

# THE “STRANGE” WORLD OF BLOODSTAIN CELLS. A BRIEF OVERVIEW OF HAEMOTAPHONOMY

Policarp HORTOLÀ

*Area of Prehistory, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain*

**ABSTRACT:** Mammals are the only vertebrates that have anucleate red blood cells (RBC's). In this zoological class, RBC's typically have the shape of biconcave discs. The cytomorphological study of RBCs in bloodstains is an issue with implications in fields such as forensic biology or prehistoric archaeology. Using scanning electron microscopy, the author has pioneered a new approach to the study of bloodstains, which has led moreover to a general terminology and systematics for smear-origin mammalian RBC's. This paper summarises the results of more than 10 years of research in this field, by presenting the