnižem delu mrlje (Slika 22). Preraspoređena krv zatim prolazi proces sušenja. Ukoliko se nakon kompletno ili delimično završenog procesa sušenja krvi u krvnoj mrlji okrvavljeni predmeti naknadno pomeraju i potom postave u neki drugačiji položaj od prvobitnog, analitičar može identifikovati neprirodni raspored gušćeg dela krvi u sasušenoj krvnoj mrlji, koji nalikuje antigravitacijskoj mrlji. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

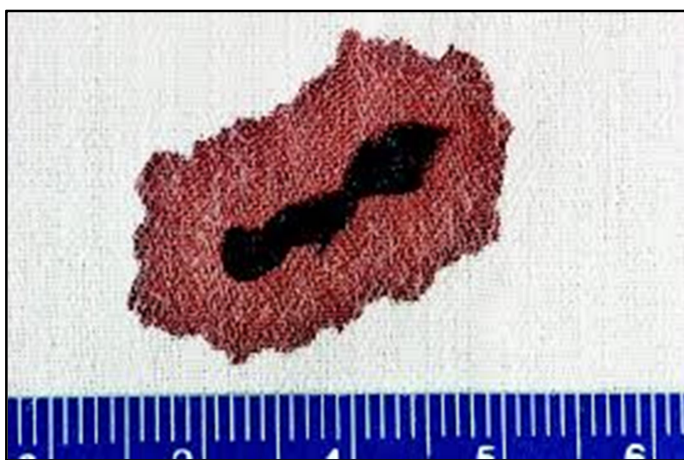


Slika 22. Formiranje gušćeg dela krvi pod uticajem gravitacije

Zgrušavanje krvi

Zgrušavanje krvi se odvija kroz kompleksne koagulacione mehanizme. Nakon formiranja koaguluma, dolazi do njegove retrakcije i separacije seruma. Separacija seruma se dešava najmanje na jedan sat ili više od početne faze koagulacije krvi. Ovo je jako važno za određivanje vremenskog okvira odigravanja određenih faza kritičnog povređivanja i naknadnih aktivnosti. Kod normalnih zdravih osoba od početka krvarenja do početka formiranja krvnih koaguluma potrebno je vreme od oko 3 do 15 minuta, tj. vreme koagulacije. Bolesti jetre, određene hematološke bolesti i primena antikoagulacione terapije mogu značajnije uticati na produženje vremena koagulacije. S druge strane, cerebrospinalna tečnost znatno ubrzava proces koagulacije krvi, a što se često sreće u slučajevima otvorenih povreda glave. (Bevel T et Gardner RM, 2008; Hall JE et Guyton AC, 2016; James SH et al., 2005)

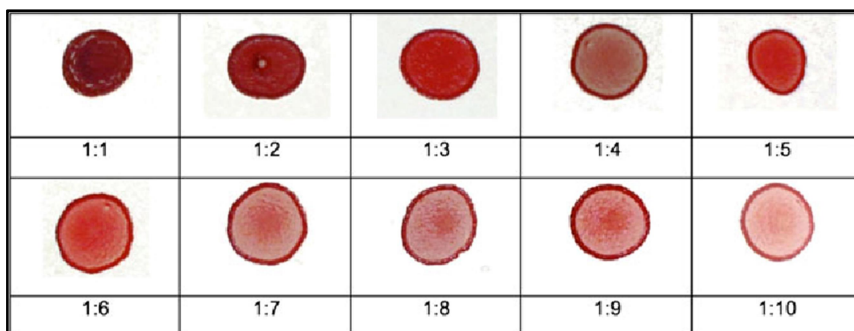
Posebno veliki praktični značaj ima nalaz krvnih mrlja u kojima se nalazi delimično tečna i delimično koagulisana krv, te se ovakve mrlje nazivaju **mrlje „jaje na oko“** (Slika 23), a naročito su značajne kada se nađu u prskanim mrljama (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Nalaz ovakvih mrlja u obrascima prskanja ukazuje na značajan protok vremena između početka krvarenja žrtve, odnosno nastanka prvih rana, i naknadnog povređivanja žrtve udarcima čvrstim predmetom. Dakle, potreban je određeni vremenski zjap da bi ovakvi obrasci nastali, a što može biti veoma važno u potvrdi ili opovrgavanju iskaza napadača. Praktična primena je u određivanju vremena i dinamike događaja, pozicije napadača u vreme delovanja sile, utvrđivanju sekundarnog pregaženja u saobraćajnom traumatizmu, određivanju dužine nadživljavanja žrtve i dr.



Slika 23. Mrlja "jaje na oko" (James SH et al., 2005)

Razblažene krvne mrlje

Razblaživanje krvi (Slika 24) u krvnim mrljama može nastati odmah nakon deponovanja krvi na ciljnim predmetima ili u kasnijoj fazi. Fizički faktori spoljašnje sredine koji najčešće utiču na razblaživanje krvi u krvnim mrlja su kiša i sneg. Svakako, pokušaji čišćenja i pranja od strane napadača u cilju prikrivanja tragova značajno menjaju originalnu prirodu krvnih mrlja. Područja na kojima se nalaze krvne mrlje uglavnom su veoma bleđa uz jasno konturisanje mrlje po njenoj obodnoj ivici (Arjun RI et al., 2016; Creamer JI et al., 2005; Edler C et al., 2017; Jain P et Singh HP, 1984; Leak G, 2010; Ramsthaler F et al., 2016). Ukoliko krv bude deponovana na led, temperatura krvi može otopiti površni sloj leda i samim tim uzrokovati razblaživanje krvi. Međutim, ukoliko se povređivanje žrtve odigra u sredini sa veoma niskom temperaturom, kakvi su uslovi u hladnjačama ili na jakoj zimi, može doći do gotovo trenutnog zaleđivanja krvi, bez sušenja krvi i bez topljenja površnog sloja leda i efekta razblaživanja (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Tečnosti koje mogu uzrokovati razblaživanje krvi u realnim slučajevima su i urin žrtve i napadača, pljuvačka i cerebrospinalna tečnost.



Slika 24. Različiti stepeni razblaženja krvi u krvnim mrljama (Ramsthaler F et al., 2016)

Aktivnosti životinja

Muve se često nalaze na licu mesta prilikom vršenja uviđaja, a njihovo prisustvo zavisi od klimatskih uslova i dostupnosti lica mesta i samog leša. Kada na licu mesta postoji tečna krv, određene muve (npr. konjska i goveđa muva - obad) gutaju krv i potom je povrate na ciljnu površinu da bi enzimi iz njihove pljuvačke najpre razgradili krv. Nakon određenog vremena muve se vraćaju na mesto isprovraćane i fermentisane krvi i time se hrane (Madea B et al., 2014). Ovakve aktivnosti muva na licu mesta, naročito u slučajevima truležno izmenjenih leševa, često mogu uzrokovati nastanak mrlja nalik prskanim mrljama i uneti

potencijalne paradokse u forenzičku analizu slučaja ukoliko se ne sagledaju adekvatno. Takođe, muve mogu svojim ekskretima ili kontaktom svojih nogu sa krvnim mrljama da promene originalnu prirodu mrlja. Prilikom analize ovakvih mrlja na licu mesta treba najpre obratiti pažnju na prisustvo muva i njihovu aktivnost, kao i na prisustvo eventualno ispražnjenih larvi muva bez prisustva aktivnih muva. Nakon toga, pri analizi „obrasca prskanja uzrokovanog muvama“ pažnju treba fokusirati na sagledavanje usmerenosti pojedinačnih „prskanih mrlja“, te će se analizom potvrditi da mrlje nemaju konzistentnu usmerenost ka određenom području konvergencije, već je njihova usmerenost nasumična i haotična (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005). Pojedinačne „lažne prskane mrlje“ uglavnom nemaju oblik kakav imaju prskane mrlje u klasičnim obrascima prskanja. Njihov oblik je više nepravilan i raznolik, te mogu biti oblika zareza, kupe, kapljičasti, zmijoliki, talasasti, nalik spermatozoidu i dr. Dakle, izražena nelogičnost i nekonzistentnost obrazaca nalik obrascima prskanja na licu mesta sa povredama žrtve i drugim krvnim mrljama na licu mesta, uz postojanje prethodno navedenih preduslova, može ukazati da je obrazac uzrokovan aktivnostima muva.

Ponekad udarac muva i drugih insekata u prednjačeće površine vozila u pokretu može uzrokovati nastanak obrazaca krvnih mrlja nalik obrascima koji nastaju prilikom saobraćajnog traumatizma. Analitičari angažovani na rasvetljavanju okolnosti posebnih saobraćajnih nezgoda moraju biti svesni ovakvih okolnosti i obratiti posebnu pažnju pri identifikaciji posebnih obrazaca krvnih mrlja na spornim vozilima. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Praznina

Prilikom vršenja BPA nisu bitna samo ona područja i predmeti na kojima se nalaze krvne mrlje, već su podjednako važni i oni objekti na kojima nema krvi, a na kojima bi po svojoj prirodi i logici trebalo da je bude. **Obrazac praznine** (Slika 25) je oblik izmenjene krvne mrlje i podrazumeva nedostatak krvnih mrlja u inače neprekidno okrvavljenom području. Praznina je rezultat prisustva određenog predmeta ili osobe, koja u trenutku stvaranja krvne mrlje predstavlja prepreku na putu širenja krvi, te nakon što je mrlja stvorena i delom deponovana na okrvavljeni predmet ili osobu, dolazi do naknadnog uklanjanja tih okrvavljenih objekta zajedno sa delom kontinuiteta obrasca. Na preostalom delu krvne mrlje

na licu mesta često se mogu uočiti obrisi objekta koji je uklonjen. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)



Slika 25. Praznina (<https://hemospat.com>, nd)

Redosled u obrascima krvnih mrlja

Posebno važan zadatak analitičara BPA je utvrđivanje redosleda nastanka krvnih mrlja i obrazaca krvnih mrlja, a samim tim i utvrđivanje redosleda pojedinih specifičnih faza odigravanja kritičnog događaja. Ovaj segment rada analitičara, uz podrazumevanu prethodno urađenu sveobuhvatnu analizu svih krvnih mrlja sa dokaznih objekata, predstavlja jednu od najkompleksnijih faza, koja može iziskivati dosta vremena i često rezultuje kompletnom ili parcijalnom rekonstrukcijom kritičnog događaja.

Nakon dospevanja kapi krvi na određenu površinu otpočinje proces njenog sušenja. Kako je već prethodno objašnjeno (vidi odeljak: sušenje krvi), proces sušenja krvi u krvnim mrljama se odvija od periferije mrlje ka njenom centralnom delu. Ukoliko tokom procesa sušenja određeni objekat bude provučen kroz tako delimično sasušenu i delimično tečnu krv, nastaje uklanjanje centralnog tečnog dela krvi, dok obodni sasušeni deo krvi uglavnom ostaje neoštećen. Između nanošenja kapi krvi na ciljnu površinu i naknadnog provlačenja predmeta neophodno je da protekne određeni period vremena u toku kojeg se deo krvi sasušuje. Na osnovu širine oboda sasušenog-preostalog dela izmenjene krvne mrlje može se procenjivati vreme proteklo između dve faze nastanka ovako izmenjene krvne mrlje, odnosno između kapanja i provlačenja predmeta (Anderson S et al., 2005; (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005; Peschel O et al., 2011; Ramsthaler F et al., 2012).

Utvrđivanje redosleda određenih faza nastajanja obrazaca krvnih mrlja može biti opredeljeno analizom probrisavanja u prethodno postojećoj mrlji po tipu transfera, kao i u analizi obrasca prskanja i transfera koji se međusobno preklapaju. Često se u praktičnom radu može naći više različitih faza u nastajanju određenih obrazaca izmenjenih krvnih mrlja, čime se svakako komplikuje analitički proces. Tokom edukacije na naprednim kursovima analičari BPA se osposobljavaju da raspoznaju više različitih aktivnosti i faza u nastajanju određenih obrazaca, tako da je dolaženje do validnih rezultata zaista komplikovano.

Pokušaji prikrivanja tragova zločina i uklanjanje krvnih mrlja

S obzirom na to da se u svakodnevnoj praksi analitičara BPA sreću najrazličitiji pokušaji uklanjanja tragova krvi sa dokaznih predmeta u cilju prikrivanja zločina i tragova pravog načina odigravanja kritičnog događaja, to ove mrlje zauzimaju posebno mesto. Uklanjanje krvnih mrlja može biti obavljeno ručnim ili mašinskim pranjem, bez deterdženta ili uz korišćenje različitih deterdženata, pomoću izbeljivača, hlorovodonične kiseline, farbanjem okrvavljenih površina, podmetanjem požara i dr. (Edler C et al., 2017; Helmus J et al., 2017; Mushtaq S et al., 2016; Ramsthaller F et al., 2016; Salahuddin Z et al., 2018; Spector J et Von Gemmingen D 1971; Thabet HZ et al., 2018; Tontarski KL et al., 2009).

Efekat vatre i gareži je veliki praktični problem u radu analitičara. Krvne mrlje mogu biti u celosti prekrivene gareži, kako krvne mrlje na horizontalnim tako i na vertikalnim površinama, te mogu biti potpuno previđene pri analizi. Krvne mrlje prekrivene gareži su uglavnom nešto tamnije od okolne gareži, ali to ne mora biti i pravilo (Tontarski KL et al., 2009). Postoje novije metode uklanjanja gareži sa površina na kojima se nalaze sasušene krvne mrlje upotrebom tečnog silikona (Luche C et al., 2011). Očuvanost krvnih mrlja nakon gašenja požara zavisi od blizine izvora vatre, dužine ekspozicije vatri, pozicije krvnih mrlja u prostoru zahvaćenom požarom (niže krvne mrlje su uglavnom očuvanije od onih u gornjim delovima prostorije), nanošenja gareži (čini određenu prezervaciju krvnih mrlja), načina gašenja požara i dr. (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005)

Iskustva i podaci u stručnoj literaturi pokazuju da izvršioци krivičnih dela po pravilu ne uklone sve tragove krvi, tako da je sveobuhvatna i sistematična BPA često ključna za pronalaženje i izvođenje krivaca pred lice pravde. Često se na gornjim delovima zidova i na plafonu, kao i na udaljenim predmetima od mesta izvršenja nalaze obrasci odbacivanja, koji najčešće nastaju intenzivnim zamahivanjem okrvavljenim povrednim oruđem od strane napadača, a koji se često previde od strane izvršioca tokom pokušaja prikrivanja drugih većih i upadljivih tragova krvi (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005).

Nakon pokušaja uklanjanja tragova krvi analitičari često pronalaze izmenjene krvne mrlje po tipu razblaživanja, razmazivanja, difundovanja i natapanja, kao i mrlje po tipu sekundarnog prskanja uz elemente izmenjenosti po tipu razblaživanja (Bevel T et Gardner RM, 2008; James SH et al., 2005; Ramsthaller F et al., 2016). U takvim slučajevima je neizostavna i neophodna upotreba namenskih forenzičkih hemijskih sredstava (Luminol,

Bluestar forensic tabletes, Hemastix i dr.), u cilju pronalaženja i identifikacije tragova krvi i vizuelizacije nevidljivih mikrotragova preostalih krvnih mrlja (Creamer JI et al., 2005; Gross AM et al., 1999; Tobe SS et al., 2007; Tontarski KL et al., 2009; Vennemann M et al., 2014; Webb JL et al., 2006). Aktivne supstance iz ovih sredstava mogu da detektuju prisustvo nevidljive krvi čak i u uslovima kada je krv ekstremno razblažena. Tako Hemastix registruje prisustvo krvi u razblaženjima do maksimalno 1:1.000.000, dok Bluestar forensic tablets rastvor registruje prisustvo krvi do maksimalnog razblaženja 1:5.000.000 (Webb JL et al, 2006; Tobe SS et al, 2007). Iz ovoga se vidi koliko su ovi hemijski testovi za identifikaciju i pronalaženje tragova krvi izuzetno značajni za analitičare BPA.

Krvne mrlje se mogu uspešno ukloniti sa odeće pranjem, ali uspešnost zavisi od količine i starosti krvne mrlje, vrste tkanine (Miles HF et al., 2014; Xingyu Li et al., 2017) i načina pranja (Slemko J, 2003). Duže potapanje okrvavljene tkanine u vodi olakšava uklanjanje krvnih mrlja naknadnim pranjem (Arjun RI et Ashish P, 2016). Krvne mrlje se najteže uklanjaju sa pamučne tkanine, tako da jedno konvencionalno pranje okrvavljene pamučne tkanine ne može ukloniti sve tragove prethodno postojeće krvne mrlje (Arjun RI et Ashish P, 2016, Stojanović I, 2018), pri čemu je ovaj efekat još upadljiviji na teksas materijalu napravljenom od pamuka (Edler C et al., 2017). S druge strane, svila i poliester predstavljaju tkanine sa kojih se najlakše ukanjaju tragovi krvnih mrlja (Arjun RI et Ashish P, 2016), tako da ručno pranje okrvavljenih materijala od poliestera može u potpunosti ukoniti tragove krvi (Edler C et al., 2017). Sveže krvne mrlje se lakše peru u hladnoj vodi, mada je eksperimentima pokazano da pranje u hladnoj vodi sa deterdžentom uz ispiranje ne uklanja u potpunosti krvne mrlje sa teksas materijala ukoliko su se krvne mrlje sušile tokom 3 dana. S druge strane, prskane mrlje se lakše uklanjaju sa teksas materijala ovakvim procesom pranja. Standardno hemijsko čišćenje uz potapanje tkanine u organski rastvarač nije efikasan način uklanjanja krvnih mrlja. (Arjun RI et Ashish P, 2016; Edler C et al., 2017; Helmus J et al., 2017; Mushtaq S et al., 2016)

Skorašnjim istraživanjima je pokazano da se puni DNK profili mogu dobiti iz opranih okrvavljenih tkanina. Ovakvi rezultati DNK analize se uglavnom postižu sa tkaninama na kojima se krvne mrlje najintenzivnije zadržavaju, odnosno sa pamučnim tkaninama, ali i sa drugim tkaninama. Sa ponavljanjem određenog ciklusa pranja dolazi do smanjenja količine i kvaliteta DNK materijala, te se češće dobijaju parcijalni DNK profili (Edler C et al., 2017; Kulstein G et Wiegand P, 2018). Ovim istraživanjima je sagledavana samo mogućnost

dobijanja DNK profila nakon pranja okrvavljene tkanine, dok u literaturi nema podataka o efektu deterdženta i protoku vremena nakon pranja na količinu i kvalitet DNK materijala u biološkom tragu. Takođe, uticaj temperature vode koja se koristi za pranje nije detaljnije istraživana u aktuelnoj literaturi.

Tokom pranja okrvavljene tkanine može doći do sekundarnog transfera krvi i DNK materijala iz područja originalne krvne mrlje na neokrvavljene delove iste ili druge tkanine, te se iz tih područja mogu izolovati puni DNK profili (Andrews C et Coquoz R, 1994; Edler C et al., 2017; Helmus J et al., 2017; Helmus J et al., 2019; Kamphausen T et al., 2015; Kulstein G et Wiegand P, 2018; Meakin G et Jamieson A, 2013). Pokazano je da sasušeni uzorci pokazuju samo 0,36% transfera biološkog materijala iz jednog u drugo područje, dok vlažni uzorci pokazuju čak 50-95% mogućnosti transfera biološkog materijala (Goray M et al., 2010). Prema tome, očekivano je da će se sveže krvne mrlje lakše i više premeštati tokom pranja okrvavljene tkanine u odnosu na starije tragove krvi. U literaturi nema pouzdanih i detaljnih podataka o premeštanju krvnih mrlja između različitih delova tkanina.

Degradacija DNK

Degradacija molekula DNK se manifestuje cepanjem molekula na manje fragmente. U početnim fazama degradacije DNK molekul se cepa na fragmente veće dužine, a tokom vremena dolazi do nastajanja sve manjih i manjih fragmenata. Kako napreduje proces degradacije, veći ciljni ampliconi se smanjuju disproportionalno u odnosu na manje amplicone. Efekat degradacije molekula DNK se manifestuje kao smanjenje intenziteta signala najpre za duže STR lokuse, odnosno duže amplicone. Degradacija DNK u završnoj fazi može toliko uznapredovati da se dobiju samo retki pojedini STR lokusi, uglavnom kraći ampliconi koji sadrže manje baznih parova, te dobijeni profil iz analiziranog uzorka budu apsolutno nekonkluzivni. U savremenoj forenzičkoj genetici pojava problema degradovane DNK je dosta umanjena uvođenjem novih kitova koji koriste kraće markere (mini STR). Poslednje generacije ovih kitova koriste STR (eng. Short Tandem Repeats) markere koji su kraći od 350 nukleotidnih baznih parova (Martin P et al, 2006).

U literaturi postoji veoma malo podataka o degradaciji DNK povezanoj sa forenzičkim slučajevima i mikroklimatskim faktorima sredine. Aktuelna literatura vezana za rad u DNK laboratoriji uglavnom samo u najkraćim crtama pominje glavne razloge propadanja molekula DNK, bez detaljnije analize uticaja tih faktora na realne slučajeve iz oblasti krivičnog prava. Najznačajniji faktori koji ubrzavaju degradaciju molekula DNK su: **toplota, sunčeva svetlost, ultraljubičasto zračenje, vlaga i mikroorganizmi** (Bright JA et al., 2013; Sirker M et al., 2016). Pobrojani faktori se smatraju „neprijateljima DNK molekula“ u laboratorijskom radu, ali vremenski okviri delovanja ovih faktora u kojima dolazi do propadanja DNK nisu dovoljno istraženi. U laboratorijskom radu DNK analitičari često primenjuju rastvor varikine i UV svetlost u cilju uništenja neželjenog DNK materijala na radnim površinama, instrumentima i dr.

Skorašnjim istraživanjima je dokazana pretpostavka u koju se dugo verovalo da se degradacija DNK materijala odvija uniformno u čitavom genomu. Degradacija DNK materijala zahvata podjednako sve hromosome i njihove delove (Hanssen EN et al, 2017). Međutim, to se ne odnosi na heterohromatin. Heterohromatin je genetski neaktivni deo DNK, odnosno frakcija genetskog materijala koja ne sadrži gene, a čini prosečno oko 6% DNK ćelije. Povećana otpornost heterohromatina na degradaciju potiče od njegove stabilnije strukture, koju održava histon H1 u somatskim ćelijama, a protamini u spermatozoidima. S obzirom na to da u odmakloj fazi procesa degradacije DNK materijala dolazi do odvajanja

proteinskih komponenti od molekula DNK, to se protokom vremena smanjuje zaštitni uticaj heterohromatinske strukture na degradaciju DNK. S obzirom na to da je degradacija DNK ispitivana na krvi i profilisanje prema STR lokusima, za potrebe aktuelnog istraživanja može se zanemariti mali deo DNK koji pokazuje veću otpornost prema faktorima koji uzrokuju degradaciju DNK molekula.

Degradacija DNK molekula u forenzičkim laboratorijama ispituje se uz pomoć komercijalnih kitova (npr. Quantifiler HP), koji su dizajnirani tako da mogu da kvantifikuju dve različite autozomalne multikopije ciljnog lokusa sa dve različite veličine amplikona. Očitavanje rezultata se vrši pomoću odgovarajućeg kompjuterskog programa, kao što je npr. HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 Degradation Index – koji se i koristi u DNK laboratoriji Zavoda za sudsku medicinu u Nišu. Indeks degradacije predstavlja odnos između malih autozomskih i velikih autozomskih amplikona, odnosno fragmenata, te se na osnovu ovog indeksa određuje stepen eventualno postojeće degradacije ispitivanog uzorka. Ovaj indeks ukazuje da će se duži STR lokusi smanjeno amplifikovati u PCR reakciji koja predstoji. Očekuje se da se duži STR lokusi smanjeno amplifikuju u PCR reakciji jer, statistički gledano, veća je verovatnoća da će se kidanje DNK lanca desiti na dužem nego na kraćem lokusu.

Povod za istraživanje

Ideja za aktuelno istraživanje rođena je na jednom realnom forenzičkom slučaju koji je veštačen od strane više različitih veštaka Zavoda za sudsku medicinu u Nišu.

Početkom novembra meseca 2016. godine u malom mestu u blizini Niša dogodilo se ubistvo. Osumnjičeni su jedna žena i njen rođeni brat, te je policija prilikom pretresa njihove kuće izuzela nekoliko odevnih predmeta iz garderobera i opranih odevnih predmeta sa žice za veš, za koje se pretpostavljalo da su osumnjičeni mogli nositi kritičnom prilikom. U Laboratoriji za biološke tragove Zavoda za sudsku medicinu u Nišu na rubovima nogavica farmerica osumnjičene pronađene su mrlje poreklom od ljudske krvi, za koje je naknadnom DNK analizom potvrđeno da potiču od krvi žrtve. Nađene mrlje su bile izmenjene krvne mrlje po tipu razblaživanja i saturacije, što je jasno ukazivalo da su farmerice osumnjičene, krv žrtve i voda bili uključeni tokom procesa nastanka nađenih krvnih mrlja.

Šest meseci kasnije, od strane tužilaštva je traženo da se ponovi DNK analiza svih prvobitno nađenih krvnih mrlja na rubovima nogavica farmerica, jer prvobitnim DNK veštačenjem nisu analizirane sve već samo selektovane mrlje. DNK analizom ni iz jedne mrlje nije mogao biti izolovan DNK profil žrtve, koji je inače prvobitnim veštačenjem iz tih istih mrlja izolovan. Forenzička nauka nija imala precizno i pouzdano objašnjenje ovakve pojave, te smo tužilaštvu obrazloženje dali kroz verovatan uticaj samog procesa pranja, deterdženta i visoke temperature vode korišćene pri pranju. S obzirom na to da voda, korišćena pri pranju, ima manju osmolarnost od unutrašnjosti ćelija krvi, jedan od mogućih faktora nastale degradacije DNK je pretpostavljeno prskanje ćelija krvi i eksponiranje genetskog materijala faktorima sredine. U svetu molekularne biologije opšte je poznat podatak da sapuni i deterdženti olakšavaju ekstrakciju DNK materijala liziranjem ćelija, posle čega dolazi do eksponiranja DNK materijala faktorima spoljašnje sredine. Kao treći mogući faktor navedena je visoka temperatura vode pri pranju okrvavljene tkanine, koja je mogla delovati denaturaciono na proteinske komponente vezane za molekule DNK.

Situacija u ovom slučaju je postala dodatno komplikovana kada je osumnjičena na predočene forenzičke dokaze odgovorila da ti tragovi krvi na njenim farmericama potiču iz događaja iz avgusta meseca 2016. godine. U to vreme osumnjičena i žrtva su bili u dobrim odnosima, a osumnjičena je navodno tom prilikom pomagala pokojnom, jer je on tada aktivno krvario iz telesnih šupljina u području glave. Aktuelna forenzička nauka nije imala

odgovore na ovakve situacije, u smislu preciznog datiranja nanošenja krvi na tkaninu, protoka vremena od nanošenja krvi do pranja i protoka vremena od pranja tkanine do DNK analize. Na pitanje zbog čega se degradacija DNK materijala nije odmah desila, već nakon perioda od više meseci, nismo imali pouzdan odgovor.

Opservirani nedostaci forenzičke nauke u navedenom slučaju jasno su ukazali na neophodnost novih opsežnih istraživanja na ovom polju. Realni problemi sa kojima smo se susreli radeći na ovom slučaju, kao i odgovori koje smo pružili istražnim organima sa umerenim stepenom verovatnoće, naveli su nas da postavimo određene hipoteze, koje su nas onda usmerile ka ciljevima aktuelnog istraživanja.

CILJ

Teza se bavi ispitivanjem vremenske, interpretativne i morfološke povezanosti karakteristika izmenjenih krvnih mrlja i različitih načina pranja okrvavljene tkanine, koji se u realnim sudskomedicinskim slučajevima često sreću.

U realnim uslovima, nakon izvršenja krivičnog dela, počinitelac često vrši pokušaj prikrivanja tragova pranjem odevnih predmeta. Pranje odeće može biti obavljeno mašinskim putem ili ručno, na različitim temperaturama pranja, sa deterdžentom ili bez njega. Pranje može biti obavljeno neposredno nakon krvoprolića ili odloženo na određeno vreme. U praksi se ovakvi oprani odevni predmeti otkrivaju od strane policije u različitim vremenskim intervalima od pranja do početka rada analitičara obrazaca krvnih mrlja na predmetu. Zato je jedan od ciljeva istraživanja da se ispita uticaj različitih načina pranja okrvavljene tkanine na definitivne karakteristike izmenjenih krvnih mrlja. Eksperimentima su obuhvaćeni svi najčešći slučajevi realno zastupljeni u praksi.

DNK analiza tragova krvi je sastavni i neizostavni deo svake analize obrazaca krvnih mrlja. Zato je u ovom istraživanju ispitivana povezanost dobijenih rezultata DNK analize (količina DNK u izolatu, fragmentacija DNK i dobijeni profil) sa uslovima pranja okrvavljene tkanine u različitim vremenskim intervalima od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i različitog protoka vremena od pranja do početka analize.

Dakle, glavni cilj ovakvog eksperimentalnog istraživanja je da se bolje razumeju i da se pruže objašnjenja za promene koje se dešavaju u krvnim mrljama i genetskom materijalu tokom procesa uklanjanja i prikrivanja tragova krvi, kao i utvrđivanje vremenskih okvira u kojima se određene fazne promene dešavaju, da bi se formirale upotrebljive smernice za rad analitičara obrazaca krvnih mrlja na konkretnim forenzičkim slučajevima.

HIPOTEZE

Radna hipoteza 1: Duži protok vremena od nanošenja krvi na tkaninu do njenog pranja uzrokuje slabije vizuelno uklanjanje krvi sa tkanine.

Radna hipoteza 2: Jedno konvencionalno pranje okrvavljene pamučne tkanine ne može ukloniti sve tragove krvi sa tkanine.

Radna hipoteza 3: Duži protok vremena od nanošenja krvi na tkaninu do njenog pranja uzrokuje teže uklanjanje DNK materijala iz krvne mrlje sa tkanine.

Radna hipoteza 4: Sa protokom vremena nakon pranja okrvavljene tkanine ne dolazi do smanjenja ukupne količine DNK materijala preostalog na tkanini.

Radna hipoteza 5: Primena deterdženta tokom pranja okrvavljene tkanine uzrokuje bržu degradaciju DNK u krvi preostaloj nakon pranja.

Radna hipoteza 6: Veća temperatura pranja okrvavljene tkanine uzrokuje bržu degradaciju DNK u krvi preostaloj nakon pranja.

Radna hipoteza 7: Duži protok vremena od nanošenja krvi na tkaninu do njenog pranja uzrokuje sporiju degradaciju DNK u krvi preostaloj nakon pranja.

Radna hipoteza 8: Krvne mrlje na tkanini oprane unutar jednog dana od nanošenja krvi pokazuju izraženi sekundarni transfer na delove tkanina bez prethodnih krvnih mrlja.

Radna hipoteza 9: Stare krvne mrlje na tkanini nakon pranja zadržavaju obrise kontura originalne krvne mrlje koja je postojala pre pranja.

Radna hipoteza 10: Degradacija DNK se prvo odražava na duže STR lokuse.

MATERIJAL I METODE

Kompletno istraživanje je bazirano na eksperimentalnoj metodi i sprovedeno je u Laboratoriji za biološke tragove i DNK laboratoriji Zavoda za sudsku medicinu u Nišu.

Krv

U eksperimentima je korišćena lešna krv koja je prikupljena tokom obdukcija sprovedenih u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu (brojevi obdukcijских slučajeva: S-445/18, S-512/18 i S-519/18). Preduslov za uzimanje krvi je bio uredan rezultat krvne slike i koagulacioni status, odnosno vrednosti analiziranih parametara bile su u okvirima referentnih neposredno pre nastupanja letalnog ishoda.

Tkanina

Za pripremu uzoraka korišćena je 100% pamučna tkanina, gustine tkanja 140 g/m². Tkanina je isečena tako da je veličina uzoraka bila 5x5 cm i ukupno je načinjeno 360 uzoraka. Preostala količina tkanine od 5 kg iskorišćena je za simulaciju mašinskog pranja u realnim uslovima.

Obeležavanje uzoraka

Uzorci su podeljeni u šest glavnih grupa u zavisnosti od temperature i načina pranja i u zavisnosti od primene deterdženta i to:

H+	mašinsko pranje na 95°C uz primenu deterdženta Ariel (preporučeno od proizvođača: 150 ml deterdženta); trajanje ciklusa pranja: 2 sata 28 minuta; centrifuga: 1200 obrtaja/minut
H-	mašinsko pranje na 95°C u vodi bez deterdženta; trajanje ciklusa pranja: 2 sata 28 minuta; centrifuga: 1200 obrtaja/minut
V+	mašinsko pranje na 60°C uz primenu deterdženta Ariel (preporučeno od proizvođača: 150 ml deterdženta); trajanje ciklusa pranja: 2 sata 18 minuta; centrifuga: 1200 obrtaja/minut
V-	mašinsko pranje na 60°C u vodi bez deterdženta; trajanje ciklusa pranja: 2 sata 18 minuta; centrifuga: 1200 obrtaja/minut
P+	mašinski simulirano ručno pranje na 30°C uz primenu deterdženta Ariel (preporučeno od proizvođača: 50 ml deterdženta); trajanje ciklusa pranja: 34 minuta; centrifuga: 400 obrtaja/minut – simulira ručno ceđenje tkanine
P-	mašinski simulirano ručno pranje na 30°C u vodi bez deterdženta; trajanje ciklusa pranja: 34 minuta; centrifuga: 400 obrtaja/minut – simulira ručno ceđenje tkanine

U okviru svake od grupa formirane su podgrupe. Obeležavanje svake od podgrupa izvršeno je dvocifrenim brojevima. Prva cifra označava interval vremena od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i može imati sledeće vrednosti: 1 (1 dan), 2 (3 dana), 3 (10 dana) i 4 (30 dana). Druga cifra označava interval vremena od pranja do početka analize uzorka i može imati sledeće vrednosti: 1 (1 dan), 2 (15 dana), 3 (30 dana), 4 (3 meseca) i 5 (6 meseci).

Ilustracija obeležavanja uzoraka: npr. oznaka V-24 znači da je: - okrvavljena tkanina oprana mašinski na 60°C u vodi bez deterdženta; - od nanošenja krvi na tkaninu protekao period vremena od 3 dana; - od pranja do početka analize uzorka protekao period vremena od 3 meseca.

Priprema uzoraka

Na prethodno pripljumljene uzorke tkanine mikropipetom je naneta krv, te je formirana krvna mrlja po tipu natapanja. Na uzorke iz grupe H naneta je krv u količini od 200 µl, na uzorke iz grupe V naneta je krv u količini od 100 µl, dok je na uzorke iz grupe P naneta krv u količini od 10 µl (Napomena: količina krvi u uzorcima je određena i prilagođena aktuelnom istraživanju kroz prvobitno pilot istraživanje koje je sprovedeno u periodu od 09.01.2017. do 10.08.2017. godine – neobjavljen materijal). Svaki uzorak je načinjen u tri replike. Formirani uzorci sa krvnim mrljama okačeni su na prethodno pripremljene stalke do potpunog sušenja krvi u mrljama, tako da je sprečen eventualni gubitak ukupne količine krvi iz uzoraka.

Kontrolni uzorci

Za svaku od navedenih grupa formirani su pozitivni i negativni kontrolni uzorci. Pozitivni kontrolni uzorci predstavljali su okrvavljenu pamučnu tkaninu koja nije prošla proces pranja. Negativni kontrolni uzorci su predstavljali komad pamučne tkanine bez krvi i oprani su istovremeno sa okrvavljenom tkaninom, te je kontrolnim uzorcima praćen sekundarni transfer krvi sa okrvavljenih na neokrvavljene delove tkanina.

Mašina za pranje veša

Model Samsung, tip WF80F5E0W2W/AD. Odabrana je mašina za pranje veša koja pored klasičnih programa intenzivnog pranja na visokoj temperaturi poseduje i program simuliranog ručnog pranja.

Pranje

Pranje okrvavljene tkanine vršeno je na tri različite temperature i to na: 30°C, 60°C i 95°C. Trajanje ciklusa pranja na 30°C iznosilo je 34 minuta, te je isto prilagođeno prema proizvođačkoj specifikaciji simulaciji prosečnog ručnog pranja, dok je centrifuga od 400 obrtaja/minuti imala za cilj da simulira ručno ceđenje tkanine. Trajanje ciklusa pranja na 60°C iznosilo je 2 sata 18 minuta, te je ova temperatura pranja prema proizvođačkoj specifikaciji prilagođena uglavnom obojenim tkaninama, dok je sušenje tkanine vršeno upotrebom centrifuge na 1200 obrtaja/minuti. Trajanje ciklusa pranja na 95°C iznosilo je 2 sata 28 minuta, te je ova temperatura pranja prema proizvođačkoj specifikaciji prilagođena uglavnom belim pamučnim tkaninama i dr., dok je sušenje tkanine vršeno upotrebom centrifuge na 1200 obrtaja/minuti.

Deterdžent

S obzirom na to da je radovima u literaturi već pokazano da Ariel predstavlja najdelotvorniji deterdžent za uklanjanje krvnih mrlja (Arjun RI et Ashish P, 2016; Mushtaq S et al., 2016), to su u aktuelnom ekperimentu primenjena dva ekstremna uslova pranja i to: pranje u vodi i pranje korišćenjem standarnog kućnog deterdženta Ariela (Ariel Washing Powder, Procter & Gamble: composed of 5-15% active ionic and <5% non-ionic surfactant-detergent, phosphates, water softener (zeoliths and polycarboxylates), enzymes, optical brighteners and perfumes).

Vizuelni pregled

Neposredni vizuelni pregled uzoraka vršen je neposredno nakon pranja i nakon protoka predodređenog perioda vremena prema podgrupi uzorka. Pregled je vršen u Laboratoriji za biološke tragove Zavoda za sudsku medicinu u Nišu pod prirodnom i belom svetlošću namenske forenzičke lampe velikog intenziteta, kao i pregledom pod stereomikroskopom i mikroskopskom kamerom sa uveličanjem do 200x. Tom prilikom vršeno je fotografisanje uzoraka DSLR fotoaparatom marke CANON tipa 1200d i objektivu 18-55 mm. Prilikom forenzičkog pregleda opranih uzoraka analizirano je sledeće:

- vidljivo prisustvo krvi na tkanini
- karakteristike obodne ivice i centralnog dela krvne mrlje
- sekundarni transfer krvi.

Dokazivanje prisustva krvi

U uzorcima prisustvo krvi je dokazivano korišćenjem prezumtivnih testova i to: HEMASTIX (proizvođač Siemens) i BLUESTAR forensic tablets (proizvođač Bluestar), koji su primenjivani prema proizvođačkoj specifikaciji.

Izolacija DNK

Svaki od uzoraka je najpre isečen na po tri dela, što je učinjeno zbog nesrazmere između veličine uzoraka i epruvetice za test (tzv. ependorfice), te je potom urađena izolacija materijala po standardnom laboratorijskom protokolu za sporne uzorke. Za izolaciju materijala korišćen je komercijalni kit „QIAGEN QIAamp DNA Mini kit (250)“. Po završenoj izolaciji materijala izolati iz identičnih uzoraka i replika su spojeni u jedinstvene uzorke. U slučajevima gde dalju analizu iz tehničkih razloga nije bilo moguće nastaviti istog dana, izolati su sačuvani u namenskom zamrzivaču sa dubokim zamrzavanjem na -80°C .

Kvantifikacija i indeks degradacije DNK

Kvantifikacija i merenje indeksa degradacije DNK materijala u izolatima vršeni su na aparatu „7500 Real-Time PCR“ uz upotrebu komercijalnog kita za kvantifikaciju „Quantifiler HP“, dok su rezultati očitavani uz pomoć namenskog kompjuterskog programa „HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 Degradation Index“.

Amplifikacija, elektroforeza i analiza DNK profila

Izolati DNK materijala, nakon kvantifikacije i procene indeksa degradacije, amplifikovani su korišćenjem ESI i ESX kita (Promega Corporation, Madison, USA) u ProFlex™ 3x32 PCR sistemu (Thermo Fisher Scientific Company, USA), prema priloženom uputstvu proizvođača. U narednom koraku obavljena je elektroforeza na ABI 3500 genetičkom analizatoru (Thermo Fisher Scientific Company, USA). Obrada grubih rezultata i analiza alela obavljena je primenom softvera GeneMarker software version 3 (Soft Genetics).

Statistička obrada rezultata

Unos, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka obavljeno je korišćenjem MS Office Excel programa. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine \pm standardne devijacije, odnosno minimalne i maksimalne vrednosti. Analiza podataka je vršena u programskom paketu SPSS 20.0. Rezultati statističke analize prikazani su tabelarno i grafički uz tekstualni komentar. Prosečne vrednosti ispitivanih grupa između tri merenja upoređivane su ANOVA testom ili Kruskal Wallis-ovim testom u zavisnosti od distribucije podataka. Analiza prosečnih

vrednosti u ponovljenim merenjima vršena je uz pomoć ANOVA za ponovljena merenja. Hipoteza je testirana sa pragom značajnosti $p < 0,05$. Izolovani DNK profili iz eksperimentalnih uzoraka, odnosno intenziteti pojedinih STR lokusa, predstavljeni su u vidu eksponencijalnih vrednosti, a u skladu sa skorašnjim istraživanjima u kojima je pokazana eksponencijalna korelacija dužine i intenziteta lokusa (Bright JA et al, 2013). Analiza rezultata dobijenih DNK profila vršena je i primenom korelacione analize i preračunom indeksa korelacije.

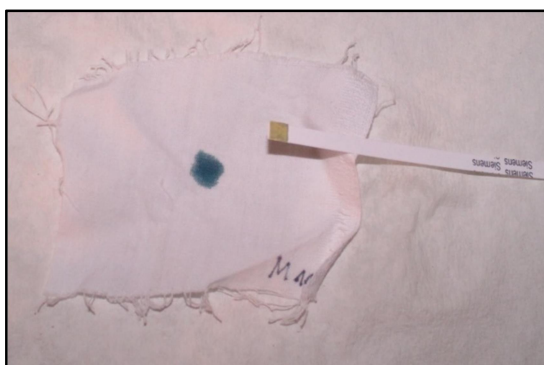
REZULTATI

Dokazivanje prisustva krvi u uzorcima

Dokazivanje prisustva krvi u uzorcima nakon pranja vršeno je korišćenjem prezumptivnih testova i to: HEMASTIX (proizvođač Siemens) i BLUESTAR forensic tablets (proizvođač Bluestar), koji su primenjivani prema proizvođačkoj specifikaciji. Pre svake pripreme, ispravnost testova je proveravana na pozitivnim kontrolnim uzorcima krvnih mrlja, te je svaki put dobijana jasno pozitivna reakcija u području krvne mrlje.

U svim testiranim uzorcima nakon pranja je dobijena jasno pozitivna reakcija primenom oba navedena prezumptivna testa za dokazivanje prisustva krvi (Slike 26 i 27). Ovakav rezultat jasno ukazuje da jedno konvencionalno pranje okrvavljene pamučne tkanine nije dovoljno da ukloni i vidljive i nevidljive tragove krvi sa odeće. Pri tretiranju oprane okrvavljene tkanine Bluestar-om dobijena je difuzna pozitivna reakcija na čitavim uzorcima, pri čemu su svi uzorci pokazali takvu difuznu reakciju. Pri tome, uzorci na kojima su postojali uočljivi obrisi i konture originalne krvne mrlje reakcija Blustar-om je bila intenzivnija u delovima tkanine sa vidljivim tragovima krvi, dok je u preostalom delu tkanine reakcija bila difuzno pozitivna ali slabijeg intenziteta.

Svi testirani kontrolni uzorci na kojima nije bilo krvi pre pranja, a koji su oprani sa drugom okrvavljenom tkaninom, pokazali su jasno pozitivnu reakciju nakon pranja. Ovakav rezultat jasno ukazuje da prilikom jednog konvencionalnog pranja okrvavljene pamučne tkanine dolazi do sekundarnog transfera krvi na druge pamučne tkanine. Na kontrolnim uzorcima nisu uočene mrlje jasnih granica, već je pozitivna reakcija Bluestar-om bila difuzna u svim delovima tkanine.



Slika 26. Pozitivna reakcija Hemastix-a

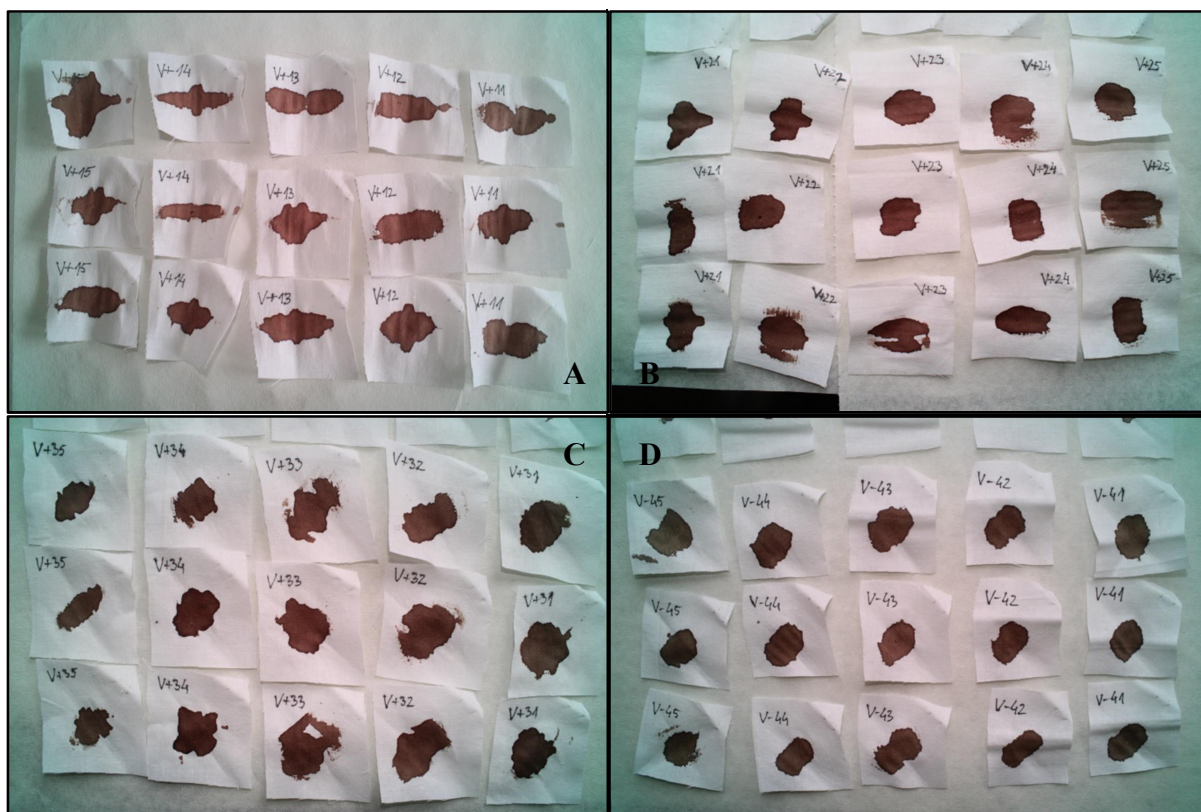


Slika 27. Pozitivna reakcija Bluestar forensic tablets-a

UTICAJ PROTOKA VREMENA NA IZGLED KRVNE MRLJE NA TKANINI PRE PRANJA

Nakon izvršene pripreme uzoraka, odnosno formiranja odgovarajućih saturacionih mrlja na pamučnoj tkanini, i protoka predviđenog perioda vremena prema podgrupi svakog od uzoraka, izvršena je analiza i komparacija vizuelnih karakteristika izgleda krvnih mrlja.

Centralni delovi svih saturacionih mrlja na tkanini su gotovo potpuno homogenog izgleda, dok se obodna ivica krvnih mrlja prema neokrvavljenoj tkanina jasno uočava i nešto je intenzivnije i tamnije boje u odnosu na centralni deo mrlje. Sve krvne mrlje su slične dominantno braonkaste boje. Prema tome, uporednom analizom uzoraka iz podgrupa starosti krvnih mrlja 1, 3, 10 i 30 dana nisu zapažene bilo kakve merljive vizuelne razlike u izgledu saturacionih krvnih mrlja pre pranja okrvavljene tkanine.

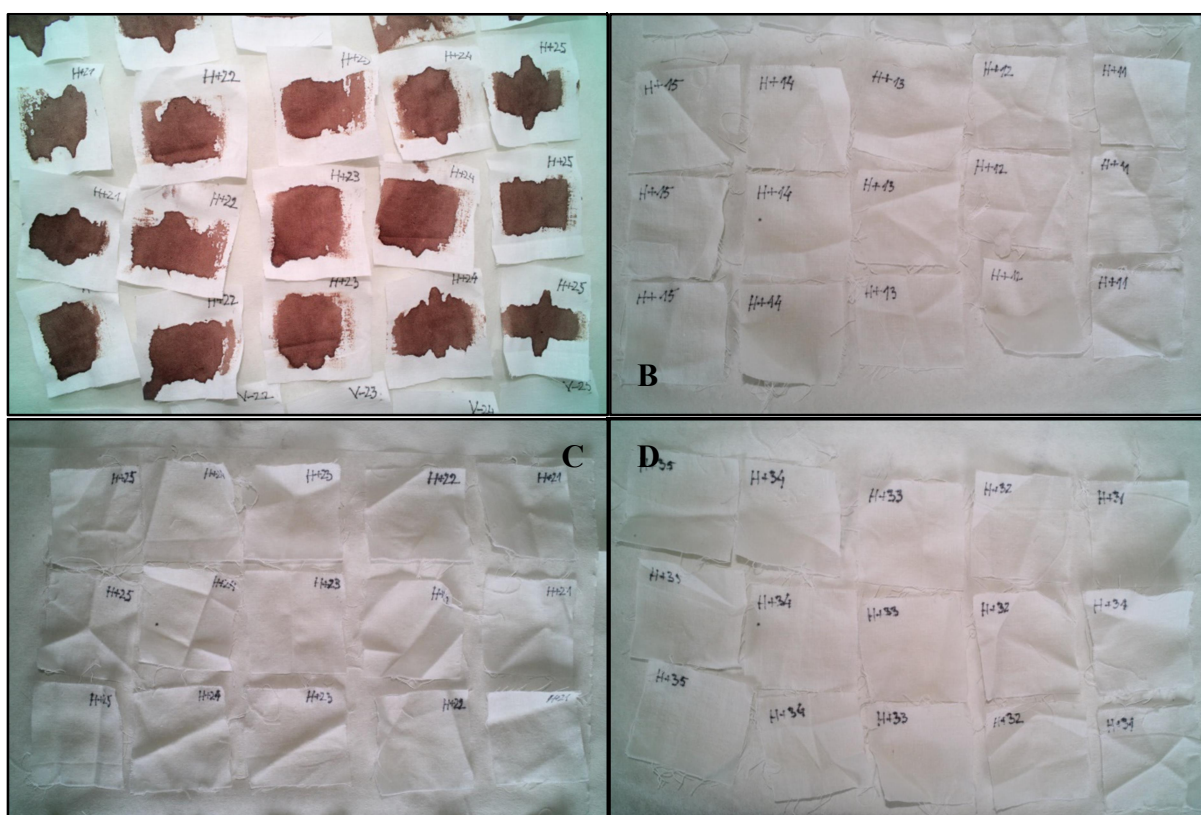


Slika 28. Primer komparativnog prikaza krvnih mrlja različite starosti. A - krvne mrlje stare 1 dan; B - krvne mrlje stare 3 dana; C - krvne mrlje stare 10 dana; D - krvne mrlje stare 30 dana.

UTICAJ VREMENA SUŠENJA KRVNE MRLJE NA ANALIZU OPRANE OKRVAVLJENE TKANINE

1. Grupa H+ (mašinsko pranje na 95°C uz primenu deterdženta Ariel)

Pregledom uzoraka iz podgrupe 1, 2 i 3 (starost krvnih mrlja 1, 3 i 10 dana od nanošenja krvi na tkaninu do pranja) nakon pranja utvrđeno je da jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 95°C uz upotrebu deterdženta može da ukloni vidljive tragove krvi, ali ne i sve dokaze prisustva krvi koja je postojala na tkanini pre pranja. Dakle, svi uzorci su dali jasno pozitivnu reakciju prilikom testiranja na prisustvo krvi sa oba korišćena testa (Slika 29).



Slika 29. A - primer uzoraka grupe H+ pre pranja; B, C i D - uzorci oprane okrvavljene tkanine H+ grupe, na kojima su u vreme pranja bile krvne mrlje starosti 1, 3 i 10 dana, a na kojima sada nema vidljivih krvnih mrlja.

S druge strane, pregledom uzorka iz podgrupe 4 (starost krvne mrlje 30 dana) nakon pranja utvrđeno je da jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 95°C uz upotrebu deterdženta može da ukloni skoro sve vidljive tragove krvi, osim segmentno očuvanih graničnih ivica krvnih mrlja koje su veoma bledocrvenkaste boje (Slika 30). Na svim analiziranim mrljama mestimično su uočena područja veoma bledocrvenkaste krvi, koja svojim izgledom i lokalizacijom odgovaraju obodnim ivicama

prvobitnih originalnih mrlja. Dakle, jedno intenzivno konvencionalno pranje okrvavljene pamučne tkanine sa krvnom mrljom starosti 30 dana nije dovoljno do ukloni sve vidljive tragovi krvi.



Slika 30. Uporedni prikaz uzoraka grupe H+4_, odnosno uzoraka krvnih mrlja starosti 30 dana gde nakon pranja zaostaju blede konture originalne krvne mrlje.

Na negativnim kontrolnim uzorcima svih podgrupa H+ grupe nakon pranja nisu registrovani vidljivi tragovi sekundarnog transfera krvi sa eksperimentalnih uzoraka na negativne kontrolne uzorke, dok je hemijskim testovima dobijena difuzna pozitivna reakcija uglavnom sličnog intenziteta u svim delovima kontrolnih uzoraka.

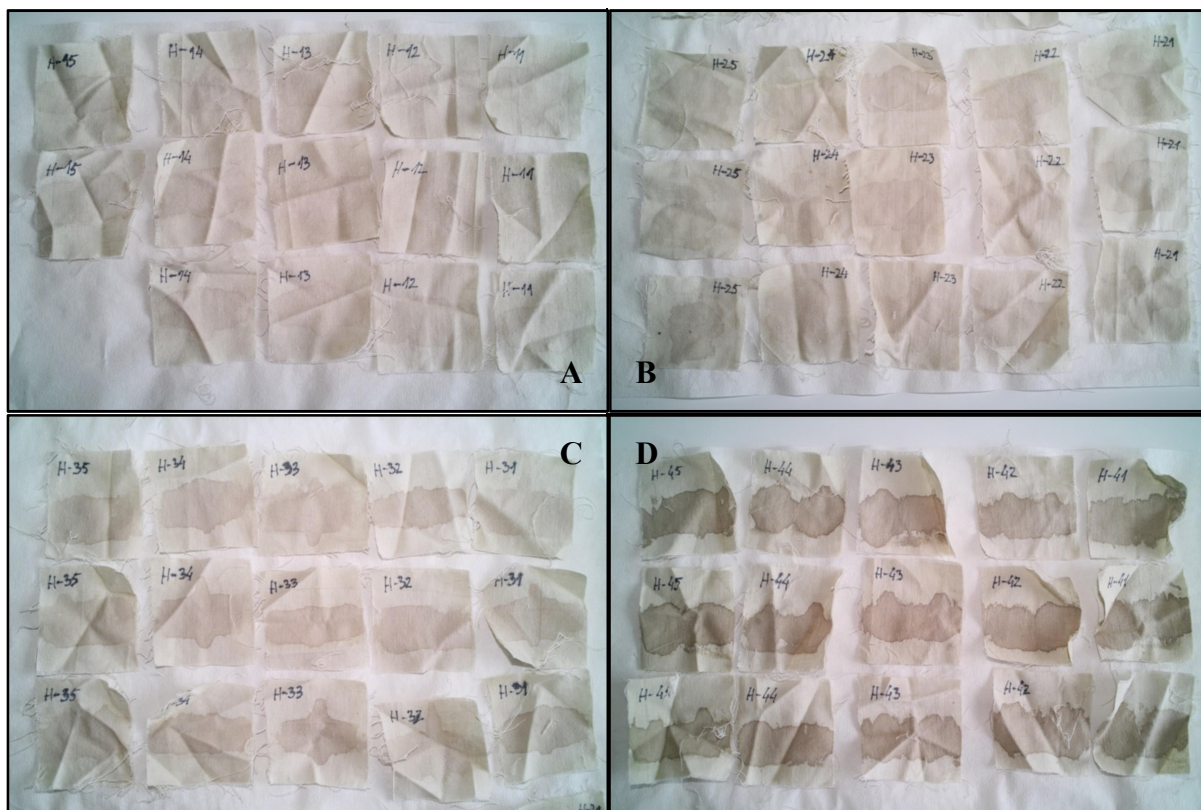
2. Grupa H- (mašinsko pranje na 95°C bez deterdženta Ariel)

Pregledom uzoraka iz grupe H- nakon pranja utvrđeno je da jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 95°C bez primene deterdženta ne može da ukloni vidljive tragove krvi (Slika 31). Ovakav rezultat je dobijen na svim replikama uzoraka i u svim eksperimentalnim podgrupama. Svi uzorci su dali jasno pozitivnu reakciju prilikom testiranja na prisustvo krvi sa oba korišćena testa u istraživanju.

Komparativnom vizuelnom analizom uzoraka utvrđeno je da uzorci iz svake naredne podgrupe pokazuje progresivnu tendenciju zaostajanja sve veće količine krvi na tkanini. Dakle, što je krvna mrlja starija (1, 3, 10 i 30 dana) to konvencionalno pranje u grupi H- slabije uklanja krv sa okrvavljene tkanine. Razlika u intenzitetu boje izmenjene krvne mrlje nakon pranja je slabije uočljiva između podgrupa starosti krvnih mrlja 1 i 3 dana, dok je upečatljivija kod starijih mrlja. Na svim uzorcima, tkanina u okolini originalne krvne mrlje pokazuje bledocrvenkasto difuzno prebojavanje, za koje je primenom hemijskih testova dokazano da predstavlja krv. Daljom analizom je uočeno da uzorci iz svih grupa pokazuju

slično i približno proporcionalno uklanjanje krvi iz svih delova krvnih mrlja, odnosno približno proporcionalno i iz obodnog i iz centralnog dela mrlje.

Dakle, jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 95°C bez primene deterdženta, bez obzira na starost krvne mrlje, ne može da ukloni vidljive tragove krvi, a pri tom uzrokuje difuzni sekundarni transfer krvi na sve delove tkanina.



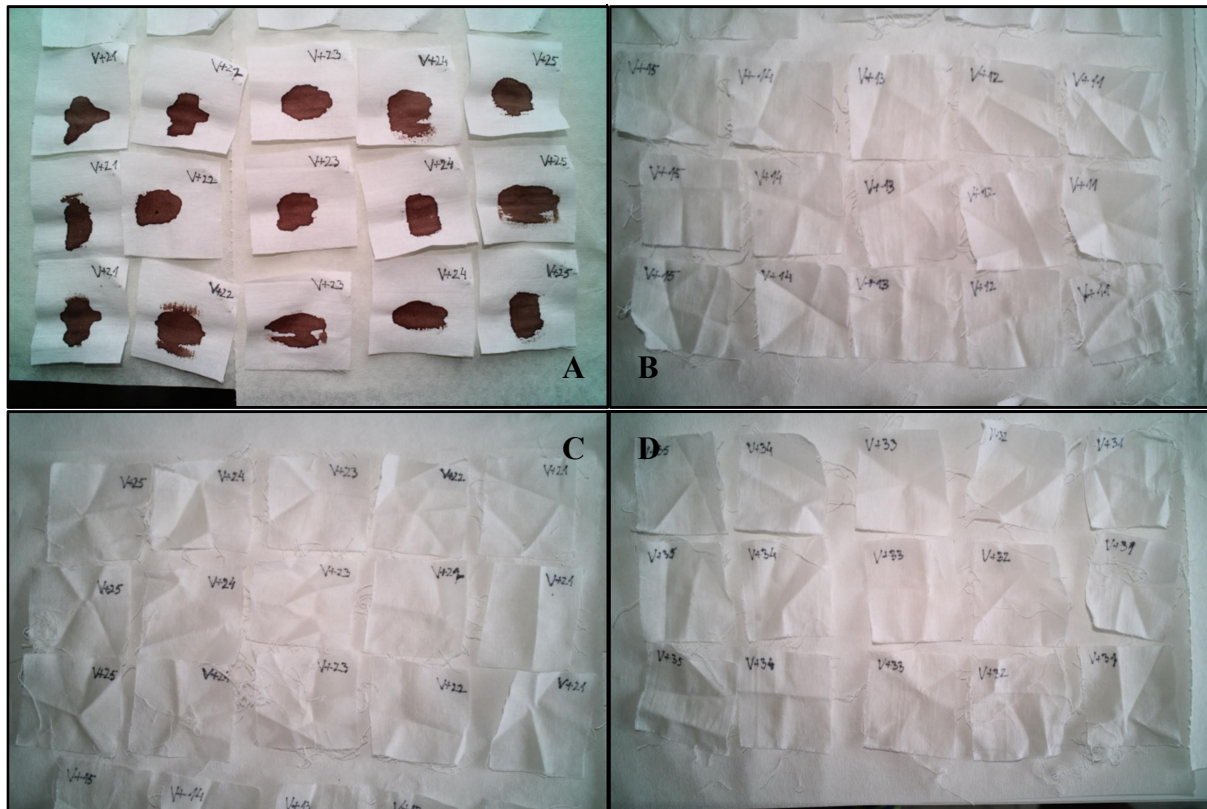
Slika 31. Uporedni prikaz uzoraka grupe H- nakon pranja. A - krvne mrlje starosti 1 dan; B - krvne mrlje starosti 3 dana; C - krvne mrlje starosti 10 dana; D - krvne mrlje starosti 30 dana.

Na negativnim kontrolnim uzorcima svih podgrupa H- grupe nakon pranja nisu registrovani vidljivi fokalni tragovi, ali je uočena difuzna bledocrvenkasta prebojenost uzoraka po tipu sekundarnog transfera krvi sa eksperimentalnih uzoraka na negativne kontrolne uzorke, dok je hemijskim testovima potvrđena difuzna pozitivna reakcija.

3. Grupa V+ (mašinsko pranje na 60°C uz primenu deterdženta Ariel)

Pregledom uzoraka iz podgrupe 1, 2 i 3 (starost krvnih mrlja 1, 3 i 10 dana od nanošenja krvi na tkaninu do pranja) nakon pranja utvrđeno je da jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 60°C uz upotrebu

deterdženta može da ukloni vidljive tragove krvi, ali ne i sve dokaze prethodno postojeće krvi na tkanini pre pranja (Slika 32). Dakle, svi uzorci su dali jasno pozitivnu reakciju prilikom testiranja na prisustvo krvi sa oba korišćena testa. Identičan rezultat je dobijen i u grupi H+. Dakle, konvencionalno pranje u veš mašini na 60 i 95°C, kod okrvavljenih pamučnih tkanina starosti mrlja 1, 3 i 10 dana, daje iste vizuelne rezultate pranje.



Slika 32. A - primer uzorka grupe V+ pre pranja; B, C i D - uzorci oprane okrvavljene tkanine V+ grupe, na kojima su u vreme pranja bile krvne mrlje starosti 1, 3 i 10 dana, a na kojima sada nema vidljivih krvnih mrlja.

S druge strane, pregledom uzorka iz podgrupe 4 (starost krvne mrlje 30 dana) nakon pranja utvrđeno je da jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 60°C uz upotrebu deterdženta može da ukloni skoro sve vidljive tragove krvi, osim segmentno očuvanih graničnih ivica krvnih mrlja koje su veoma bledocrvenkaste boje (Slika 33). Na svim analiziranim mrljama mestimično su uočena područja veoma bledocrvenkaste krvi, koja svojim izgledom i lokalizacijom odgovaraju obodnim ivicama prvobitnih originalnih mrlja. Dakle, jedno konvencionalno pranje na temperaturi vode od 60°C nije dovoljno da ukloni sve vidljive tragovi krvi sa okrvavljene pamučne tkanine sa krvnom mrljom starosti 30 dana.



Slika 33. Uporedni prikaz uzoraka grupe V+4_, odnosno uzoraka krvnih mrlja starosti 30 dana gde nakon pranja zaostaju blede konture originalne krvne mrlje.

Na negativnim kontrolnim uzorcima svih podgrupa V+ grupe nakon pranja nisu registrovani vidljivi tragovi sekundarnog transfera krvi sa eksperimentalnih uzoraka na negativne kontrolne uzorke, dok je hemijskim testovima dobijena difuzna pozitivna reakcija uglavnom sličnog intenziteta u svim delovima kontrolnih uzoraka.

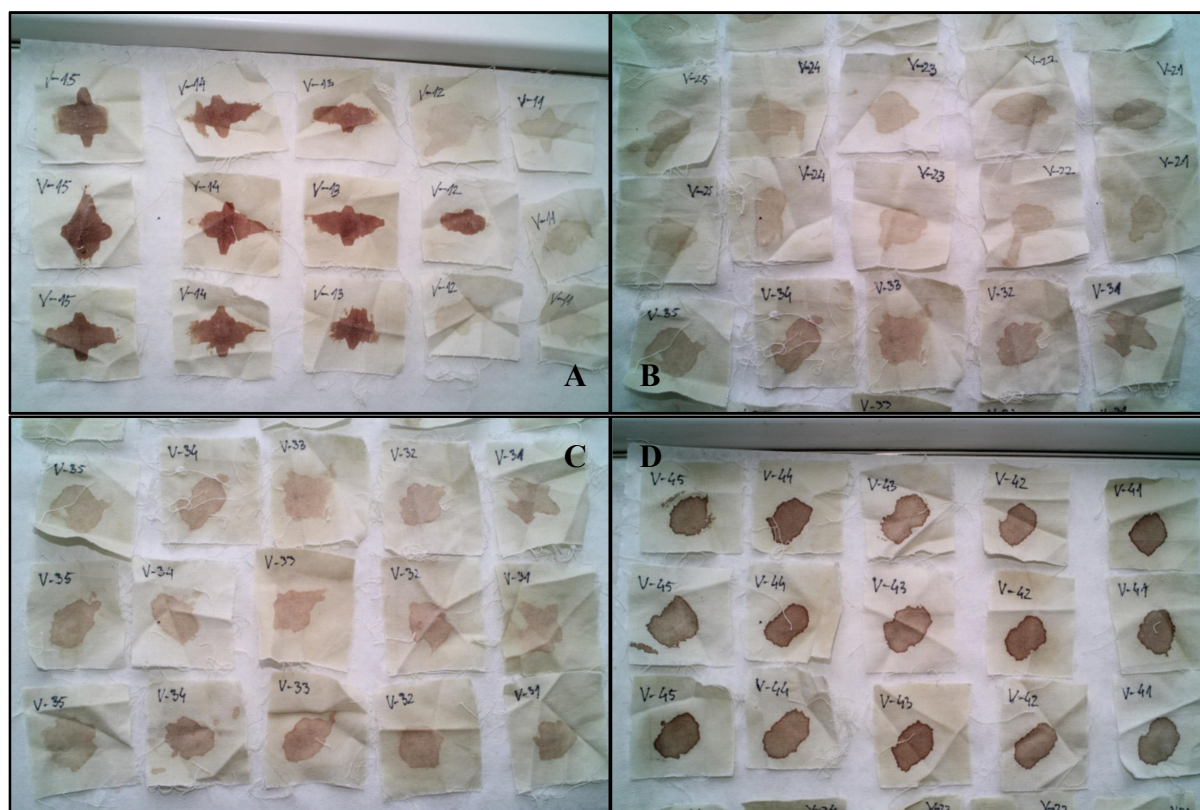
4. Grupa V- (mašinsko pranje na 60°C bez deterdženta Ariel)

Pregledom uzoraka iz grupe V- nakon pranja utvrđeno je da jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 60°C bez primene deterdženta ne može da ukloni vidljive tragove krvi (Slika 34). Ovakav rezultat je dobijen na svim replikama uzoraka i sa svim eksperimentalnim podgrupama. Svi uzorci su dali jasno pozitivnu reakciju prilikom testiranja na prisustvo krvi sa oba korišćena testa u istraživanju.

Komparativnom vizuelnom analizom uzoraka utvrđeno je da starije krvne mrlje na pamučnoj tkanini (starost mrlja 1, 3, 10 i 30 dana) pokazuju progresivnu tendenciju zaostajanja sve veće količine krvi na tkanini nakon pranja u ovoj grupi. Dakle, što je krvna mrlja starija to konvencionalno pranje u grupi V- vizuelno slabije uklanja krv sa okrvavljene tkanine. Razlika u intenzitetu boje izmenjene krvne mrlje nakon pranja je slabije uočljiva između podgrupa starosti krvnih mrlja 1 i 3 dana, dok je upečatljivija kod starijih mrlja i naročito kod mrlja starih 30 dana. Na svim uzorcima, tkanina u okolini originalne krvne mrlje pokazuje bledocrvenkasto difuzno prebojavanje koje odgovara sekundarnom transferu krvi nastalom tokom pranja, a za koje je primenom hemijskih testova i dokazano da predstavlja krv. Daljom analizom je uočeno da uzorci iz svih grupa pokazuju slično i približno

proporcionalno uklanjanje krvi iz svih delova krvnih mrlja, odnosno približno proporcionalno i iz obodnog i iz centralnog dela mrlje.

Dakle, jedno konvencionalno mašinsko pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 60°C bez primene deterdženta, bez obzira na starost krvne mrlje, ne može da ukloni vidljive tragove krvi, a pri tom uzrokuje difuzni sekundarni transfer krvi na sve delove tkanine.



Slika 34. Uporedni prikaz uzoraka grupe V- nakon pranja. A - krvne mrlje starosti 1 dan; B - krvne mrlje starosti 3 dana; C - krvne mrlje starosti 10 dana; D - krvne mrlje starosti 30 dana.

Na negativnim kontrolnim uzorcima svih podgrupa V- grupe nakon pranja nisu registrovani vidljivi fokalni tragovi, ali je uočena difuzna bledo crvenkasta prebojenost uzoraka po tipu sekundarnog transfera krvi sa eksperimentalnih uzoraka na negativne kontrolne uzorke, dok je hemijskim testovima potvrđena difuzna pozitivna reakcija sličnog intenziteta u skoro svim delovima pojedinačnih uzoraka.

5. Grupa P+ (simulirano ručno pranje na 30°C uz primenu deterdženta Ariel)

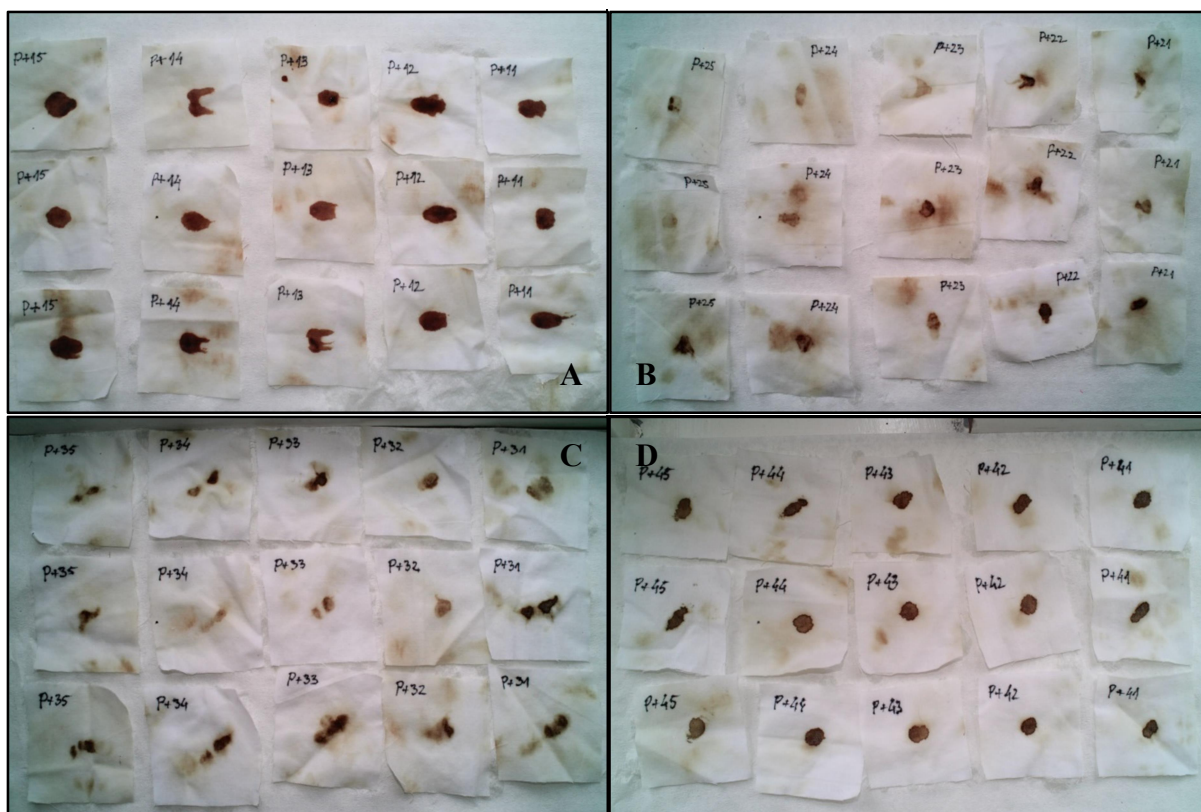
Pregledom uzoraka iz grupe P+ nakon pranja utvrđeno je da jedno mašinski simulirano prosečno ručno pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 30°C uz upotrebu deterdženta ne može da ukloni tragove krvi (Slika 35). Svi uzorci su dali jasno pozitivnu reakciju prilikom testiranja na prisustvo krvi sa oba korišćena testa u istraživanju.

Komparativnom vizuelnom analizom uzoraka utvrđeno je da starije krvne mrlje na pamučnoj tkanini pokazuje progresivnu tendenciju zaostajanja sve veće količine krvi na tkanini nakon pranja u ovoj grupi. Dakle, što je krvna mrlja starija to konvencionalno pranje u grupi P+ slabije uklanja krv sa okrvavljene tkanine.

Na svim uzorcima, tkanina u okolini originalne krvne mrlje pokazuje neznatno bledocrvenkasto difuzno prebojavanje koje odgovara sekundarnom transferu krvi nastalom tokom pranja, a za koje je primenom hemijskih testova i dokazano da predstavlja krv. Međutim, na svim uzorcima je uočen naglašeni fokalni sekundarni transfer krvi, koji je znatno bleđi od originalne krvne mrlje i ne pokazuje jasne granice već razlivanje i bleđenje od centralnog područja transfera ka njegovoj periferiji. Zapaženo je da je ovaj transfer naročito rezultat bliskog kontakta okrvavljenog i neokrvavljenog dela tkanine u trenutku razdvajanja uzoraka po završenom ciklusu pranja. Intenzivniji sekundarni fokalni transfer zapažen je u podgrupama 1 i 2 (starost mrlja 1 i 3 dana).

Daljom analizom je uočeno da uzorci iz prve tri podgrupe (starost mrlje 1, 3 i 10 dana) pokazuje približno jednako i difuzno uklanjanje krvi iz svih delova originalne mrlje, dok uzorci starosti 30 dana pokazuju intenzivnije uklanjanje krvi iz centralnog dela mrlje. Kod uzoraka starosti 30 dana krv iz obodnog-graničnog dela mrlje se slabije uklanjala pranjem u poređenju sa centralnim delom mrlje, tako da nakon pranja zaostaje naglašena kontura originalne mrlje.

Dakle, jedno simulirano prosečno ručno pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 30°C uz primenu deterdženta, bez obzira na starost krvne mrlje, ne može da ukloni vidljive tragove krvi, a pri tom uzrokuje značajan difuzni i fokalni sekundarni transfer krvi na sve delove tkanine.



Slika 35. Uporedni prikaz uzoraka grupe P+ nakon pranja. A - krvne mrlje starosti 1 dan; B - krvne mrlje starosti 3 dana; C - krvne mrlje starosti 10 dana; D - krvne mrlje starosti 30 dana.

Na negativnim kontrolnim uzorcima svih podgrupa P+ grupe nakon pranja registrovani su vidljivi fokalni tragovi i difuzna bledocrvenkasta prebojenost uzoraka, a što odgovara naglašenom sekundarnom transferu krvi sa eksperimentalnih uzoraka na negativne kontrolne uzorke (Slika 36), dok je hemijskim testovima potvrđena difuzna pozitivna reakcija različitog intenziteta u različitim delovima pojedinačnih uzoraka. Na svim kontrolnim uzorcima je uočen naglašeni fokalni sekundarni transfer krvi, koji je znatno bleđi od originalne krvne mrlje i ne pokazuje jasne granice već razlivanje i postepeno bleđi od centralnog područja transfera ka njegovoj periferiji, te područje samog transfera nema jasne konture već je više mrljastog izgleda i nejasno ograničeno.



Slika 36. Primer kontrolnog uzorka P+ grupe.

6. Grupa P- (simulirano ručno pranje na 30°C bez deterdženta Ariel)

Pregledom uzoraka iz grupe P- nakon pranja utvrđeno je da jedno mašinski simulirano prosečno ručno pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 30°C bez upotrebe deterdženta ne može da ukloni tragove krvi (Slika 37). Svi uzorci su dali jasno pozitivnu reakciju prilikom testiranja na prisustvo krvi sa oba korišćena testa.

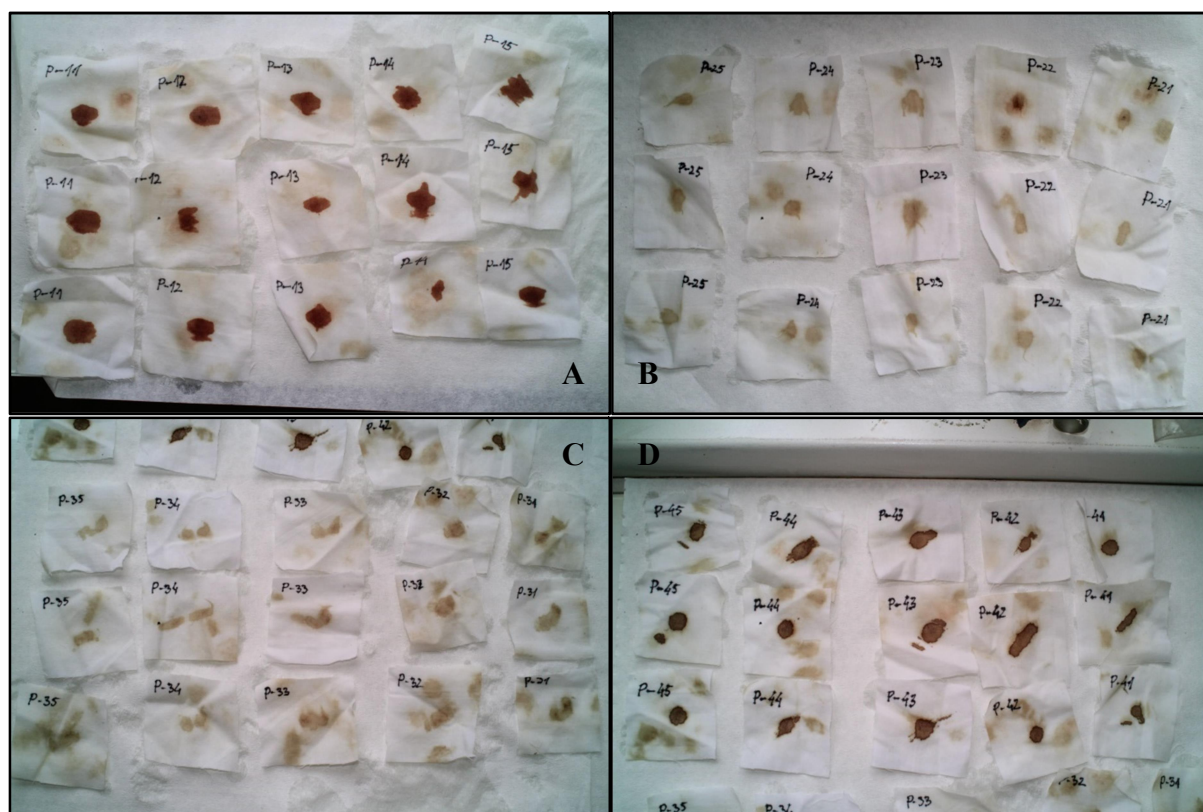
Komparativnom vizuelnom analizom uzoraka utvrđeno je da starije krvne mrlje na pamučnoj tkanini pokazuju progresivnu tendenciju zaostajanja sve veće količine krvi na tkanini nakon pranja u ovoj grupi. Dakle, što je krvna mrlja starija to konvencionalno pranje u grupi P- slabije uklanja krv sa okrvavljene tkanine. Međutim, u svim uzorcima iz podgrupe 1 (starost krvne mrlje 1 dan) zapaženo je zaostajanje vizuelno neočekivano velike količine krvi u primarnim krvnim mrljama nakon pranja, koje je veće u poređenju sa svim ostalim podgrupama.

Na svim uzorcima, tkanina u okolini originalne krvne mrlje pokazuje neznatno bledocrvenkasto difuzno prebojavanje koje odgovara sekundarnom transferu krvi nastalom tokom pranja, a za koje je primenom hemijskih testova i dokazano da predstavlja krv. Međutim, na svim uzorcima je uočen naglašeni fokalni sekundarni transfer krvi, koji je znatno bleđi od originalne krvne mrlje i ne pokazuje jasne granice već razlivanje i bleđenje od centralnog područja transfera ka njegovoj periferiji, odnosno područje sekundarnog transfera je više mrljastog izgleda.

Daljom analizom je uočeno da uzorci iz prve tri podgrupe (starost mrlje 1, 3 i 10 dana) pokazuju približno jednako i difuzno uklanjanje krvi iz svih delova originalne mrlje,

dok uzorci starosti 30 dana pokazuju intenzivnije uklanjanje krvi iz centralnog dela mrlje. Kod uzoraka starosti 30 dana krv iz obodnog-graničnog dela mrlje se slabije uklanja pranjem u poređenju sa centralnim delom mrlje, tako da nakon pranja zaostaje naglašena kontura originalne mrlje.

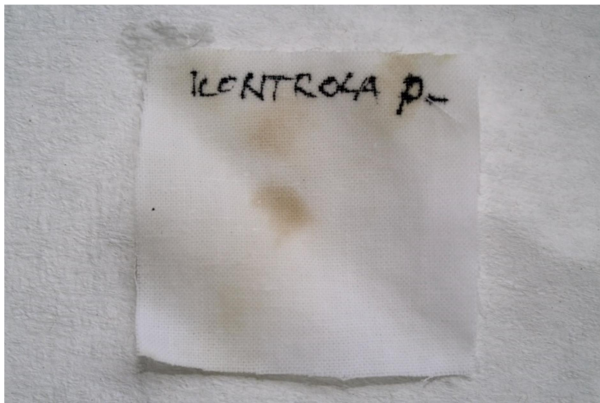
Dakle, jedno simulirano prosečno ručno pranje okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 30°C bez primene deterdženta, bez obzira na starost krvne mrlje, ne može da ukloni vidljive tragove krvi, a pri tom uzrokuje značajan difuzni i fokalni sekundarni transfer krvi na sve delove tkanina.



Slika 37. Uporedni prikaz uzoraka grupe P- nakon pranja. A - krvne mrlje starosti 1 dan; B - krvne mrlje starosti 3 dana; C - krvne mrlje starosti 10 dana; D - krvne mrlje starosti 30 dana.

Na negativnim kontrolnim uzorcima svih podgrupa P- grupe nakon pranja registrovani su vidljivi fokalni tragovi i difuzna bledocrvenkasta prebojenost uzoraka, a što odgovara naglašenom sekundarnom transferu krvi sa eksperimentalnih uzoraka na negativne kontrolne uzorke (Slika 38), dok je hemijskim testovima potvrđena difuzna pozitivna reakcija različitog intenziteta u različitim delovima pojedinačnih uzoraka. Na svim kontrolnim uzorcima je uočen naglašeni fokalni sekundarni transfer krvi, koji je znatno bleđi od originalne krvne mrlje i ne pokazuje jasne granice već razlivanje i bleđenje od centralnog područja transfera ka

njegovoj periferiji, tako da područje samog transfera nema jasne konture već je više mrljastog izgleda i nejasno ograničeno.



Slika 38. Primer kontrolnog uzorka P- grupe.

UTICAJ STAROSTI KRVNE MRLJE, NAČINA PRANJA OKRVAVLJENE TKANINE I PROTOKA VREMENA NAKON PRANJA NA KONCENTRACIJU I DEGRADACIJU DNK MATERIJALA

Uticaj temperature vode pranja okrvavljene tkanine na koncentraciju DNK

Analizirajući vrednosti koncentracije DNK u odnosu na temperaturu vode pranja okrvavljene pamučne tkanine može se videti da su najveće vrednosti koncentracije DNK nađene u uzorcima koji su oprani na temperaturi vode od 60°C, a najmanje na uzorcima koji su oprani na temperaturi vode od 30°C (Tabela 5). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji DNK u odnosu na temperaturu vode pranja tkanine ($p=0,451$).

Tabela 5. Koncentracija DNK u odnosu na temperaturu vode pranja okrvavljene tkanine

	95°C	60°C	30°C	p-vrednost
Broj uzoraka	106	113	101	0,451 ¹
AS±SD	0,25±0,41	0,34±0,42	0,22±0,24	
Min-Max	0,00-2,51	0,00-1,70	0,02-1,32	

¹ Kruskal-Wallis test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija

Uticaj temperature vode pranja okrvavljene tkanine na indeks degradacije DNK

Najveći indeks degradacije DNK je izmeren pri pranju okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 60°C, zatim pri pranju na temperaturi vode od 95°C, a najmanji indeks degradacije DNK je izmeren pri pranju na 30°C (Tabela 6). Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u indeksu degradacije DNK u odnosu na temperaturu vode pranja tkanine. Post hoc analiza je pokazala da statistički značajna razlika postoji između grupa uzoraka opranih na 95°C i 30°C ($p<0,001$), kao i grupa uzoraka opranih na 60°C i 30°C ($p=0,001$).

Tabela 6. Indeks degradacije DNK u odnosu na temperaturu vode pranja okrvavljene tkanine

	95°C	60°C	30°C	p-vrednost
Broj uzoraka	105	112	101	<0,001 (95 i 60 vs pranje na 30 stepeni) ¹
AS±SD	1,10±0,44 ¹	1,14±0,60 ¹	0,84±0,25	
Min-Max	0,48-2,31	0,38-3,82	0,34-1,52	

¹ Kruskal-Wallis test, ^a $p<0,001$ vs pranje na 30 stepeni.

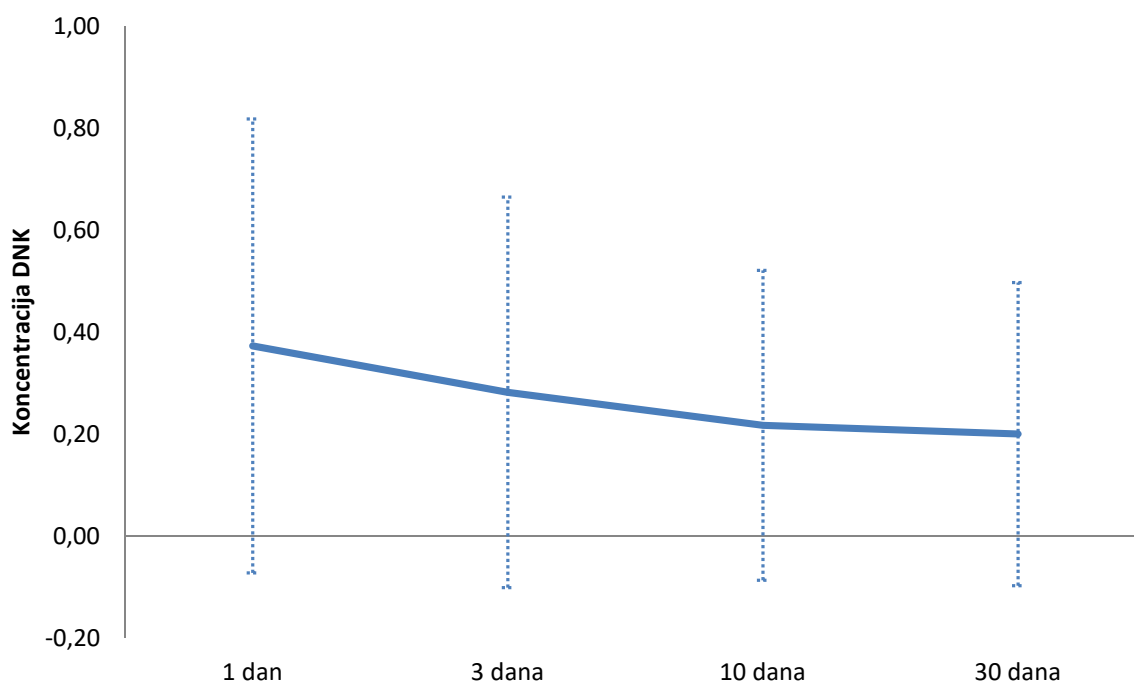
Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi do pranja

Najveća koncentracija DNK je utvrđena kod uzoraka koji su se sušili jedan dan (vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja), a najmanja kod uzoraka koji su se najduže sušili (Tabela 7 i Grafikon 1). Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji DNK u odnosu na vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja ($p=0,007$). Post hoc analiza je pokazala da statistički značajna razlika postoji između sledećih grupa: 1 dan i 10 dana ($p=0,025$), 1 dan i 30 dana ($p=0,002$), kao i 3 dana i 30 dana ($p=0,017$).

Tabela 7. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi do pranja

	1 dan	3 dana	10 dana	30 dana	p-vrednost
Broj uzoraka	87	76	75	82	0,007 ¹
AS±SD	0,37±0,44	0,28±0,38	0,22±0,31	0,20±0,30	
Min-Max	0,00-1,70	0,10-2,51	0,01-1,98	0,00-1,20	

¹ Kruskal-Wallis test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 1. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi do pranja

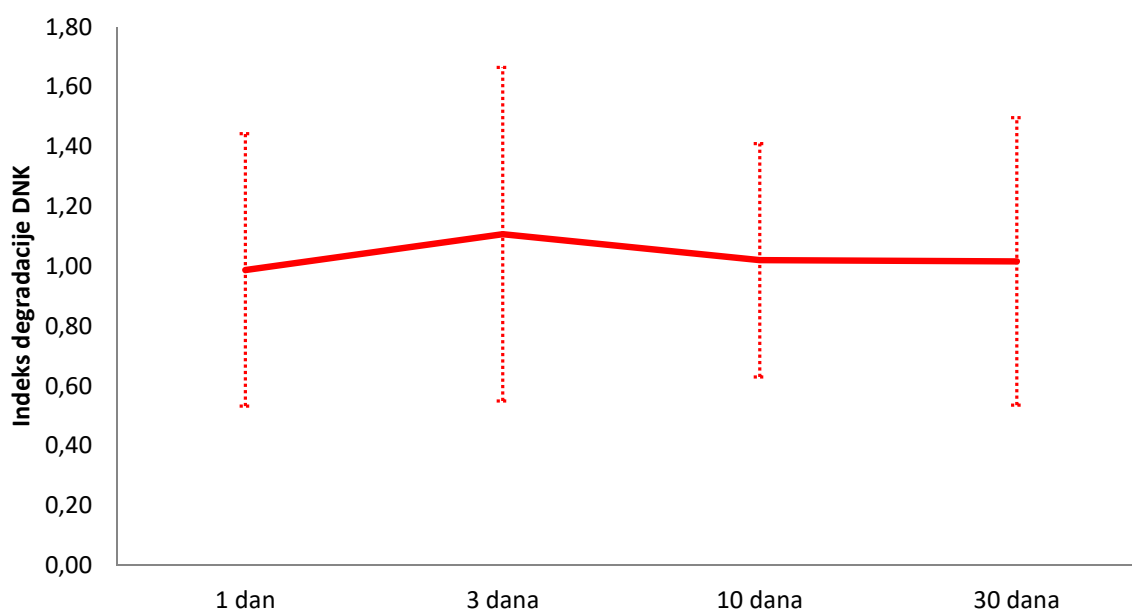
Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi do pranja

Najveći indeks degradacije DNK je izmeren u uzorcima krvnih mrlja koji su prošli proces sušenja u trajanju od tri dana (vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja), a najmanji indeks degradacije je izmeren u uzorcima koji su prošli proces sušenja u trajanju od jednog dana (Tabela 8 i Grafikon 2). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u indeksu degradacije u odnosu na vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja.

Tabela 8. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi do pranja

	1 dan	3 dana	10 dana	30 dana	p-vrednost
Broj uzoraka	87	76	75	82	0,413 ¹
AS±SD	0,99±0,46	1,11±0,56	1,02±0,39	1,02±0,48	
Min-Max	0,34-2,49	0,36-3,82	0,47-2,36	0,49-3,17	

¹ Kruskal-Wallis test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 2. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja

Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do analize uzorka

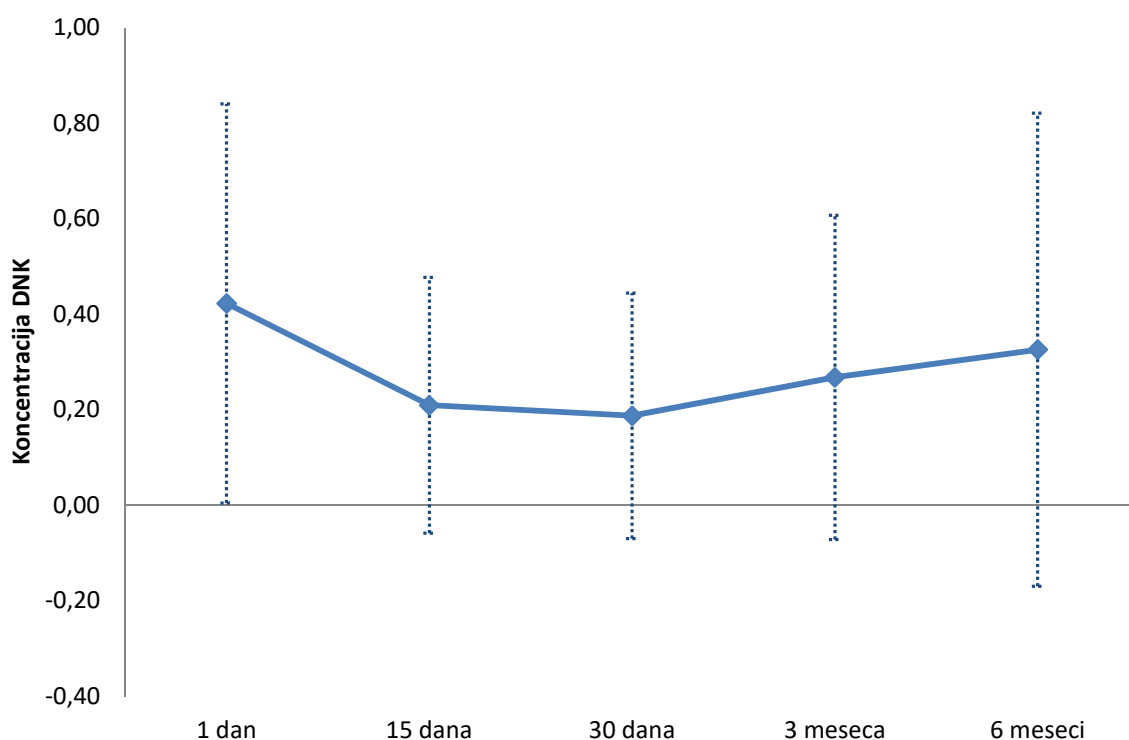
Koncentracija DNK je najveća kod uzoraka koji su analizirani jedan dan nakon pranja okrvavljene tkanine, a najmanja je kod uzoraka koji su analizirani 30 dana nakon pranja

(Tabela 9 i Grafikon 3). Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima koncentracije DNK u odnosu na vreme proteklo od pranja okrvavljene tkanine do početka analize uzoraka ($p=0,001$). Post hoc analiza je pokazala da statistički značajna razlika u vrednostima koncentracije DNK postoji između sledećih grupa: 1 dan i 15 dana ($p=0,001$), 1 dan i 30 dana, 1 dan i 3 meseca ($p=0,015$), 1 dan i 6 meseci ($p=0,009$), kao i 30 dana i 3 meseca ($p=0,034$).

Tabela 9. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do analize uzorka

	1 dan	15 dana	30 dana	3 meseca	6 meseci	p-vrednost
Broj uzoraka	42	68	71	67	72	0,001 ¹
AS±SD	0,42±0,42	0,21±0,27	0,19±0,26	0,27±0,34	0,32±0,50	
Min-Max	0,04-1,70	0,01-1,20	0,00-1,20	0,00-1,64	0,01-2,51	

¹ Kruskal-Wallis test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 3. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do analize uzorka

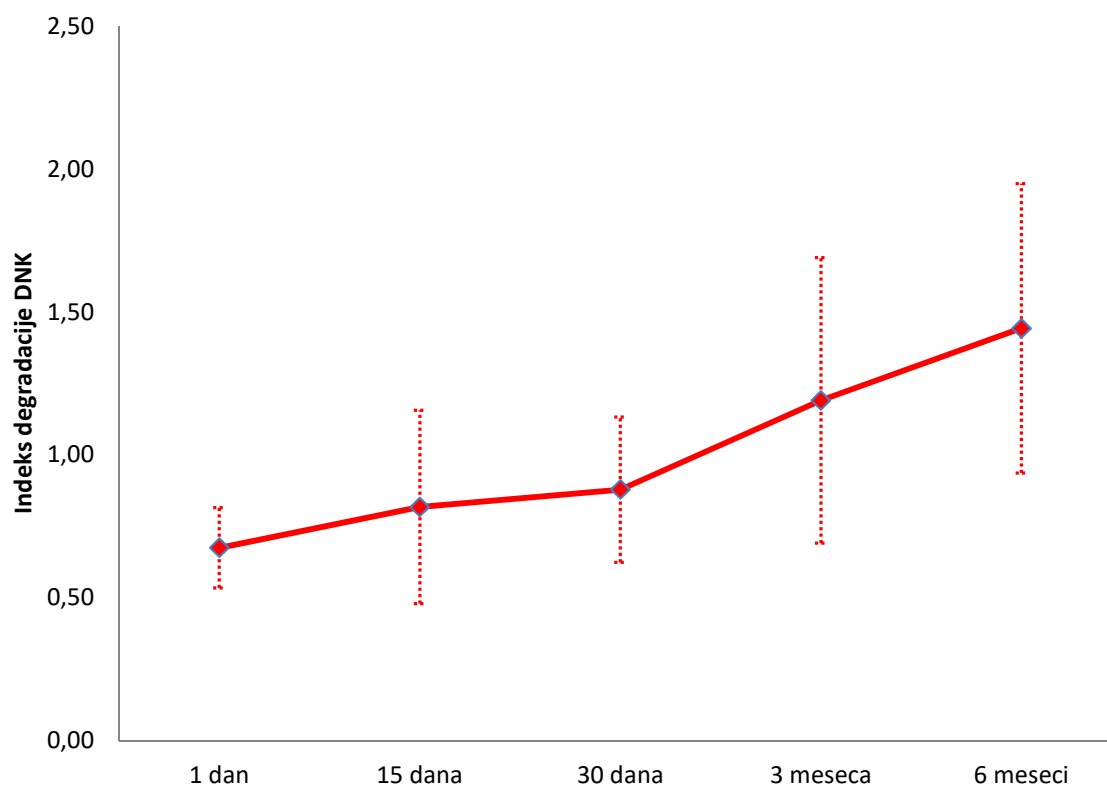
Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do početka analize

Najveći indeks degradacije DNK je izmeren u grupi gde je proteklo šest meseci od pranja okrvavljene tkanine do početka analize, a najmanji indeks degradacije DNK je zabeležen u grupi koja je analizirana jedan dan nakon pranja okrvavljene tkanine (Tabela 10 i Grafikon 4). Utvrđeno je da indeks degradacije DNK statistički značajno raste kroz vreme koje je proteklo od pranja do početka analize uzoraka ($p < 0,001$). Post hoc analiza je pokazala da između svih mernih tačaka u vremenu međusobno postoji statistički značajna razlika.

Tabela 10. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do analize

	1 dan	15 dana	30 dana	3 meseca	6 meseci	p-vrednost
Broj uzoraka	42	68	70	66	72	<0,001 ¹
AS±SD	0,67±0,14	0,82±0,34	0,88±0,25	1,19±0,50	1,44±0,51	
Min-Max	0,48-1,07	0,34-2,12	0,38-1,69	0,66-3,82	0,78-3,17	

¹ Kruskal-Wallis test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 4. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja do početka analize

Uticaj deterdženta na koncentraciju i degradaciju DNK

U eksperimentalnim grupama kada je pri pranju okrvavljene pamučne tkanine korišćen prašak, nezavisno od proteklog vremena od nanošenja krvi na tkaninu do pranja, prosečna vrednosti koncentracije DNK je iznosila $0,11 \pm 0,14$, a u grupama gde deterdžent nije korišćen pri pranju prosečna vrednost koncentracije DNK je iznosila $0,43 \pm 0,45$. U eksperimentalnim grupama kada je pri pranju okrvavljene tkanine korišćen deterdžent prosečna vrednosti indeksa degradacije DNK je iznosila $1,17 \pm 0,58$, a u grupama gde nije korišćen deterdžent pri pranju prosečna vrednost indeksa degradacije DNK je iznosila $0,89 \pm 0,29$. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima koncentracija DNK ($p < 0,001$) i indeksima degradacije DNK ($p < 0,001$) u odnosu na primenu deterdženta pri pranju okrvavljene pamučne tkanine.

Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja

U eksperimentalnim grupama gde je pranje okrvavljene tkanine vršeno na temperaturi vode od 95°C utvrđeno je da u podgrupi uzoraka krvnih mrlja starih tri dana (vreme od nanošenja krvi na tkaninu do njenog pranja) postoji veća vrednosti koncentracije DNK u odnosu na podgrupu uzoraka krvnih mrlja starih jedan dan, a zatim se u narednim mernim podgrupama krvnih mrlja starih 10 i 30 dana progresivno registruju sve manje vrednosti koncentracije DNK (Tabela 11 i Grafikon 5).

U eksperimentalnim grupama gde je pranje okrvavljene tkanine vršeno na temperaturi vode od 60°C utvrđeno je da u podgrupi uzoraka krvnih mrlja starih tri dana (vreme od nanošenja krvi na tkaninu do njenog pranja) postoji veća vrednosti koncentracije DNK u odnosu na podgrupu uzoraka krvnih mrlja starih jedan dan, a zatim se u narednim mernim podgrupama krvnih mrlja starih 10 i 30 dana progresivno registruju sve manje vrednosti koncentracije DNK.

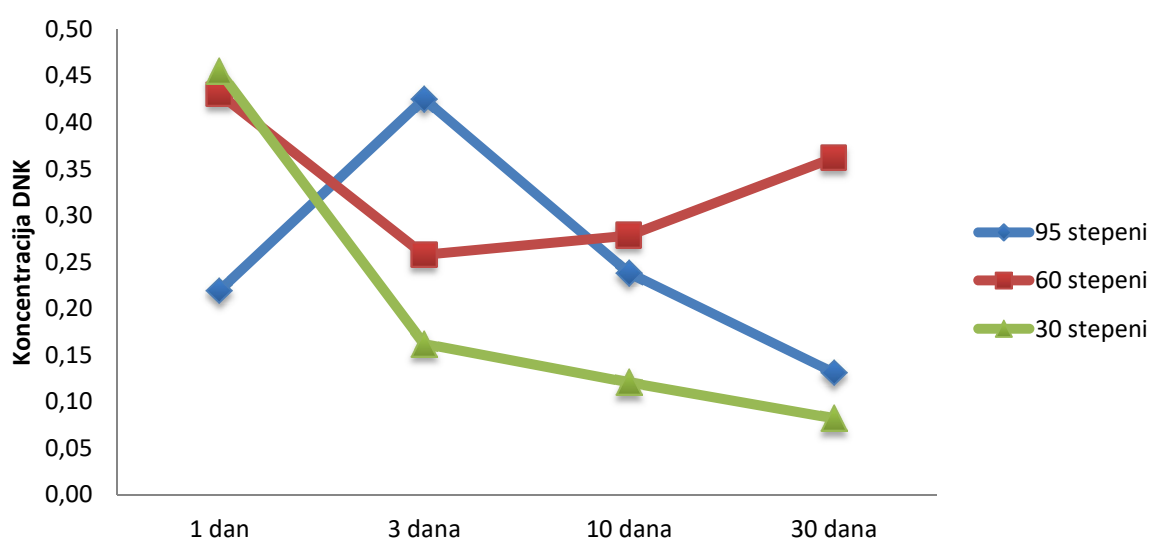
U eksperimentalnim grupama gde je pranje okrvavljene tkanine vršeno na temperaturi vode od 30°C utvrđeno je da između podgrupa uzoraka krvnih mrlja starih 1 i 30 dana (vreme od nanošenja krvi na tkaninu do njenog pranja) postoji progresivni niz sve manjih vrednosti koncentracije DNK.

Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima koncentracije DNK pri pranju na temperaturi vode od 95°C u odnosu na vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja uzorka ($p=0,231$), kao ni pri pranju na temperaturi vode od 60°C ($p=0,998$). Statistički značajna razlika u vrednostima koncentracije DNK u odnosu na vreme proteklo od nanošenja krvi do pranja je utvrđena pri pranju na temperaturi vode od 30°C ($p<0,001$). Post hoc analiza je pokazala da pri pranju na 30°C postoji statistički značajna razlika između sledećih grupa: 1 dan i 3 dana ($p<0,001$), 1 dan i 10 dana ($p<0,001$), 1 dan i 30 dana ($p<0,001$), odnosno između grupa 3 dana i 30 dana ($p=0,021$).

Tabela 11. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja

	1 dan	3 dana	10 dana	30 dana	p-vrednost ¹
95°C	0.22±0.37	0.43±0.58	0.24±0.41	0.13±0.12	0,231
60°C	0.43±0.59	0.26±0.25	0.28±0.27	0.36±0.43	0,998
30°C	0.46±0.29	0.16±0.15	0.12±0.10	0.08±0.05	<0,001

¹ Kruskal-Wallis test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 5. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja

Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja

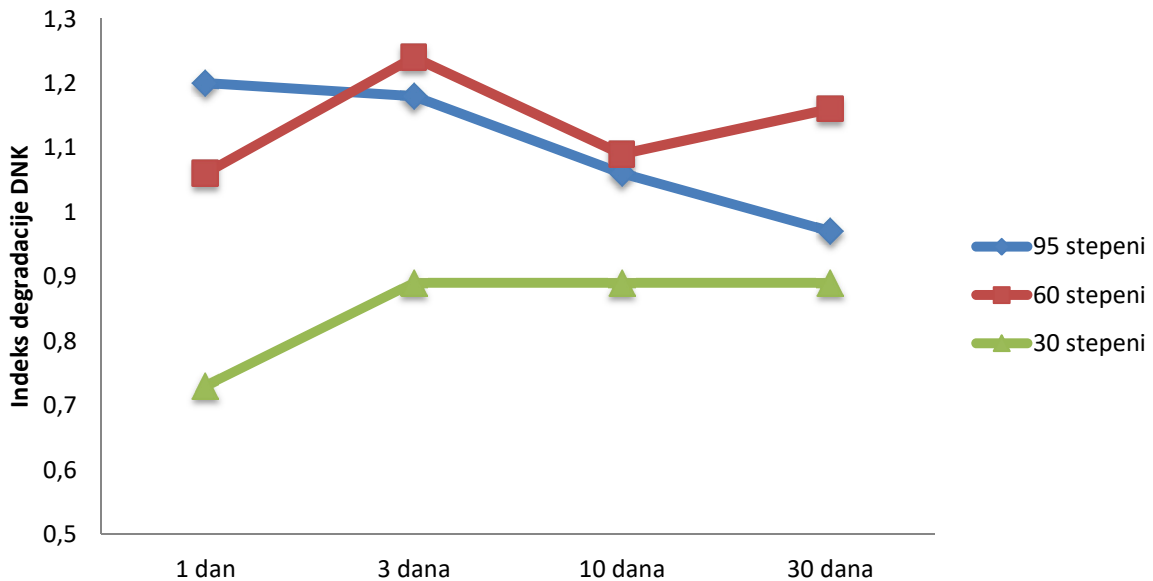
Kod uzoraka koji su prani na temperaturi vode od 95°C najveće vrednosti indeksa degradacije DNK registrovane su u grupi krvnih mrlja starih jedan dan (vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja) i na dalje se u grupama progresivno starijih krvnih mrlja registruju sve niže vrednosti indeksa degradacije, tako da je najmanja vrednost indeksa degradacije DNK registrovana u podgrupi uzoraka koji su oprani 30 dana nakon nanošenja krvi na tkaninu (Tabela 12 i Grafikon 6). Kod uzorka koji su prani na temperaturi vode od 60°C naizmenično vrednosti indeksa degradacije DNK rastu i padaju na svakoj vremenskoj tački merenja. Kod uzoraka koji su prani na temperaturi vode od 30°C najmanji indeks degradacije DNK je u grupi krvnih mrlja starih jedan dan od nanošenja krvi na tkaninu do pranja, a u ostale tri vremenske podgrupe vrednosti indeksa degradacije DNK su gotovo identične.

Indeks degradacije DNK se statistički značajno razlikuje u odnosu na vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja kod uzoraka koji su prani na temperaturi vode od 95°C ($p=0,037$) i kod uzorka koji su prani na temperaturi vode od 30°C ($p=0,044$). Post hoc analiza je pokazala da statistički značajna razlika postoji između sledećih merenja kod uzoraka koji su prani na temperaturi vode od 95°C: 1 dan i 30 dana ($p=0,007$), kao i 3 dana i 30 dana ($p=0,020$), a kod uzorka pranih na 30°C: 1 dan i 3 dan ($p=0,023$), kao i 1 dan i 30 dana ($p=0,011$).

Tabela 12. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja

	1 dan	3 dana	10 dana	30 dana	p-vrednost ¹
95°C	1.2±0.39	1.18±0.45	1.06±0.38	0.97±0.51	0,037
60°C	1.06±0.56	1.24±0.76	1.09±0.46	1.16±0.58	0,716
30°C	0.73±0.22	0.89±0.27	0.89±0.28	0.89±0.21	0,044

¹ Kruskal-Wallis test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 6. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i u odnosu na temperaturu vode pranja

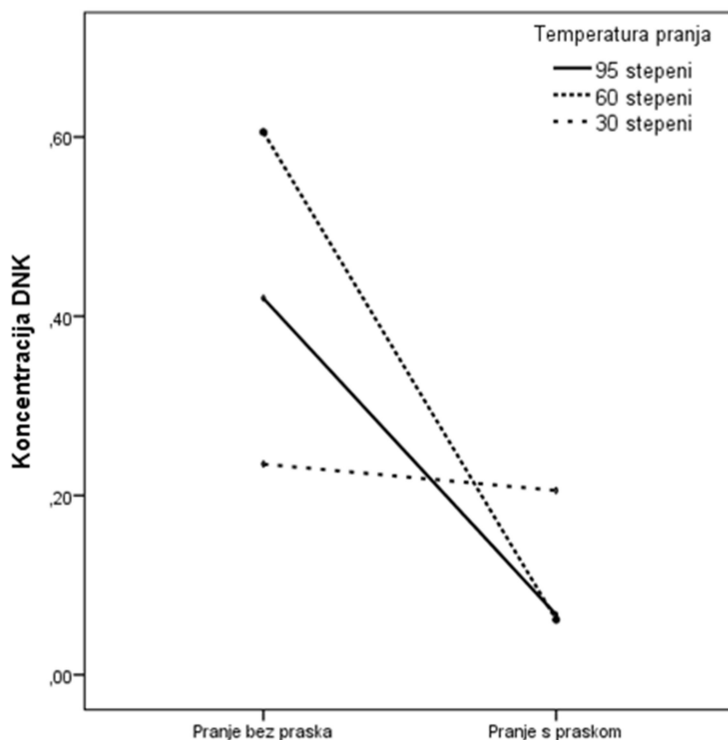
Koncentracija DNK u odnosu na temperaturu vode pranja okrvavljene tkanine i u odnosu na primenu deterdženta za pranje

Pojedinačno gledano, najmanje utvrđene vrednosti koncentracije DNK registrovane su u grupi uzoraka opranih sa deterdžentom na temperaturi vode od 60°C, a najveće vrednosti su registrovane u grupi uzoraka opranih bez deterdženta na temperaturi vode od 60°C (Tabela 13 i Grafikon 7). Utvrđeno je da je koncentracija DNK statistički značajno manja kada se primenjuje deterdžent na temperaturi vode od 95°C ($p < 0,001$), kao i na temperaturi vode od 60°C ($p < 0,001$).

Tabela 13. Koncentracija DNK u odnosu na temperaturu vode pranja okrvavljene tkanine i u odnosu na primenu deterdženta za pranje

	Pranje okrvavljene tkanine		p-vrednost ¹
	Sa deterdžentom	Bez deterdženta	
95 stepeni	0,07±0,07	0,42±0,51	<0,001
60 stepeni	0,06±0,08	0,61±0,44	<0,001
30 stepeni	0,21±0,20	0,24±0,28	0,721

¹ Mann-Whitney test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 7. Koncentracija DNK u odnosu na primenu deterdženta i temperaturu vode pranja

Indeks degradacije DNK u odnosu na temperaturu vode pranja i u odnosu na korišćenje deterdženta za pranje

Gledano pojedinačno, najveći indeks degradacije DNK registrovan je u grupi uzoraka koji su oprani na temperaturi vode od 60°C uz primenu deterdženta, a najmanji u grupi uzoraka koji su oprani na temperaturi vode od 30°C bez upotrebe deterdženta (Tabela 14).

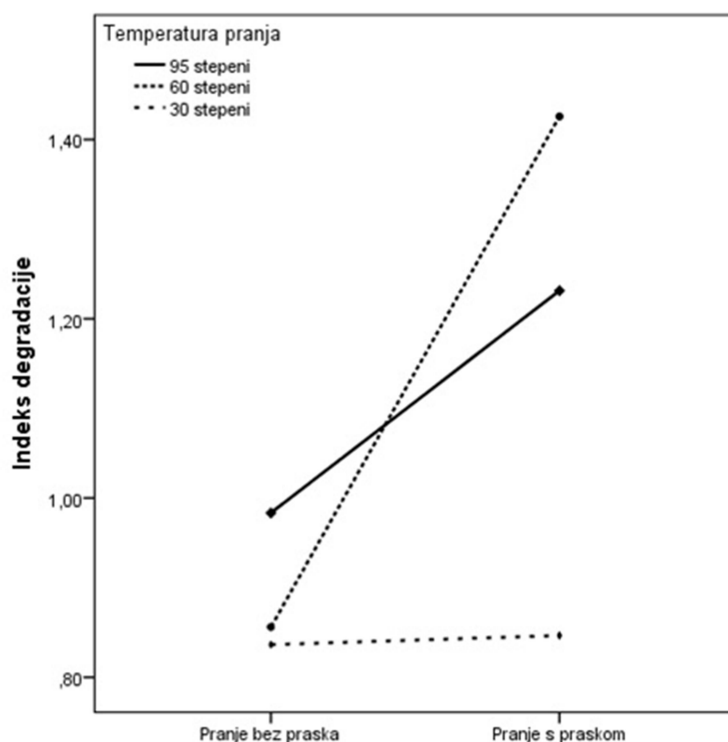
Uzorci oprani na temperaturi vode od 95°C uz primenu deterdženta imaju statistički značajno veće vrednosti indeksa degradacije DNK u odnosu na uzorke oprane na 95°C bez upotrebe deterdženta ($p=0,012$). Uzorci oprani na temperaturi vode od 60°C uz primenu deterdženta imaju statistički značajno veće vrednosti indeksa degradacije DNK u odnosu na uzorke oprane na 60°C bez primene deterdženta ($p<0,001$). Pri pranju na temperaturi vode od 30 stepeni nema statistički značajne razlike u indeksu degradacije DNK u odnosu na primenu deterdženta ($p=0,760$).

Tabela 14. Indeks degradacije DNK u odnosu na temperaturu vode pranja i u odnosu na korišćenje deterdženta za pranje

	Pranje okrvavljene tkanine		p ¹
	S deterdžentom	Bez deterdženta	
95°C	1,23±0,49	0,98±0,34	0,012
60°C	1,42±0,71	0,86±0,24	<0,001
30°C	0,85±0,25	0,84±0,26	0,760

¹ Mann-Whitney test, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija

Analiza varijanse je pokazala da postoji statistički značajna razlika u indeksu degradacije DNK i u odnosu na temperaturu pranja ($F=11,886$, $p<0,001$, partial $N= 0,071$) i u odnosu na primenu deterdženta ($F=19,957$, $p<0,001$, partial $N= 0,060$). Post hoc analiza je pokazala da statistički značajna razlika postoji između pranja na 95°C i pranja na 30°C ($p<0,001$), kao i između pranja na 60°C i pranja na 30°C ($p<0,001$). Osim toga pokazano je da postoji interaktivni uticaj temperature vode pranja okrvavljene tkanine i primene deterdženta ($F=3,716$, $p=0,025$, partial $N= 0,023$) na indeks degradacije DNK. Interakcija se može videti na grafikonu 8, gde se linije koje predstavljaju pranje na 95 °C i pranje na 60°C seku, dok je linija koja predstavlja pranje na 30°C potpuno izdvojena.



Grafikon 8. Indeks degradacije DNK u odnosu na temperaturu vode pranja okrvavljene tkanine i u odnosu na primenu deterdženta pri pranju

Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja

Vrednosti koncentracija DNK značajno se statistički razlikuju u odnosu na vreme proteklo od pranja do analize ukoliko je uzorak opran na temperaturi vode od 95°C ($p < 0,001$), odnosno ukoliko je opran na 60°C ($p < 0,001$), kao i ako je opran na 30°C ($p = 0,003$).

Kod uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C u prva tri merenja u okviru 30 dana od pranja do početka analize uzoraka vrednosti koncentracija DNK su bile gotovo jednake (Tabela 15 i Grafikon 9). Uzorci koji su analizirani nakon protoka vremena od 3 i 6 meseci od pranja do početka analize pokazuju porast vrednosti koncentracija DNK. Post hoc analiza je pokazala da se vrednosti statistički značajno razlikuju između uzoraka analiziranih unutar 30 dana od pranja u odnosu na uzorke analizirane nakon tri meseca od pranja ($p = 0,022$).

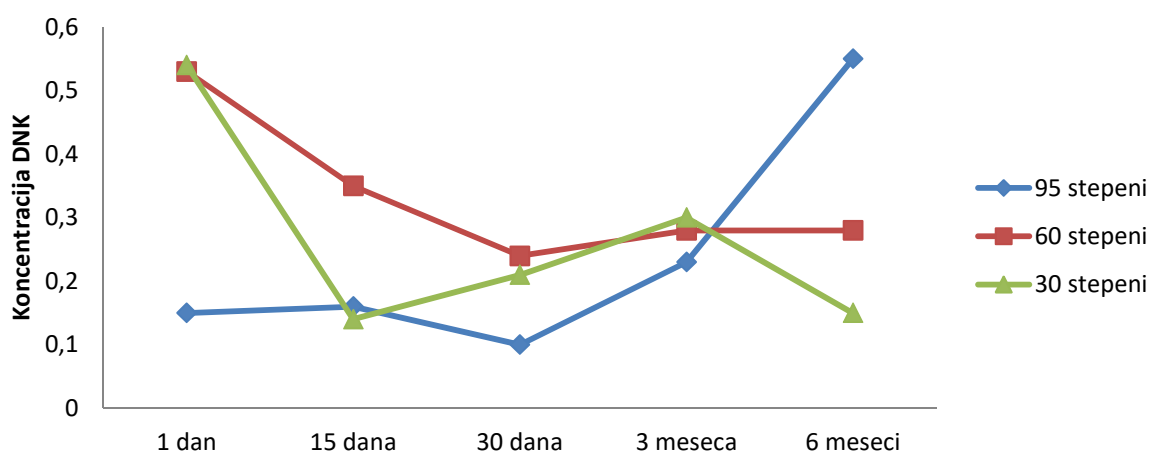
Kod uzoraka opranih na temperaturi vode od 60°C, najveće vrednosti koncentracija DNK registrovane su kod uzoraka analiziranih jedan dan nakon pranja. Vrednost koncentracija DNK se zatim smanjuju u podgrupama uzoraka analiziranih 15 i 30 dana od pranja do početka analize, i može se reći da vrednosti ostaju na tom nivou i kod uzoraka koji su analizirani 3 meseca i 6 meseci nakon pranja. Post hoc analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika u vrednostima koncentracija DNK kod uzoraka analiziranih jedan dan nakon pranja u odnosu na uzorke analizirane 30 dana od pranja ($p = 0,002$), zatim u odnosu na uzorke analizirane 3 meseca nakon pranja ($p = 0,008$) i u odnosu na grupu uzoraka analiziranih 6 meseci nakon pranja ($p = 0,020$).

Kod uzoraka opranih na temperaturi vode od 30°C vrednosti koncentracija DNK materijala su bile najveće kod uzoraka analiziranih 1 dan nakon pranja, a najmanje vrednosti kod uzoraka analiziranih 15 dana posle pranja. Nakon 30 dana od pranja registrovan je blagi porast vrednosti, a ovaj trend se nastavlja i na grupu uzoraka analiziranih nakon 3 meseca. Nakon 6 meseci vrednosti koncentracija DNK su u rangu vrednosti dobijenih kod uzoraka analiziranih nakon 15 dana od pranja. Post hoc analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika u vrednostima koncentracija DNK između analiza koje su vršene: 1 dan i 15 dana ($p = 0,002$), 1 dan i 30 dana ($p = 0,003$), 1 dan i 3 meseca ($p = 0,022$), 1 dan i 6 meseci ($p = 0,001$), 15 dana i 3 meseca ($p = 0,014$), kao i 3 meseca u odnosu na 6 meseci ($p = 0,034$).

Tabela 15. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja

	1 dan	15 dana	30 dana	3 meseca	6 meseci	p-vrednost ¹
95 stepeni	0.15±0.13	0.16±0.13	0.10±0.14	0.23±0.25	0.55±0.73	<0,001
60 stepeni	0.53±0.48	0.35±0.42	0.24±0.36	0.28±0.45	0.28±0.34	<0,001
30 stepeni	0.54±0.33	0.14±0.13	0.21±0.21	0.3±0.31	0.15±0.14	0,003

¹ ANOVA za ponovljena merenja , AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 9. Koncentracija DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja

Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da se indeks degradacije DNK statistički značajno razlikuje u odnosu na vreme proteklo od pranja do analize uzoraka pri sve tri eksperimentalne temperature vode pranja ($p < 0,001$ za sve grupe). U svim eksperimentalnim grupama pri sve tri različite temperature vode pranja registrovan je sličan obazac kretanja vrednosti indeksa degradacije DNK (Tabela 16 i Grafikon 10). Najmanje i gotovo jednake vrednosti indeksa degradacije DNK izmerene su kod uzoraka koji su analizirani jedan dan nakon pranja, pri čemu su slične vrednosti registrovane za uzorke koje su prani na sve tri različite temperature. U eksperimentalnoj grupi koja je analizirana 15 dana nakon pranja registrovan je porast indeksa degradacije DNK kod pranja na 95 i 60°C, dok je u grupi uzoraka pranih na 30°C registrovan pad indeksa degradacije DNK. Pri narednoj vremenskoj grupi uzoraka, odnosno kod uzoraka pranih na 95 i 60°C i analiziranih 30 dana od pranja

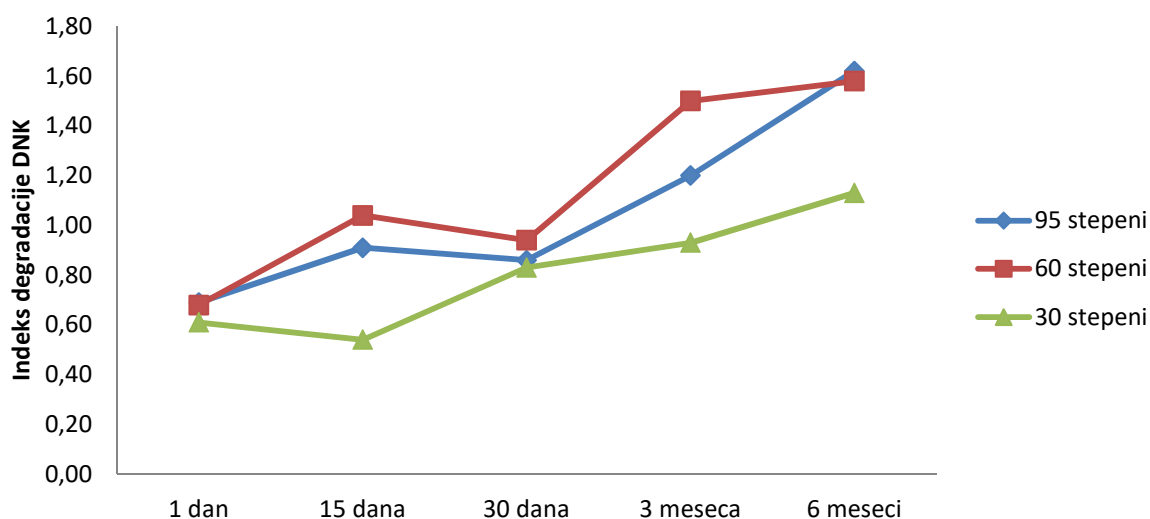
registrovan je pad indeksa degradacije DNK, dok je kod uzoraka pranih na 30°C registrovan porast vrednosti. U eksperimentalnim grupama analiziranim na 3 i 6 meseci nakon pranja zabeležene su veće vrednosti indeksa degradacije DNK pri svim ispitivanim temperaturama vode pranja.

U grupi uzoraka pranih na temperaturi od 95°C međusobno između svih vremenskih tačaka od pranja do početka analize postoji statistički značajna razlika u indeksu degradacije DNK, osim između analize uzoraka nakon 15 dana i analize uzoraka nakon 30 dana. U grupi uzoraka pranih na temperaturi od 60°C međusobno između svih vremenskih tačaka od pranja do početka analize postoji statistički značajna razlika u indeksu degradacije DNK, osim između analize uzoraka nakon 15 dana i analize uzoraka nakon 30 dana. U grupi uzoraka pranih na temperaturi od 30°C međusobno između svih vremenskih tačaka od pranja do početka analize postoji statistički značajna razlika u indeksu degradacije DNK, osim između analize nakon 1 dan i analize nakon 15 dana.

Tabela 16. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja

	1 dan	15 dana	30 dana	3 meseca	6 meseci	p-vrednost ¹
95°C	0.69±0.23	0.91±0.22	0.86±0.22	1.2±0.33	1.62±0.41	<0,001
60°C	0.68±0.09	1.04±0.4	0.94±0.35	1.5±0.75	1.58±0.66	<0,001
30°C	0.61±0.05	0.54±0.11	0.83±0.13	0.93±0.12	1.13±0.18	<0,001

¹ ANOVA za ponovljena merenja, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 10. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja okrvavljene tkanine do analize i u odnosu na temperaturu vode pranja

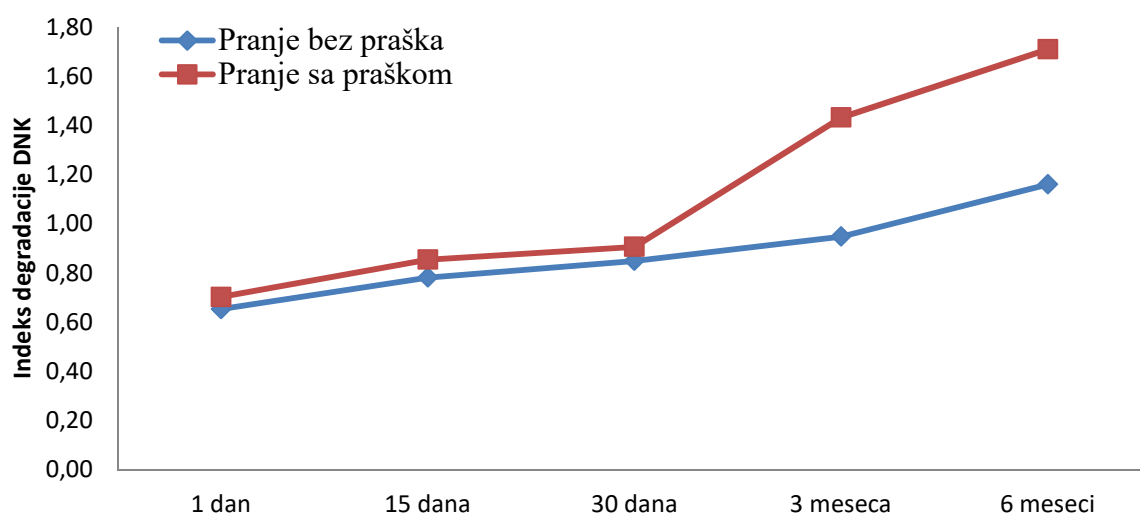
Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja uzoraka do analize i u odnosu na primenu deterdženta za pranje

Utvrđeno je da se indeks degradacije DNK statistički značajno razlikuje u odnosu na proteklo vreme od pranja do analize uzorka i u grupi gde nije korišćen deterdžent pri pranju ($p < 0,001$), kao i u grupi gde je korišćen deterdžent pri pranju ($p < 0,001$). U obe grupe indeks degradacije DNK ima isti obrazac u odnosu na proteklo vreme od pranja do analize, tj. u obe grupe raste kako vreme između pranja i analize više prolazi (Tabela 17). Indeks degradacije DNK na merenju i analizi nakon jednog dana od pranja je gotovo identičan i na uzorku koji je opran sa deterdžentom i na uzorku koji je opran bez deterdženta. Vrednosti indeksa degradacije DNK su približno iste u svim podgrupama tokom eksperimentalnog intervala sve do 30 dana, dok se pri analizi uzoraka na merenjima u vremenskim tačkama nakon 3 i 6 meseci od pranja uočava veći skok vrednosti u grupi koja je koristila deterdžent (Grafikon 11).

Tabela 17. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja uzoraka do analize i u odnosu na primenu deterdženta za pranje

Način pranja:	1 dan	15 dana	30 dana	3 meseca	6 meseci	p-vrednost ¹
bez deterdženta	0.65±0.17	0.78±0.3	0.85±0.22	0.95±0.15	1.16±0.29	<0,001
s deterdžentom	0.7±0.09	0.85±0.38	0.91±0.28	1.43±0.6	1.71±0.53	<0,001

¹ ANOVA za ponovljena merenja, AS±SD – Aritmetička sredina ± standardna devijacija



Grafikon 11. Indeks degradacije DNK u odnosu na proteklo vreme od pranja uzoraka do analize i u odnosu na primenu deterdženta za pranje

INTENZITET SIGNALA I VELIČINA STR SEGMENTA U DNK PROFILU U ODNOSU NA RAZLIČITE NAČINE PRANJA OKRVAVLJENE TKANINE I PROTOK VREMENA NAKON PRANJA

U završnoj fazi eksperimenta ispitano je da li se iz oprane okrvavljene pamučne tkanine može izolovati DNK profil. Zbog ograničenih resursa, a u sklopu utvrđenih činjenica da starost krvne mrlje ne utiče značajnije na proces degradacije DNK, dalji eksperiment je urađen i prikazani su dobijeni rezultati samo za podgrupu uzoraka u kojima je krv naneta na pamučnu tkaninu tri dana pre pranja. Najpre je utvrđen DNK profil osobe čija je krv korišćena u navedenom setu eksperimentalnih uzoraka i potom je izračunata dužina svakog alelnog oblika ispitivanog STR lokusa prisutnog u konkretnom DNK profilu (Tabela 18).

Tabela 18. Standardni DNK profil sa 16 lokusa osobe čija je krv korišćena u eksperimentu.

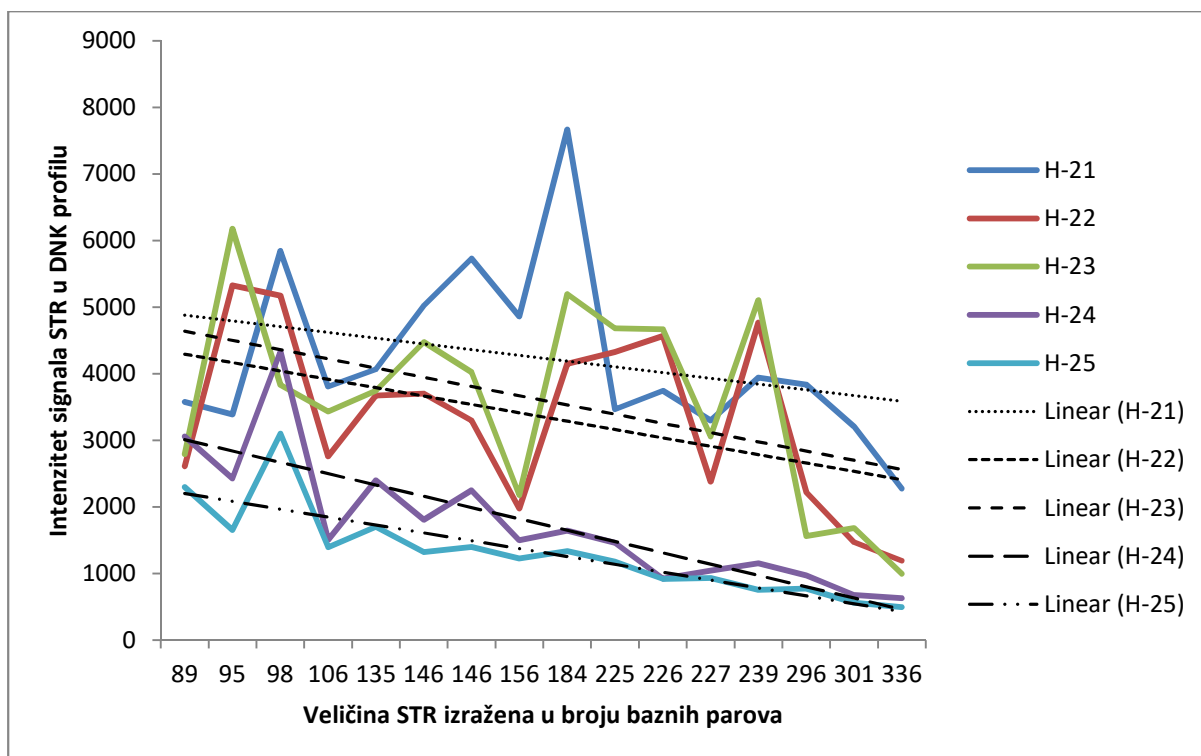
LOKUS	ALEL 1	ALEL 2
AMEL	X (89)	
D3S1358	17 (135)	
TH01	6 (178)	9 (190)
D21S11	28 (219)	31 (231)
D18S51	16 (322)	23 (350)
D10S1248	13 (93)	14 (97)
D1S1656	17.3 (156)	
D2S1338	19 (233)	22 (245)
D16S539	11 (301)	
D22S1045	16 (106)	
vWA	15 (144)	16 (148)
D8S1179	12 (223)	14 (231)
FGA	21 (292)	23 (300)
D2S441	10 (96)	11 (100)
D12S391	17 (142)	19 (150)
D19S433	13 (223)	14.2 (229)

U prvoj koloni su prikazani ispitivani lokusi, a u drugoj i trećoj koloni su prikazane alelne varijante na oba homologa. U zagradama su prikazane izračunate dužine nukleotidnih parova alelnih varijanti u predmetnom profilu.

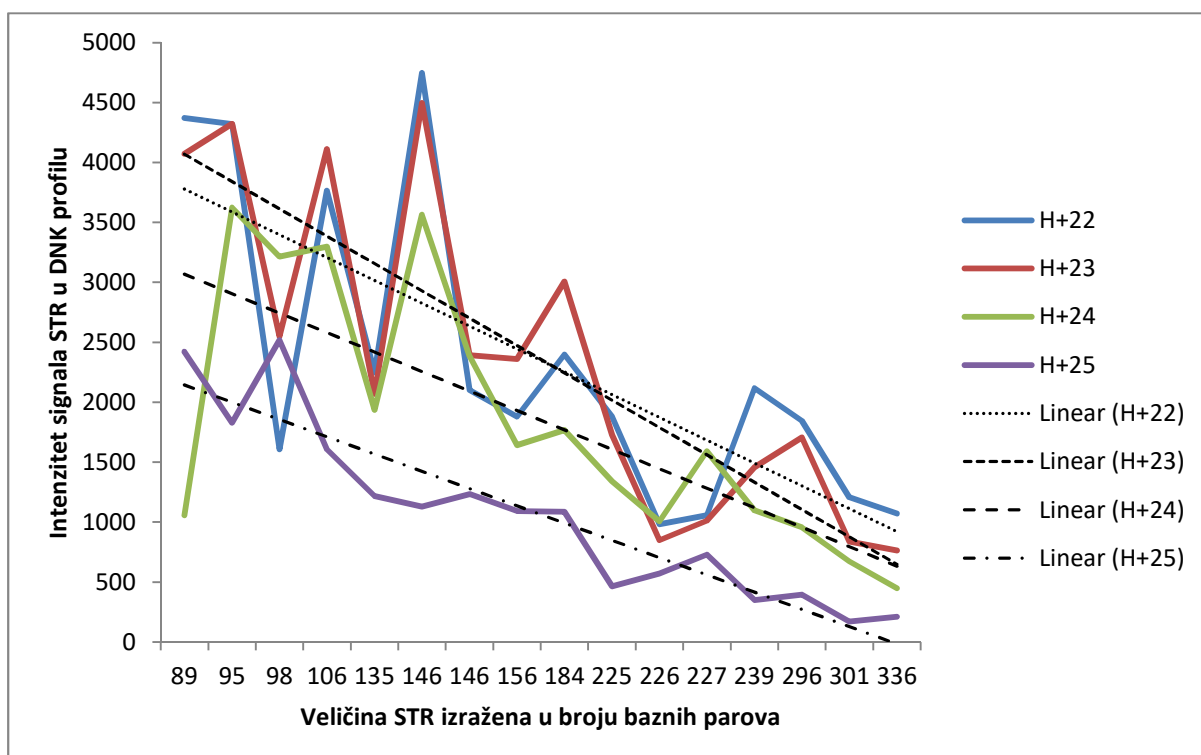
Drugi deo eksperimenta je podrazumevao analizu spornih uzoraka. Iz svake od tri replike svakog od napravljenih eksperimentalnih uzoraka, primenom standardnog protokola profilisanja za sporne DNK uzorke, dobijeni su DNK profili. Za svaki od eksperimentalnih uzoraka takođe je analizirano po 16 STR lokusa.

Odnos intenziteta signala i veličine STR segmenta u DNK profilu

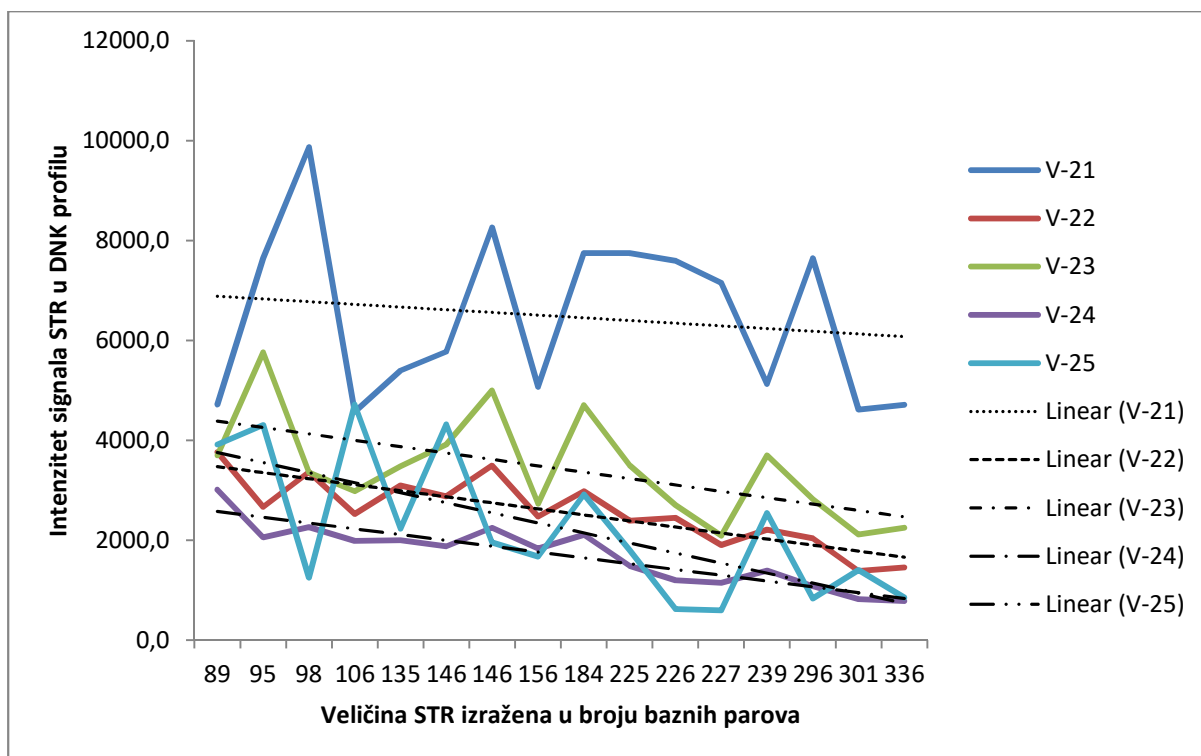
Iz svih replika izračunate su srednje vrednosti dobijenih intenziteta signala svakog od ispitivanih STR lokusa. Na Y-osi prikazana je srednja vrednost intenziteta signala svakog od analiziranih STR lokusa koji su prisutni u DNK profilu dobijenom standardnom procedurom za sporne uzorke. S obzirom na to da u DNK profilima postoje često po dve alelne varijante (po jedna na svakom homolognom hromozomu) jednog genskog mesta, pa samim tim i STR lokusa, na X-osi je prikazana srednja veličina svakog od analiziranih STR lokusa koji su prisutni u DNK profilu, a što je izraženo brojem nukleotidnih parova. Na grafikonima svaka linija predstavlja srednju vrednost triplikata konkretnog uzorka u pogledu veličine određenog lokusa i intenziteta signala tog lokusa dobijenog DNK analizom. Na donjih šest grafikona (Grafikoni od 12 do 17) rezultati su grupisani tako da prikazuju uzorke oprane istim načinom pranja, u pogledu temperature vode pranja i primenu deterdženta pri pranju. Na svakom grafikonu prikazane krivulje u različitim bojama predstavljaju pet različitih mernih tačaka (1 dan, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja okrvavljene tkanine do početka analize). Na svakom od grafikona, za svaki DNK profil utvrđen iz eksperimentalnih uzoraka prikazan je i linearni trend srednjih vrednosti međuzavisnost između dužine (veličine) STR lokusa i intenziteta njegovog signala u dobijenim DNK profilima.



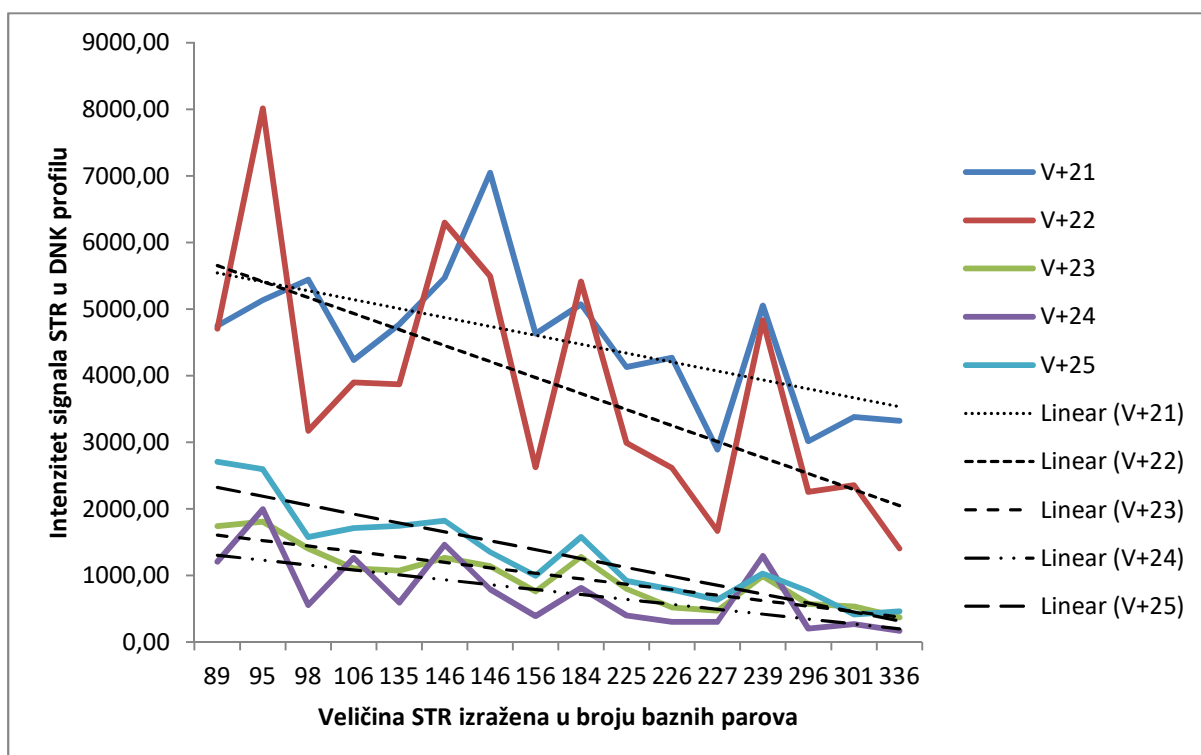
Grafikon 12. Odnos veličine i intenziteta signala STR lokusa u grupi uzoraka opranih na 95°C bez primene deterdženta. Krivulje na grafikonu prikazane u pet različitim boja predstavljaju različite merne tačke (1 dan, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja tkanine do početka analize).



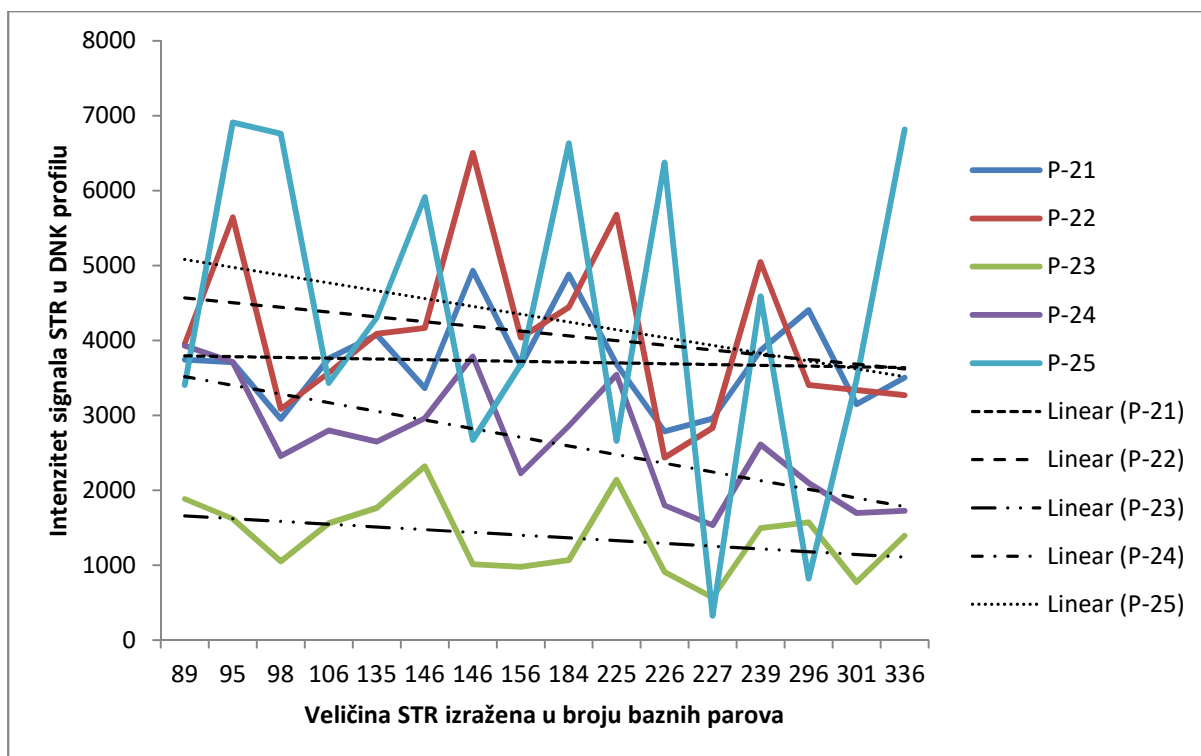
Grafikon 13. Odnos veličine i intenziteta signala STR lokusa u grupi uzoraka opranih na 95°C uz primenu deterdženta. Krivulje na grafikonu prikazane u četiri različite boje predstavljaju različite merne tačke (15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja tkanine do početka analize).



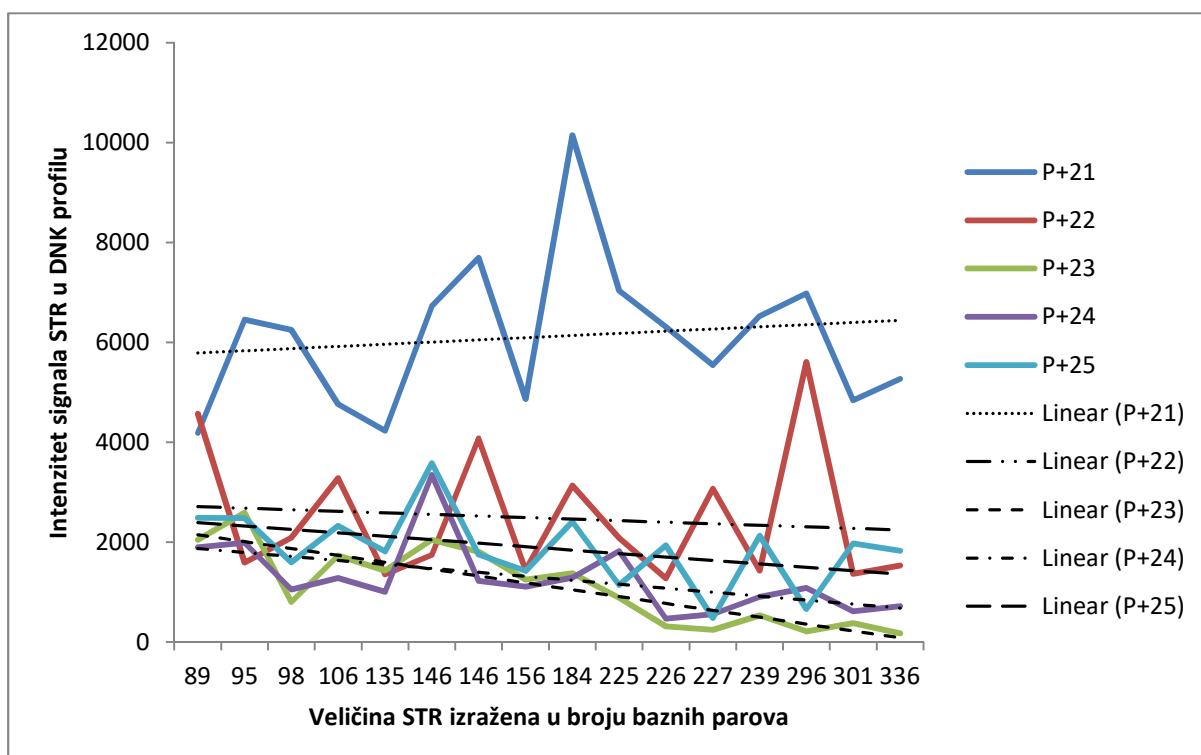
Grafikon 14. Odnos veličine i intenziteta signala STR lokusa u grupi uzoraka opranih na 60°C bez primene deterdženta. Krivulje na grafikonu prikazane u pet različitim boja predstavljaju različite merne tačke (1 dan, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja tkanine do početka analize).



Grafikon 15. Odnos veličine i intenziteta signala STR lokusa u grupi uzoraka opranih na 60°C uz primenu deterdženta. Krivulje na grafikonu prikazane u pet različitim boja predstavljaju različite merne tačke (1 dan, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja tkanine do početka analize).



Grafikon 16. Odnos veličine i intenziteta signala STR lokusa u grupi uzoraka opranih na 30°C bez primene deterdženta. Krivulje na grafikonu prikazane u pet različitim boja predstavljaju različite merne tačke (1 dan, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja tkanine do početka analize).



Grafikon 17. Odnos veličine i intenziteta signala STR lokusa u grupi uzoraka opranih na 30°C uz primenu deterdženta. Krivulje na grafikonu prikazane u pet različitim boja predstavljaju različite merne tačke (1 dan, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja tkanine do početka analize).

Korelaciona analiza

U narednom koraku statističke obrade dobijenih rezultata urađena je korelaciona analiza između veličine i intenziteta signala STR lokusa u odnosu na određenu eksperimentanu grupu specifičnog načina pranja (temperatura vode pranja i primena deterđenta pri pranju), kao i u odnosu na protok vremena od pranja do početka analize (Tabela 19). U grupi H- sa brojem parova baza (veličina STR lokusa) statistički značajno negativno jako koreliraju poslednja dva uzorka navedena u donjoj tabeli, odnosno uzorci H-24 i H-25. U grupi H+ svi uzorci statistički značajno negativno koreliraju sa brojem parova baza (veličina STR lokusa). U grupi V- svi uzorci osim V-21 statistički značajno negativno koreliraju sa brojem parova baza. U grupi V+ svi uzorci statistički značajno negativno koreliraju sa brojem parova baza (veličina STR lokusa). U grupi P- samo uzorak P-24 statistički značajno negativno korelira. U grupi P+ samo uzorci P+23 i P+24 statistički značajno negativno koreliraju sa brojem parova baza.

Tabela 19. Indeks korelacije (r) veličine STR lokusa i dobijenog intenziteta signala STR u spornom DNK profilu. r – indeks korelacije; ** - korelacija koja ima statističku značajnost za $p < 0,01$, * - korelacija koja ima statističku značajnost za $p < 0,04$.

		baze		baze		baze		baze		baze		baze
H-21	r	-0.381			V-21	-0.199	V+21	-0,628**	P-21	-0.149	P+21	0.219
	p	0.145				0.461		0.009		0.583		0.415
H-22	r	-0.450	H+22	-0,670**	V-22	-0,868**	V+22	-0,670**	P-22	-0.296	P+22	-0.277
	p	0.080		0.005		0.000		0.005		0.266		0.300
H-23	r	-0.340	H+23	-,851**	V-23	-0,571*	V+23	-0,855**	P-23	-0.411	P+23	-0,839**
	p	0.198		0.000		0.021		0.000		0.114		0.000
H-24	r	-0,935**	H+24	-,752**	V-24	-0,902**	V+24	-0,696**	P-24	-0,723**	P+24	-0,639**
	p	0.000		0.001		0.000		0.003		0.002		0.008
H-25	r	-0.955**	H+25	-,968**	V-25	-0,627**	V+25	-0,914**	P-25	-0.155	P+25	-0.391
	p	0.000		0.000		.009		.000		0.568		0.134

TRANSFER KRVI IZ PODRUČJA KRVNE MRLJE NA NEOKRVAVLJENE DELOVE PAMUČNE TKANINE

U završnoj fazi eksperimenta izolovani su DNK profili iz kontrolnih uzoraka. Kontrolni uzorci su pripremljeni tako da budu identične veličine i izgleda kao i eksperimentalni uzorci, s tom razlikom što nisu sadržali krvnu mrlju pre početka procesa pranja. Jedna grupa je predstavljala negativne kontrolne uzorke i ti uzorci nisu oprani u veš mašini, a DNK analiza je očekivano dala negativan rezultat i nisu registrovani bilo kakvi lokusi u profilu. Na ovim kontrolnim uzorcima svakako nije bilo ni vidljivih tragova krvi, niti je prezuptivnim testovima dobijena pozitivna reakcija.

Druga grupa kontrolnih uzoraka je oprana istovremeno sa eksperimentalnim uzorcima, te je izvršen vizuelni pregled i potom izolovan sporni DNK profil iz svakog od kontrolnih uzoraka. Na kontrolnim uzorcima svih podgrupa opranim na temperaturi vode od 95 i 60°C uz primenu deterdženta (H+ i V+ grupe) nakon pranja nisu registrovani vidljivi tragovi transfera krvi sa eksperimentalnih uzoraka na kontrolne uzorke, dok je hemijskim testovima dobijena difuzna pozitivna reakcija uglavnom sličnog intenziteta u svim delovima kontrolnih uzoraka. S druge strane, na kontrolnim uzorcima svih podgrupa opranim na temperaturi vode od 95 i 60°C bez primene deterdženta (H- i V- grupe) nakon pranja nisu registrovani vidljivi fokalni tragovi transfera krvi sa eksperimentalnih uzoraka na kontrolne uzorke, ali je uočena difuzna bledocrvenkasta prebojenost uzoraka koja odgovara difuznom transferu krvi bez uočljivih granica područja transfera, dok je hemijskim testovima potvrđena difuzna pozitivna reakcija sličnog intenziteta u skoro svim delovima pojedinačnih uzoraka. Potom je urađena analiza ovih uzoraka po standardnom protokolu za DNK profilisanje spornih uzoraka (Tabela 20). Tom prilikom nisu izolovani DNK profili od značaja za moguću interpretaciju doprinosioca utvrđenom tragu. Naime, u kontrolnim uzorcima opranim na temperaturi vode od 95 i 60°C uz primenu deterdženta, od 16 analiziranih lokusa dobijena su samo dva odnosno jedan od ispitivanih lokusa, pri čemu su utvrđeni intenziteti na samoj donjoj granici praga detekcije (ref. vrednost >100), odnosno na donjoj granici vrednosti koje se prijavljuju i smatraju verodostojnim u realnim slučajevima DNK veštačenja. U kontrolnim uzorcima opranim na temperaturi vode od 95°C bez primene deterdženta nije registrovano prisustvo bilo kakvog DNK materijala ljudskog porekla. U kontrolnim uzorcima opranim na temperaturi vode od 60°C bez primene deterdženta registrovan je parcijalni DNK profil na samo 3 od 16 lokusa, a što je takođe potpuno inkonkluzivno u realnim slučajevima.

Tabela 20. DNK profili izolovani iz kontrolnih uzoraka. U prvoj koloni su navedene oznake analiziranih STR lokusa, dok su u prvom redu upisani nazivi uzoraka: KH+ kontrolni uzorak grupe uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C uz primenu deterdženta; KH- kontrolni uzorak grupe uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C bez primene deterdženta; KV+ kontrolni uzorak grupe uzoraka opranih na temperaturi vode od 60°C uz primenu deterdženta; KV- kontrolni uzorak grupe uzoraka opranih na temperaturi vode od 60°C bez primene deterdženta. U tabelu su unete dobijene alelne varijante STR lokusa, a u zagradama se nalaze njihovi intenziteti.

LOKUSI	KH+		KH-		KV+		KV-				
AMEL	**		**		**		**				
D3S1358	**		**		**		**				
TH01	**		**		**		**				
D21S11	**		**		**		**				
D18S51	**		**		**		**				
D10S1248	13 (115)	15 (103)	**		**		12 (117)				
D1S1656	**		**		**		**				
D2S1338	**		**		23 (104)		17 (412)	19 (334)	20 (411)	22 (328)	
D16S539	**		**		**		**				
D22S1045	16 (185)		**		**		**				
vWA	**		**		**		14 (237)	15 (303)	16 (496)	17 (191)	19 (131)
D8S1179	**		**		**		**				
FGA	**		**		**		**				
D2S441	**		**		**		**				
D12S391	**		**		**		**				
D19S433	**		**		**		**				

Na kontrolnim uzorcima svih podgrupa opranim na temperaturi vode od 30°C sa primenom deterdženta ili bez njega (P+ i P- grupe) nakon pranja registrovani su vidljivi fokalni tragovi i difuzna bledocrvenkasta prebojenost uzoraka, a što odgovara naglašenom transferu krvi sa eksperimentalnih uzoraka na negativne kontrolne uzorke, dok je hemijskim testovima potvrđena difuzna pozitivna reakcija različitog intenziteta u različitim delovima pojedinačnih uzoraka. Na svim kontrolnim uzorcima je uočen naglašeni fokalni sekundarni transfer krvi, koji je znatno bleđi od originalne krvne mrlje i ne pokazuje jasne granice već razlivanje i bleđenje od centralnog područja transfera ka njegovoj periferiji, te područje samog transfera nema jasne konture već je više mrljastog izgleda i nejasno ograničeno. Potom je urađena analiza ovih uzoraka po standardnom protokolu za DNK profilisanje spornih uzoraka (Tabela 21). Tom prilikom su izolovani puni DNK profili, odnosno sporni DNK profili iz kojih je bilo moguće pouzdano utvrditi identitet osobe od koje potiče krv u kontrolnom uzorku. Poređenjem podgrupa opranih sa primenom deterdženta i bez njega može se zaključiti da pranje bez deterdženta uzrokuje lakše i intenzivnije premeštanje krvi iz područja originalne krvne mrlje na neokrvavljeni deo tkanine, dok primena deterdženta svakako dovodi očekivano do boljeg uklanjanja tragova krvi sa pamučne odeće, a što se zaključuje i prema intenzitetima i prema broju lokusa izolovanih u spornim profilima.

Tabela 21. DNK profili izolovani iz kontrolnih uzoraka. U prvoj koloni su navedene oznake analiziranih STR lokusa, dok su u prvom redu upisani nazivi uzoraka: KP+ kontrolni uzorak grupe uzoraka opranih na temperaturi vode od 30°C uz primenu deterdženta; KP- kontrolni uzorak grupe uzoraka opranih na temperaturi vode od 30°C bez primene deterdženta. U tabelu su unete dobijene alelne varijante STR lokusa, a u zagradama se nalaze njihovi intenziteti.

LOKUSI	KP+			KP-				
AMEL	X (666)			X (4436)				
D3S1358	15 (311)	16 (170)		16 (1016)	17 (2022)			
TH01	8 (239)	9 (383)		6 (1882)	8 (494)	9 (2165)		
D21S11	29 (253)	30 (181)		28 (2312)	31 (2398)			
D18S51	17 (177)	18 (193)		15 (273)	16 (1347)	17 (305)	18 (326)	23 (912)
D10S1248	12 (976)	15 (454)		12 (1483)	13 (2423)	14 (2556)		
D1S1656	11 (231)	16 (123)		17,3 (3266)				
D2S1338	20 (1882)	25 (826)		19 (2056)	20 (526)	22 (2399)		
D16S539	13 (428)			11 (1879)	13 (904)			
D22S1045	16 (2029)			16 (4481)				
vWA	17 (1179)	18 (236)	19 (939)	15 (1823)	16 (1414)	19 (553)		
D8S1179	14 (130)			12 (1345)	14 (1745)			
FGA	23 (68)			21 (1747)	23 (1278)			
D2S441	14 (62)			10 (1316)	11 (863)	13 (327)	14 (285)	
D12S391	15 (108)	19 (271)		15 (556)	17 (2788)	19 (2354)		
D19S433	12 (128)	16 (90)		13 (1653)	14 (313)	14,2 (696)		

U prilog dobijenim rezultatima stoje i rezultati DNK profilisanja spornih uzoraka. Naime, iz eksperimentalnih uzoraka podgrupa H+, H-, V+ i V- izolovani su jedinstveni DNK profili. S druge strane, u podgrupi uzoraka P+ i P- izolovani su mešoviti DNK profili. Pri tome, u svakom od profila grupe uzoraka P utvrđen je uvek dominantan DNK profil koji je odgovarao DNK profilu osobe čija je krv korišćena za formiranje tog eksperimentalnog uzorka.

DISKUSIJA

Vizuelni efekti pranja okrvavljene pamučne tkanine i sekundarni transfer DNK

Aktuelnim eksperimentima je potvrđeno da je uklanjanje krvi sa pamučne tkanine znatno komplikovanije nego što se ranije verovalo. Na ovakav zaključak ukazuju rezultati istraživanja koji su pokazali da jedno konvencionalno pranje okrvavljene pamučne tkanine, bez obzira na starost krvne mrlje, temperaturu pranja i primenu deterdženta, ne može u potpunosti da ukloni i vidljive i nevidljive tragove krvi.

Prezumptivnim testovima za dokazivanje prisustva krvi (Hemastix i Bluestar forensic tablets) u svim testiranim uzorcima nakon pranja je dobijena intenzivna ili slabo pozitivna reakcija. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa prethodnim rezultatima u literaturi (Kulstein G i Wiegand P, 2018; Stojanović I, 2019), odnosno da jedno konvencionalno pranje okrvavljene pamučne tkanine nije dovoljno da ukloni i vidljive i nevidljive tragove krvi sa odeće. Prema podacima u literaturi (Kulstein G i Wiegand P, 2018), ponovljena (dva, tri ili više) pranja okrvavljene pamučne tkanine ili primena specifičnih sredstava pri pranju mogu da uklone tragove krvi sa odeće u meri da testiranje prezumptivnim testovima bude negativno pri analizi. S druge strane, primena forenzičkih sredstva na bazi luminola (Bluestar forensic tablets i sl.) za vizuelizaciju nevidljivih tragova krvi na opranoj pamučnoj tkanini, nakon jednog pranja, daje pozitivne rezultate u svim testiranim uzorcima. Pri tome, intenzitet i dužina trajanja luminiscencije zavise od samog načina pranja (Kulstein G i Wiegand P, 2018), a što se objašnjava količinom biološkog materijala preostalog u samoj tkanini nakon završenog procesa pranja. Istraživanja drugih autora su pokazala da komercijalni deterdženti, izuzev varikine, ne daju lažno pozitivnu reakciju na primenu prezumptivnih hemijskih testova za krv (Edler C et al, 2017), tako da se dobijena reakcija pripisuje samo krvi koja je na tkanini preostala nakon pranja. Ovakav rezultat nije iznenađujući, s obzirom na činjenicu da aktivne supstance iz korišćenih testova mogu da detektuju prisustvo nevidljive krvi čak i u uslovima da je krv ekstremno razblažena. Tako Hemastix registruje prisustvo krvi u razblaženjima do maksimalno 1:1.000.000, dok Bluestar forensic tablets rastvor registruje prisustvo krvi do maksimalnog razblaženja 1:5.000.000 (Webb JL et al, 2006; Tobe SS et al, 2007).

Istraživanjem je utvrđeno da temperatura vode tokom pranja okrvavljene pamučne tkanine ima bitan, ali ne i presudan uticaj na vizuelno uklanjanje krvi sa tkanine. Ovakve

rezultate su dobili i drugi istraživači u skorašnjim istraživanjima (Edler C et al, 2017). Naime, uporednom analizom uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C i 60°C (grupe H i V) pokazano je da se uz primenu deterdženta mogu ukloniti vidljivi ali ne i nevidljivi tragovi krvih mrlja starih do 10 dana (podgrupe 1, 2 i 3). S druge strane, krvne mrlje starosti 30 dana (podgrupa 4) ne mogu se ukloniti navedenim načinom kroz jedan ciklus pranja, tako da nakon jednog pranja zaostaju diskretni vidljivi tragovi krvnih mrlja koji oslikavaju margine mesta prethodno postojeće originalne krvne mrlje. Prema tome, u eksperimentalnoj seriji starije krvne mrlje na pamučnoj tkanini se vizuelno teže uklanjaju pranjem u poređenju sa svežim krvnim mrljama. Izuzetak od ovog pravila su sveže krvne mrlje starosti jedan dan oprane na temperaturi vode od 30°C sa deterdžentom ili bez njega, koje pokazuju vizuelno najintenzivnije zadržavanje na pamučnoj tkanini nakon pranja u poređenju sa ostalim uzorcima iz tih grupa.

Objašnjenje pojave da se starije krvne mrlje teže skidaju sa pamučne tkanine nalazi se u činjenici da nakon kontakta krvi sa pamučnim tekstilom dolazi do okidanja koagulacione kaskade (Hall JE & Guyton AC, 2016), te istovremeno, uz natapanje tkanine krvlju, dolazi i do zgrušavanja krvi. Proteinske komponente krvi međusobno interreaguju i povezuju se u lance, koji se istovremeno vezuju i za proteinske strukture prirodnih pamučnih vlakana. Komercijalni deterdženti napadaju ove proteinske strukture, te time omogućavaju uklanjanje biološkog materijala sa tkanina. Međutim, visoka temperatura dovodi do koagulacije proteina u lancima koagulisane krvi vezane za pamučna vlakna i time dovodi do promene trodimenzionalne strukture proteina i formiranja čvršćih veza sa vlaknima tkanine. Ovo je zapravo objašnjenje tradicionalnog shvatanja među laicima da se krvne mrlje najbolje uklanjaju dugim potapanjem okrvavljene tkanine u hladnoj vodi (Drösser C, 2013).

Zapaženo je da nakon pranja okrvavljene pamučne tkanine, bez obzira na način pranja, vidljivi zaostali deo krvne mrlje će biti naglašenija obodna, odnosno granična ivica originalne krvne mrlje. Ovakva pojava se objašnjava poznatom činjenicom da prilikom nastanka krvne mrlje po tipu natapanja na pamučnoj tkanini dolazi do intenzivnog kretanja i premeštanja krvi kroz tkaninu delovanjem kapilarnih sila (James SH et al., 2005; Breithaupt J, 2001). Određeni delovi tkanine postaju zasićeni, odnosno natopljeni krvlju, te višak krvi dalje biva premešten u periferne delove. Tada u obodnom delu krvne mrlje, odnosno na granici prema čistom delu tkanine, dolazi do uravnoteženja kapilarnih i kohezivnih sila krvi, te u tom delu i dolazi do formiranja nešto debljeg sloja krvne mrlje nego u centralnom delu

mrnje. Ovakav raspored krvi u tkanini objašnjava tamniju obodnu ivicu sasušene krvne mrlje na tkanini. Paralelno sa ovim procesom odvija se i proces koagulacije krvi u samoj tkanini. Tokom ciklusa pranja okrvavljene pamučne tkanine treba očekivati da proporcionalno bude uklonjena krv i iz centralnog i iz obodnog dela sasušene krvne mrlje na tkanini, te je samim tim i očekivana pojava tamnije obodne ivice u izmenjenoj krvnoj mrlji nakon pranja okrvavljene pamučne tkanine.

Prilikom pranja pamučne tkanine okrvavljene pre 30 dana na temperaturi vode od 95°C i 60°C uz primenu deterdženta dolazi do skoro potpunog uklanjanja vidljivih tragova krvi, dok na mestu oboda originalne mrlje zaostaje diskretna vidljiva krvna mrlja koja ukazuje upravo na konture originalne prvobitne krvne mrlje. Dakle, istraživanjem je potvrđeno uvreženo verovanje u narodu da se stare krvne mrlje (30 dana od nanošenja krvi na tkaninu do pranja) ne mogu ukloniti sa pamučne tkanine jednim ciklusom konvencionalnog pranja, bez obzira na temperaturu i primenu deterdženta pri pranju. Kod ovih uzoraka starosti 30 dana zaostaje veća količina vidljive krvi u krvnoj mrlji, tako da je kod tih krvnih mrlji intenzivniji i naglašeniji obodno-granični deo. Ovakav efekat ne može se pripisati isključivo određenoj starosti krvne mrlje na pamučnoj tkanini, već se sličan efekat može postići i primenom manje efikasnih deterdženata na krvnim mrljama manje starosti, a ovaj zaključak je dobijen komparacijom sa rezultatima dosadašnjih istraživanja drugih autora (Edler C et al, 2017; Kulstein G i Wiegand P, 2018; Webb JL et al, 2006; Tobe SS et al, 2007). Prema tome, naglašeni obod krvne mrlje nakon pranja ne ukazuje direktno da je krvna mrlja na tkanini pre pranja bila stara, već takva pojava zavisi i od samog načina pranja.

Prilikom pranja okrvavljene pamučne tkanine bez primene deterdženta, odnosno samo pranjem u vodi, bez obzira na primenjenu temperaturu pranja (30, 60 i 95°C) i bez obzira na starost krvne mrlje, ne dolazi do potpunog uklanjanja vidljivih tragova krvi iz originalne krvne mrlje, odnosno konture-margine su jasno vidljive, te samim tim margine ukazuju na oblik i mesto originalne mrlje.

U svim eksperimentalnim uzorcima koji nakon pranja ostavljaju za sobom vidljive tragove krvi na pamučnoj tkanini, zapaženo je da isti načini pranja, u grupi gde je jedino promenljiva starost krvne mrlje, progresivno uzrokuju zaostajanje sve upadljivije krvne mrlje na samoj tkanini nakon pranja. Ovakav rezultat jasno i nedvosmisleno ukazuje da se nakon završenog sušenja i koagulacije krvi na tkanini, koje bi prema važećim shvatanjima u savremenoj literaturi trebalo biti završeno u sklopu okolnosti konkretnog eksperimenta za

najviše par sati (Anderson S et al., 2005; James SH et al., 2005; Li R, 2015; Ramsthaler F et al., 2012), odvija još neki proces. Dakle, u krvnoj mrlji na pamučnoj tkanini, pored sušenja i koagulacije krvi, odvija se još neki proces koji traje kontinuirano tokom najmanje mesec dana od nanošenja krvi na tkaninu. Ovaj proces bi se mogao objasniti prethodno navedenim vezivanjem proteina krvi i njihovom interakcijom sa prirodnim vlaknima tkanine, ali ovaj proces izgleda da traje znatno duže od jednostavne hemijske reakcije.

U grupi uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C i 60°C, kako u podgrupi sa primenom, tako i u podgrupi bez primene deterdženta, bez obzira na starost krvne mrlje pre pranja, zapažena je difuzna pozitivna reakcija na primenjene hemijske testove (Bluestar forensic tabletes) na celoj površini uzorka. Dalje, u uzorcima gde je zaostala vidljiva krv zapažena je i difuzna diskretna bledocrvenkasta prebojenost čitavog uzorka. Ovakav rezultat je jasno ukazao da tokom pranja okrvavljene pamučne tkanine na temperaturi vode od 95°C i 60°C dolazi do difuznog transfera krvi na veliku površinu prethodno neokrvavljene tkanine. Nasuprot tome, prema rezultatima DNK profilisanja eksperimentalnih uzoraka podgrupa opranih na temperaturi vode od 95°C i 60°C sa primenom deterdženta i bez njega (H+, H-, V+ i V-) izolovani su jedinstveni DNK profili, što znači da u ovim uzorcima nije bilo transfera DNK materijala iz jedne u drugu grupu uzoraka, koji su oprani istovremeno tokom jednog ciklusa pranja. Takođe, iz kontrolnih uzoraka iz ovih podgrupa nije bilo moguće izolovati upotrebljive DNK profile, odnosno od 16 analiziranih lokusa registrovano je od 0 do 3 lokusa, uglavnom uz donji prag detekcije alela. Dakle, uporednom analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da transfer krvi iz primarnog u neokrvavljeno područje iste tkanine tokom pranja pod navedenim uslovima dokazano potiče od hemoglobina, ali ne i od DNK materijala smeštenog u krvnim ćelijama. U literaturi za sada nema pouzdanog objašnjenja ovakve pojave, ali je verovatno da visoka temperatura vode utiče na koagulaciju proteina krvi i njihovu opisanu jaču interakciju sa prirodnim vlaknima pamuka, kao i na smanjenje površinskog napona i lakše uklanjanje DNK molekula iz primarnog područja krvne mrlje i sprečavanje njegovog ponovnog vezivanja za pamučnu tkaninu.

U grupi uzoraka opranih na temperaturi vode od 30°C, bez obzira na primenu deterdženta i bez obzira na starost krvne mrlje pre pranja, dolazi do delimičnog uklanjanja krvne mrlje iz primarnog područja uz intenzivan difuzni i fokalni transfer krvi na prethodno neokrvavljene delove tkanina, tako da je originalna kontura očuvana ali nešto teže uočljiva. Pri tome, dobijeni rezultati DNK profilisanja eksperimentalnih uzoraka opranih na

temperaturu vode od 30°C sa primenom deterdženta i bez njega (P+ i P-) pokazali su mešovite DNK profile, gde je u svakom od profila utvrđen uvek dominantan DNK profil koji odgovara DNK profilu osobe čija je krv korišćena za formiranje tog eksperimentalnog uzorka. Dakle, uporednom analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da transfer krvi iz primarnog u neokrvavljeno područje iste tkanine tokom pranja pod navedenim uslovima dokazano potiče od pune krvi, odnosno i od hemoglobina i od DNK materijala.

Kada se u realnim forenzičkim slučajevima dogodi situacija da je osumnjičeni pokušao samo pranjem u vodi, sa deterdžentom ili bez njega, bez obzira na primenjenu temperaturu vode, odnosno pod uslovima sličnim eksperimentalnim, da ukloni krvne mrlje sa pamučne tkanine, na osnovu dobijenih rezultata aktuelnog istraživanja analitičar obrazaca krvnih mrlja je sada u mogućnosti da tvrdi da je oblik originalne krvne mrlje bio isti kao i oblik krvne mrlje nađene pri pregledu oprane okrvavljene tkanine. Analitičar sada ima na raspolaganju smernice za razlikovanje transfera krvi nastalog tokom samog ciklusa pranja, od izmenjene primarne krvne mrlje koja je postojala na tkanini pre pranja i izmenjena je tokom samog pranja. Takođe, prilikom BPA analize oprane okrvavljene pamučne tkanine eventualni podaci o načinu pranja i primeni deterdženta mogli bi uticati na pouzdanije krajnje rezultate pri veštačenjima u realnim forenzičkim slučajevima.

Kvantifikacija i degradacija DNK u krvnoj mrlji nakon pranja

Prvobitnim istraživanjem (pilot projekat disertacije: neobjavljeni rezultati) pokazano je da više temperature pranja proporcionalno uzrokuju bolje uklanjanje biološkog materijala, odnosno DNK, iz sasušanih krvnih mrlja sa pamučne tkanine, tako da je količina aplikovane krvi na uzorcima prilagođena temperaturi pranja i dalje metodologiji DNK analize uzoraka.

Kvantifikacijom DNK materijala u uzorcima je registrovano da starenje krvne mrlje na tkanini (grupe 1, 3, 10 i 30 dana od nanošenja krvi na tkaninu do pranja) uzrokuje da nakon pranja zaostaje progresivno i statistički značajno sve manja količina DNK materijala. Ovakvi rezultati su obrnuto proporcionalni rezultatima vizuelnog pregleda uzoraka nakon pranja, gde je utvrđeno da se starije krvne mrlje (grupe 1, 3, 10 i 30 dana od nanošenja do pranja), bez obzira na temperaturu vode i primenu deterdženta, sve teže uklanjaju jednim konvencionalnim pranjem. S obzirom na to da se prema podacima u literaturi (Bright JA et al., 2013; Lee HC et Ladd C, 2001) količina DNK u sasušenoj krvnoj mrlji na tkanini ne

menja značajnije tokom dužeg perioda vremena (mereno u mesecima i čak godinama), komparacijom dobijenih rezultata istraživanja došlo se do zaključka da se pranjem starijih krvnih mrlja sa pamučne tkanine lakše uklanja DNK materijal, a da se vizuelna karakteristika krvnih mrlja, odnosno sama boja krvi koja potiče od hemoglobina, teže uklanja kod starijih krvnih mrlja. Prema podacima u stručnoj literaturi (Arjun RI et Ashish P, 2016; Mushtaq S et al., 2016; Salahuddin Z et al., 2018), dosadašnja istraživanja fokusirana su samo na uklanjanje krvnih mrlja starih do nekoliko dana, tako da ovaj efekat nije detaljnije istraživao. Postoji mogućnost da je ovakva pojava uzrokovana gubitkom vode iz ćelija krvi i njihovim oštećenjem, te ekspaniranjem DNK molekula spoljašnjoj sredini i njegovom lakšem uklanjanju tokom pranja starije krvne mrlje na pamučnoj tkanini. S druge strane, gubitak vode iz ćelija krvi i njihovo oštećenje tokom dužeg perioda sušenja krvne mrlje na pamučnoj tkanini moglo bi uticati na ekspaniranje proteinskih komponenata ćelija krvi (hemoglobin) spoljašnjoj sredini i njihovom jačem impregniranju u pamučna vlakna, odnosno na način kako je to prethodno objašnjeno. Ovo bi moglo biti potencijalno objašnjenje težeg vizuelnog uklanjanja krvnih mrlja starih 30 dana sa tkanine pri jednom ciklusu konvencionalnog pranja, a što je među laicima i u narodu odavno poznato u vidu izreke: „*Stare fleke se teško skidaju.*“ Ostaje za buduća istraživanja da se odgovori na pitanje da li se ovaj efekat javlja samo kod tkanina sačinjenih od pamučnih vlakana ili postoji i kod tkanina sačinjenih od svih ostalih prirodnih vlakana, sintetičkih vlakana i tkanina sačinjenih od mešovityh vlakana.

Količina DNK materijala koja zaostaje u krvnoj mrlji po isteku perioda od jednog dana, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci nakon pranja nema statističku zakonomernost. Ovakav rezultat je donekle bio očekivan i objašnjava se činjenicom da nakon pranja na tkanini zaostaje određena količina biološkog materijala koja je bila približno identična u svim uzorcima i da tokom vremena u različitim eksperimentalnim grupama nije došlo do gubitka DNK materijala iz uzoraka. Dakle, s obzirom na to da su tokom eksperimentom određenog perioda vremena uzorci skladišteni na način propisan za čuvanje dokaznog materijala (Lee HC et Ladd C, 2001; Lee HC et al., 1998), može se tvrditi da dobijeni rezultati pružaju podršku tvrdnji da aktuelni propisani uslovi čuvanja dokaznog materijala sprečavaju gubitak DNK materijala u realnim uzorcima. Takođe, dobijeni rezultati indeksa degradacije DNK u odnosu na vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja i temperaturu pranja nemaju konkluzivnu statističku zakonomernost, što dalje ukazuje da sama starost sasušene krvne mrlje pre pranja nema uticaja na degradaciju DNK materijala u krvi preostaloj nakon pranja. Dakle, dobijenim rezultatima je potvrđeno da su aktuelni propisi čuvanja dokaznog

materijala adekvatni da spreče gubitak DNK sa predmeta od interesa za istražni i sudski proces.

Analizom indeksa degradacije DNK materijala u uzorcima pokazano je da temperature vode od 95°C i 60°C pri pranju okrvavljene pamučne tkanine uzrokuju statistički značajno veći stepen degradacije DNK u odnosu na pranje okrvavljene tkanine na temperaturi vode od 30°C. Ovakav rezultat se tumači već poznatim podacima da temperatura predstavlja jedan od faktora koji uzrokuju ubranu degradaciju molekula DNK, a sve u zavisnosti od dužine delovanja visoke temperature. Starost krvne mrlje na tkanini pre nego što je tkanina oprana nema uticaja na degradaciju DNK u samoj mrlji nakon pranja. Indeks degradacije DNK u krvnoj mrlji se statistički značajno povećava sa protokom vremena nakon pranja okrvavljene tkanine, te je najveći u grupi uzoraka starih 6 meseci. Ovakav rezultat jasno ukazuje da faktori (voda, temperatura i deterdžent), koji su delovali tokom procesa pranja okrvavljene pamučne tkanine, sa protokom vremena ubrzavaju propadanje biološkog materijala preostalog u krvnoj mrlji nakon pranja.

Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji i indeksu degradacije DNK u krvnim mrljama iz uzoraka koji su prani deterdžentom i bez deterdženta na temperaturi od 95°C i 60°C, dok na temperaturi od 30°C ova zakonomernost izostaje. Manje vrednosti koncentracije DNK u grupi uzoraka opranih uz primenu deterdženta su očekivane, jer deterdžent svakako ima potvrđeno veliki uticaj na uklanjanje svih vrsta biološkog materijala sa tkanine, te samim tim i na količinu zaostale DNK u krvi na tkanini nakon pranja. Međutim, pokazano je da niska temperatura pranja od 30°C značajno smanjuje mogućnost delovanja deterdženta u smislu uklanjanja DNK iz krvne mrlje sa tkanine.

Analizom dobijenih rezultata pokazano je da postoji statistički značajna razlika u indeksu degradacije DNK istovremeno u odnosu na temperaturu pranja i primenu deterdženta, pri čemu ova značajnost postoji u grupi uzoraka pranih na 95°C i 60°C, ali ne i u grupi uzoraka pranih na 30°C. Prema tome, uporednom analizom svih dobijenih rezultata jasno se može zaključiti da pranje na temperaturi vode od 30°C onemogućava delovanje deterdženta kako u smislu uklanjanja biološkog materijala i smanjenja preostale količine DNK na tkanini, tako i u smislu ubrane degradacije DNK preostale u krvnoj mrlji na tkanini nakon pranja. Iz Grafikona 8 jasno se može zaključiti da postoji statistička interakcija temperature pranja i primene deterdženta u ukupnom delovanju na indeks degradacije DNK, što praktično znači da se efekti na degradaciju DNK sinergistički pojačavaju pri sadejstvu

ova dva faktora. Ovakav rezultat nema objašnjenja u aktuelnim referencama autora koji se bave predmetnom problematikom. Inače, poznato je da sapuni i deterdženti olakšavaju ekstrakciju DNK materijala iz spornih uzoraka krvi (Nasiri H, 2005) u realnim slučajevima pri DNK analizi, ali nije poznato da li i kako utiču na degradaciju same DNK. Pretpostavljeno je da je u aktuelnom eksperimentu deterdžent uzrokovao oštećenje membranoznih struktura ćelija krvi i „eksponiranje“ molekula DNK faktorima sredine, te samim tim njegovo brže propadanje sa protokom vremena, ali precizniji mehanizmi nisu mogli biti ustanovljeni. Međutim, ovakva pretpostavka nije potpuno održiva jer je daljom statističkom obradom rezultata pokazano da se efekti primene deterdženta na stepen degradacije DNK naročito ispoljavaju negde između 1 i 3 meseca nakon pranja okrvavljene tkanine (Grafikon 11). Isti ovakav trend dobijenih vrednosti je registrovan i u eksperimentalnoj podgrupi nakon 6 meseci od pranja. U literaturi uopšte nema potencijalnog objašnjenja ovakvih rezultata, tako da za sada ostaje nepoznanica zašto se izolovani efekat deterdženta na stepen degradacije molekula DNK u opranoj okrvavljenoj tkanini naročito potencira u periodu između jednog i tri meseca nakon pranja.

DNK profili eksperimentalnih uzoraka i odnos STR lokusa

Na grafikonima od 12 do 17 prikazana je međuzavisnost veličine i intenziteta signala pojedinih STR lokusa u dobijenim DNK profilima u odnosu na specifične karakteristike podgrupa eksperimentalnih uzoraka. Zapažena je obrnuto proporcionalna povezanost (prikazano trend linijama na grafikonima od 12 do 17) veličine STR lokusa prema intenzitetu njegovog signala dobijenom PCR reakcijom. Korelaciona analiza je pokazala da postoji statistički značajna negativna korelacija u grupi uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C i 60°C uz primenu deterdženta pri pranju u svim podgrupama (1 dan, 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja okrvavljene tkanine do analize). Takođe, postoji statistički značajna negativna korelacija i u grupi uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C i 60°C bez primene deterdženta pri pranju, ali za podgrupe 3 i 6 meseci od pranja okrvavljene tkanine do analize na 90°C, odnosno podgrupama 15 dana, 30 dana, 3 meseca i 6 meseci od pranja okrvavljene tkanine do analize na 60°C. Dakle, utvrđeno je da u ovim uzorcima veći STR lokusi u DNK profilu imaju značajno manji intenzitet signala. Najnovija istraživanja pokazuju da proces degradacije DNK verovatno podjednako i proporcionalno zahvata sve delove molekula DNK (Hanssen EN et al., 2017), što dalje znači da će pri nasumičnom

oštećenju molekula DNK više i češće biti pogođeni veći STR lokusi od kraćih, što će u krajnoj instanci rezultirati manjim intenzitetom većih STR lokusa u dobijenom DNK profilu. Prema tome, dobijeni rezultati u aktuelnom istraživanju govore u prilog tvrdnji da u ovim uzorcima (pranje na 95°C i 60°C, sa primenom deterdženta i bez njega) dolazi do statistički značajne degradacije DNK u krvi preostaloj na tkanini nakon pranja.

Međutim, u grupi uzoraka opranih na temperaturi vode od 30°C, bez obzira na primenu deterdženta pri pranju, registrovana je nepravilna i neobjašnjiva negativna korelacija za samo tri uzorka, dok je za ostale uzorke pokazano da nema takve statističke značajnosti, te se takav rezultat može smatrati slučajnim. Ovo je u saglasnosti sa drugim rezultatima ovog istraživanja, koji ukazuju na to da se efekti deterdženta ispoljavaju u smislu ubrzane degradacije molekula DNK na temperaturama od 95°C i 60°C, ali da izostaju na temperaturi od 30°C. To praktično znači da izolovani efekat deterdženta, bez aktiviranja na većoj temperaturi, ne ubrzava proces degradacije DNK u biološkom materijalu.

Komparacijom krivulja unutar grafikona 12 i 13 zapaženo je da svaka od krivulja ima prilično iregularan oscilirajući izgled. Međutim, unutar svakog od grafikona zapaženo je da krivulje starijih krvnih mrlja (duže vreme proteklo od pranja do početka analize) pokazuju tendenciju približavanja i manjeg osciliranja oko trend linije. Unutar svakog od grafikona zapaženo je i da krivulje, iako imaju iregularan oscilirajući izgled, imaju donekle sličan obrazac. Ta tendencija se najbolje uočava pri pranju na 95°C sa i bez deterdženta i pri pranju na 60°C uz primenu deterdženta (Grafikoni 12, 13 i 15), gde je inače i registrovan najveći indeks degradacije DNK. Međutim, poređenjem obrazaca kretanja krivulja na grafikonima u okviru grupa uzoraka opranih na temperaturi vode od 95°C sa deterdžentom i bez njega (Grafikoni 12 i 13) jasno se uočava da ova dva grafikona imaju značajno različite obrasce krivulja unutar svakog grafikona ponaosob. Prema tome, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da različiti eksperimentalni faktori u ovom istraživanju, odnosno temperatura vode i deterdžent, utiču na različite ciljne delove molekula DNK (različiti STR lokusi) i time ubrzavaju degradaciju DNK. Ovaj degradativni efekat ciljanog delovanja određenog faktora na specifične delove molekula DNK vremenom se gubi, što je utvrđeno postepenim i progresivnim približavanjem krivulja trend linijama sa protokom vremena (vreme proteklo od pranja okrvavljene tkanine do analize) unutar svakog od grafikona. To praktično znači da protok vremena, kao jedan od faktora koji nezavisno utiče na degradaciju DNK, preuzima ulogu glavnog faktora u procesu dalje degradacije DNK. Ovakav rezultat nije u

kontradiktornosti sa rezultatima drugih autora (Hanssen EN et al., 2017) koji su utvrdili da proces degradacije DNK verovatno uniformno zahvata sve delove DNK molekula. Naime, drugi autori su istraživali uniformnost degradacije DNK samo u starim biološkim uzorcima (uzorci stari par desetina godina), što je pokazano i rezultatima ovog istraživanja da već nakon 6 meseci od pranja okrvavljene tkanine degradacija DNK teži statističkoj uniformnosti, te se i intenziteti signala STR lokusa u DNK profilu značajno približavaju trend liniji. Dakle, rezultatima ovog istraživanja je pokazano da u ranoj fazi degradacija DNK zavisi dominantno od dejstvujućeg faktora (temperatura vode i deterdžent), ali da delovanje tog faktora nije nasumično već je više ciljano i usmereno ka određenim delovima molekula DNK, dok sa protokom vremena proces degradacije DNK više uniformno zahvata sve delove DNK.

ZAKLJUČCI

1. Jedno konvencionalno pranje okrvavljene pamučne tkanine, bez obzira na temperaturu pranja, upotrebu deterdženta i starost krvne mrlje, nije dovoljno da ukloni i vidljive i nevidljive tragove krvi sa tkanine.
2. U eksperimentalnim grupama (1, 3, 10 i 30 dana od nanošenja krvi na tkaninu do pranja) starije krvne mrlje se vizuelno teže uklanjaju konvencionalnim pranjem, ali se DNK materijal iz starijih krvnih mrlja lakše uklanja tokom istog procesa pranja.
3. U odnosu na vreme proteklo od nanošenja krvi na tkaninu do pranja (starost krvne mrlje) i istovremeno u odnosu na temperaturu pranja, indeks degradacije DNK nema konkluzivnu statističku zakonomernost.
4. Krvne mrlje na pamučnoj tkanini, zaostale nakon jednog konvencionalnog pranja, zadržavaju konture originalne krvne mrlje.
5. Stare krvne mrlje na pamučnoj tkanini nakon pranja zadržavaju jasnije i naglašenije konture u poređenju sa svežim krvnim mrljama.
6. Transfer krvi tokom procesa pranja iz okrvavljenog područja na čisto područje tkanine je izraženije ukoliko je krvna mrlja sveža, dok je diskretniji kod starijih krvnih mrlja.
7. Transfer krvi tokom procesa pranja iz okrvavljenog područja na čisto područje tkanine je diskretnije, difuzno i bez jasnih granica na višim temperaturama pranja (95 i 60°C), dok je izraženije, fokalno-mrljasto i bez jasnih kontura pri pranju na temperaturi vode od 30°C.
8. Razlikovanje područja originalne krvne mrlje od područja sekundarnog transfera krvi, nastalog pri pranju okrvavljene pamučne tkanine, moguće je na osnovu izgleda margine područja krvne mrlje.
9. Temperature vode od 95 i 60°C pri pranju okrvavljene pamučne tkanine uzrokuju bržu degradaciju DNK u krvi preostaloj nakon pranja, u poređenju sa pranjem na temperaturi vode od 30°C.
10. Primena deterdženta tokom pranja okrvavljene pamučne tkanine uzrokuje ubranu degradaciju DNK u preostaloj krvnoj mrlji na tkanini nakon pranja, pri čemu je taj efekat evidentan između jednog i tri meseca nakon pranja.

11. Više temperature pranja (95 i 60°C) i primena deterdženta pri pranju okrvavljene pamučne tkanine pokazuju sinergističko dejstvo na ubranu degradaciju DNK u krvi preostaloj nakon pranja.
12. Pranje na temperaturi vode od 30°C onemogućava delovanje deterdženta, kako u smislu smanjenja količine DNK na tkanini, tako i u smislu ubrzane degradacije molekula DNK preostalog na tkanini nakon pranja.
13. Proces degradacije DNK u ranoj fazi zavisi dominantno od glavnog faktora (temperatura vode i deterdžent) koji uzrokuje degradaciju i to ciljano ka određenim delovima molekula DNK (određeni STR lokusi), dok sa protokom vremena proces degradacije kasnije više statistički uniformno zahvata sve delove molekula DNK.

PREPORUKE

Istraživanjem je potvrđena opravdanost pregleda odevnih predmeta u laboratoriji za biološke tragove, bez obzira na to da li je osumnjičeni pokušao da ukloni tragovi sa odeće, jer se tragovi krvi na pamučnoj tkanini u 100% slučajeva zadržavaju u određenoj meri nakon jednog konvencionalnog pranja. Dakle, nepostojanje vidljivih tragova u vidu krvnih mrlja nije dokaz nepostojanja tragova krivičnog dela.

Analitičarima u laboratoriji preporučuje se posebna obazrivost pri pregledu oprane odeće, jer registrovanje specifičnih kontura vidljivih krvnih mrlja može ukazati na mesto i prvobitni originalni oblik krvnih mrlja na pamučnoj odeći. Posebnu pažnju analitičar treba da usmeri na intreprerataciju sekundarnog transfera krvi sa mesta originalne krvne mrlje na neokrvavljene delove tkanina. Sekundarni transfer sa okrvavljenog na neokrvavljeni deo tkanine, nastao tokom procesa pranja, BPA analitičar treba da interpretira isključivo u sklopu rezultata standardne i dopunske DNK analitike, kao i podataka o načinu pranja. Uz ovakav pristup, analitičar BPA je sada u mogućnosti da da pouzdanije odgovore o mogućim vremenskim okvirima nastanka tragova krvi na ispitivanim pamučnim predmetima.

Pri tome, u slučajevima kada je to moguće, treba savetovati istražne organe da prikupe informacije o načinu na koji je izvršen pokušaj prikrivanja tragova (mašinsko ili ručno pranje, temperatura vode, vreme i dužina pranja, primena deterdženta, ponovljeno pranje, starost krvne mrlje i dr.), čime bi se olakšala interpretacija rezultata dobijenih BPA veštačenjem i DNK analizom.

S obzirom na to da je utvrđeno da pranje okrvavljene pamučne tkanine ubrzava proces degradacije DNK u preostaloj krvi na tkanini, preporučuje se ispitivanje predmeta od interesa u laboratoriji za biološke tragove u što kraćem vremenskom intervalu po izuzimanju samih predmeta sa lica mesta. Svakako, s obzirom na to da je dokazano da primena deterdženta pri pranju značajno ubrzava proces degradacije DNK nakon protoka perioda vremena dužeg od mesec dana od pranja, to i sam period od kritičnog događaja i eventualnog pokušaja prikrivanja tragova do početka laboratorijske analize, treba u praksi da bude kraći od mesec dana.

Preporuka za buduća istraživanja je ispitivanje uticaja različitih tipova tkanine i vlakana na izgled krvnih mrlja i degradaciju DNK nakon pranja okrvavljene tkanine.

LITERATURA

Anderson S, Howard B, Hobbs GR, Bishop CP. A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Sci Int.* 2005; 148: 37-45.

Arjun RI, Ashish P. Identification of blood stains on different fabrics after washing with routinely used detergents in india. *Aust J Forensic Sci.* 2016; 1(1): 1-5.

Andrews C, Coquoz R. PCR DNA typing of washed stains. In: Bär W, Fiori A, Rossi U (eds) *Advances in forensic haemogenetics 5.* Springer Verlag, Heidelberg. 1994; pp. 343-345.

Attingera D, Moore C, Donaldson A, Jafari A, Stone HA. Fluid dynamics topics in bloodstain pattern analysis: Comparative review and research opportunities. *Forensic Sci Int.* 2013; 231(1-3): 375-396.

Bandyopadhyay SK, Chowdhury GR. Analysis of bloodstain patterns at the crime scene due to arterial bleeding. *Int J Dev Res.* 2017; 7(1): 10978-10983.

Barrett K, Brooks H, Boitano S, Barman S. *Ganong's Review of Medical Physiology, Twenty-Fifth Edition.* The United States: McGraw-Hill Education. 2015.

Bevel T & Gardner RM. *Bloodstain Pattern Analysis with an Introduction to Crime Scene Reconstruction.* The United States: CRC Press. 2008.

Betz P, Peschel O, Stiefel D, Eisenmenger W. Frequency of blood spatters on the shooting hand and of conjunctival petechiae following suicidal gunshot wounds to the head. *Forensic Sci Int.* 1995; 76: 47-53.

Breithaupt J. *Physics.* Cheltenham, United Kingdom: Nelson Thornes Ltd. 2001.

Bright JA, Taylor D, Curran JM, Buckleton JS. Degradation of forensic DNA profiles. *Aust J Forensic Sci.* 2013; 45(4): 445-449.

Comiskey PM, Yarin AL, Attinger D. Hydrodynamics of back spatter by blunt bullet gunshot with a link to bloodstain pattern analysis. *Phys Rev Fluids.* 2017; 2(7): e073906.

Creamer JJ, Quickenden TI, Crichton LB, Robertson P, Ruhayel RA. Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence.* 2005; 20(6): 411-413.

De Castro TC. Chapter Seven - Forensic Interpretation of Bloodstains on Fabrics; in Forensic Textile Science. United Kingdom: Woodhead Publishing. 2017.

Drösser C. Soll man Blutflecken ausschließlich mit kaltem Wasser entfernen und mit heißem? Die Zeit. 2013: Ausgabe 31.

Edler C, Gehl A, Kohwagner J, Walther M, Krebs O, Augustin C, Klein A. Blood trace evidence on washed textiles - a systematic approach. Int J Legal Med. 2017; 131(4): 1179-1189.

Goray M, Eken E, Robert J, Mitchell RJ, van Oorschot RAH. Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions. Forensic Sci Int Genet. 2010; 4: 62–67.

Gross AM, Harris KA, Kaldun GL. The effect of luminol on presumptive tests and dna analysis using the polymerase chain reaction. J Forensic Sci. 1999; 44(4): 837-840.

Hall JE & Guyton AC. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia (PA): Elsevier. 2016.

Hanssen EN, Lyle R, Egeland T, Gill P. Degradation in forensic trace DNA samples explored by massively parallel sequencing. Forensic Sci Int Genet. 2017; 27: 160-166.

Halverson M. Introduction to DNA and Bloodstain Pattern Analysis [Internet]. Available at: <https://iacountyme.org/wp-content/uploads/2013/01/Halvorsen.pdf> Accessed: 14.01.2020. godine.

Helmus J, Pfeifer M, Feiner LK, Krause LJ, Bajanowski T, Poetsch M. Unintentional effects of cleaning a crime scene—when the sponge becomes an accomplice in DNA transfer. Int J Legal Med. 2019 May; 133(3): 759-765.

Helmus J, Zorell S, Bajanowski T, Poetsch M. Persistence of DNA on clothes after exposure to water for different time periods-a study on bathtub, pond, and river. Int J Legal Med. 2017; 132: 99-106.

<https://4.files.edl.io/cb33/12/04/18/024632-f1825142-4736-4f64-8a06-7fcaffed13c2.pdf>

Accessed: 16.01.2020. godine.

<http://aboutforensics.co.uk/2015/05/28/bloodstain-pattern-analysis/> Accessed: 16.01.2020. godine.

<http://bloodspatter.com/bloodstain-tutorial> Accessed: 16.05.2019. godine.

https://hemospat.com/bloodstain-pattern-analysis-terminology/?org=SWGSTAIN&term=drip_pattern Accessed: 16.01.2020. godine.

https://hemospat.com/bloodstain-pattern-analysis-terminology/?org=SWGSTAIN&term=expiration_pattern Accessed: 14.01.2020. godine.

https://hemospat.com/bloodstain-pattern-analysis-terminology/?org=SWGSTAIN&term=swipe_pattern Accessed: 16.01.2020. godine.

https://hemospat.com/bloodstain-pattern-analysis-terminology/?org=SWGSTAIN&term=wipe_pattern Accessed: 16.01.2020. godine.

<https://hemospat.com/bloodstain-pattern-analysis-terminology/?org=SWGSTAIN&term=void> Accessed: 14.01.2020. godine.

<http://www.sharan-camera.com/what-does-crime-scene-cleanup-involve/> Accessed: 16.01.2020. godine.

International association of bloodstain pattern analysts. [Internet]. Available at: <https://iabpa.org/uploads/files/Translated%20Docs/BPA%20terms-%20Serbian%20translation.pdf> Accessed: 03.04.2019. godine.

Jain P, Singh HP. Detection and origin of blood stains on various types of cloth immersed in water for a prolonged period. Can Soc Forensic Sci J. 1984; 17(2): 58-60.

James SH, Kish PE, Sutton TP. Principles of bloodstain pattern analysis – theory and practice. Boca Raton FL: CRC Press Taylor and Francis Group. 2005.

Kamphausen T, Fandel SB, Gutmann JS, Bajanowski T, Poetsch M. Everything clean? Transfer of DNA traces between textiles in the washtub. Int J Legal Med. 2015 July; 129(4): 709-714.

Kulstein G, Wiegand P. Comprehensive examination of conventional and innovative body fluid identification approaches and DNA profiling of laundered blood- and saliva-stained pieces of cloths. Int J Legal Med. 2018 Jan; 132(1): 67-81.

Laan N, de Bruin KG, Slenter D, Wilhelm J, Jermy M, Bonn D. Bloodstain Pattern Analysis: implementation of a fluid dynamic model for position determination of victims. *Sci. Rep.* 2015; 5: 11461.

Leak G. How confident are we that all bloodstains present on clothing relate to the scene? Presentation at 3rd European IABPA Conference. Lisbon. 2010.

Lee HC, Ladd C. Preservation and collection of biological evidence. *Croat Med J.* 2001; 42: 225-228.

Lee HC, Ladd C, Scherczinger C, Bourke M. Forensic applications of DNA typing: part 2 collection and preservation of DNA evidence. *Am J Forensic Med Pathol.* 1998 Mar; 19(1): 10-18.

Li R. *Forensic serology.* CRC Press, Boca Raton. 2015.

Luche C, Jordan R & Larkin T. Recovery of Bloodstain Patterns from Arson Scenes: Does Soot Removal Using Liquid Latex Damage Underlying Bloodstains? *J Can Soc Forensic Sci.* 2011; 44(2): 47-58.

Madea B et al. *Handbook of forensic medicine.* The United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd. 2014.

Meakin G, Jamieson A. DNA transfer: review and implications for casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7: 434-443.

Miles HF, Morgan RM, Millington JE. The influence of fabric surface characteristics on satellite bloodstain morphology. *Sci Justice.* 2014; 54(4): 262-266.

Mushtaq S, Rasool N, Firiyal S. Detection of dry bloodstains on different fabrics after washing with commercially available detergents. *Aust J Forensic Sci.* 2016; 48(1): 87-94.

Nakao KI, Shimada R, Hara K, Kibayashi K. Experimental study on age estimation of bloodstains based on biological and toxicological analysis. *The Open Forensic Science Journal.* 2013; 6: 6-11.

Nasiri H, Forouzandeh M, Rasae MJ, Rahbarizadeh F. Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction From Whole Blood Using Laundry Detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005; 9: 229–232.

Peschel O, Kunz SN, Rothschild MA, Mutzel E. Blood stain pattern analysis. *Forensic Sci Med Pathol*. 2011; 7(3): 257-270.

Pizzola PA, Roth S, De Forest PR. Blood droplet dynamics I. *J Forensic Sci*. 1986 Jan; 31(1): 36-49.

Pizzola PA, Roth S, De Forest PR. Blood droplet dynamics II. *J Forensic Sci*. 1986 Jan; 31(1): 50-64.

Ramsthaler F, Schmidt P, Bux R, Potente S, Kaiser C, Kettner M. Drying properties of bloodstains on common indoor surfaces. *Int J Legal Med*. 2012; 126: 739-746.

Ramsthaler F, Schlote J, Wagner C, Fiscina J, Kettner M. The ring phenomenon of diluted blood droplets. *Int J Legal Med*. 2016; 130(3): 731–736.

Raymond MA, Smith ER, Liesegang J. The physical properties of blood – forensic considerations. *Sci Justice*. 1995; 36(3): 153-160.

Salahuddin Z, Yasir Zahoor M, Kalsoom S, Rakha A. You can't hide encoded evidence: DNA recovery from different fabrics after washing. *Aust J Forensic Sci*. 2018; 50: 355-360.

Sirker M, Schneider PM, Gomes I. A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *Int J Legal Med*. 2016; 130: 1431-1438.

Slemko J. Bloodstains on fabrics. *IABPA News*. 2003; 19(4): 3-11.

Slemko J. Bloodstain Tutorial. J. Slemko Forensic Consulting Inc. [Internet]. Available at: http://www.bloodspatter.com/uploads/files/images/general_images/BPATut2.jpg

Spector J, Von Gemmingen D. The effect of washing on the detection of blood and seminal stains. *Can Soc Forensic Sci J*. 1971; 4: 3-9.

Stojanović I. Detection of bloodstains on cotton fabric after washing. *Acta medica Medianae*. 2019; 58(1): 24-27.

SWGSTAIN (Scientific Working Group on Bloodstain Pattern Analysis). Recommended terminology. *Forensic Science Communications*. 2009; 11(2).

SWGSTAIN (Scientific Working Group on Bloodstain Pattern Analysis) Research Subcommittee. Current research needs for bloodstain pattern analysis. Available at: www.swgstain.org/documents. 2011.

Thabet HZ, Ghandour NM, Salama RH. Effect of some cleaning products on blood dna retrieval from cloth. *Egypt J Forensic Sci Appl Toxicol*. 2018 Jun; 18(2): 53-66.

Tobe SS, Watson N, Nic Daeid N. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci*. 2007; 52(1): 102-109.

Tontarski KL, Hoskins KA, Watkins TG, Brun-Conti L, Michaud AL. Chemical enhancement techniques of bloodstain patterns and DNA recovery after fire exposure. *J Forensic Sci*. 2009; 54(1): 37-48.

Vennemann M, Scott G, Curran L, Bittner F, Tobe SS. Sensitivity and specificity of presumptive tests for blood, saliva and semen. *Forensic Sci Med Pathol*. 2014; 10(1): 69–75.

Webb JL, Creamer JJ, Quickenden TI. A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence*. 2006 Jul-Aug; 21(4): 214-220.

Xingyu Li, Jingyao Li, Stephen Michielsen. Effect of yarn structure on wicking and its impact on bloodstain pattern analysis (BPA) on woven cotton fabrics. *Forensic Sci Int*. 2017; 276: 41-50.

Biografija autora

Ivan Stojanović je rođen 10. avgusta 1981. godine u Vranju. Detinjstvo je proveo u Vladičinom Hanu, gde je završio Osnovnu školu „Sveti Sava“ kao nosilac Vukove diplome. Nakon toga je pohađao prirodno-matematički smer gimnazije „Jovan Skerlić“ u Vladičinom Hanu, a školovanje je završio kao nosilac Vukove diplome. Integrisane studije medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu upisao je 2000. godine, a studije je završio 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,51. Tokom studija je bio demonstrator na predmetu anatomija u trajanju od 4 godine i to od 2002-2006. godine. Obavljao je funkciju predsednika CNIRS-a u Savezu studenata tokom školske 2004/2005. godine, dok je u školskoj 2005/2006. godini obavljao funkciju predsednika Saveza studenata Medicinskog fakulteta. Autor i koautor je nekoliko studentskih radova, učesnik je studentskih kongresa i dobitnik je dve Zahvalnice Medicinskog fakulteta za postignute rezultate tokom studija. Radni odnos je zasnovao 17. septembra 2007. godine u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu, gde je i sada u radnom odnosu. Specijalizaciju iz sudske medicine je upisao 2009. godine i završio je 2013. godine. Trenutno u Zavodu obavlja poslove na radnom mestu rukovodioca *Odeljenja za identifikaciju očitstva, bioloških i drugih tragova*.

Bio je angažovan na dva interna projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (2016-2018. godina, broj 18; 2017-2019. godina, broj 22), dok je imao angažovanje i na jednom projektu Ministarstva zdravlja Republike Srbije (2008. godina, broj 401-00-928/2008-07).

Ima pravo članstva u MENSA-i od 2005. godine, kada je uspešno završio neophodna testiranja. Član je Srpskog lekarskog društva od 2007. godine. Izabran je za sekretara Sekcije za sudsku medicinu Srpskog lekarskog društva 2015. godine i tu funkciju je obavljao sve do 2019. godine. Završio je Osnovni kurs Analize obrazaca krvnih mrlja (eng. Basic course: Bloodstain pattern analysis) u Holandiji tokom 2015. godine. Odmah zatim je primljen u članstvo Međunarodne asocijacije analitičara obrazaca krvnih mrlja. Potom je završio i Napredni kurs Analize obrazaca krvnih mrlja (eng. Advanced course: Bloodstain pattern analysis) takođe u Holandiji tokom 2018. godine.

Autor je i koautor više naučnih publikacija u recenziranim časopisima, od kojih 7 radova u kategoriji M20 i 7 radova u kategoriji M50.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ НАЧИНА ПРАЊА ОКРВАВЉЕНЕ ТКАНИНЕ НА ЕКСПЕРТИЗУ

ТРАГОВА КРВНИХ МРЉА И РЕЗУЛТАТ ДНК АНАЛИЗЕ

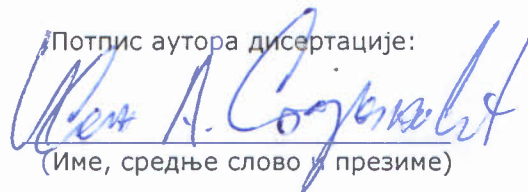
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:



(Име, средње слово и презиме)

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСЛОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

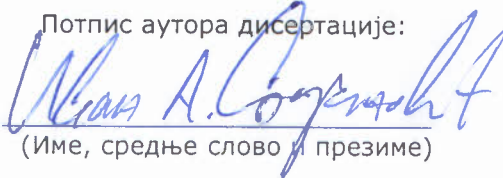
Наслов дисертације:

УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ НАЧИНА ПРАЊА ОКРВАВЉЕНЕ ТКАНИНЕ НА ЕКСПЕРТИЗУ
ТРАГОВА КРВНИХ МРЉА И РЕЗУЛТАТ ДНК АНАЛИЗЕ

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:


(Име, средње слово и презиме)

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ НАЧИНА ПРАЊА ОКРВАВЉЕНЕ ТКАНИНЕ НА ЕКСПЕРТИЗУ ТРАГОВА КРВНИХ МРЉА И РЕЗУЛТАТ ДНК АНАЛИЗЕ

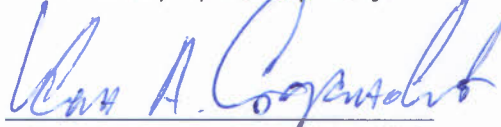
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)¹**

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:


(Име, средње слово и презиме)

¹ Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.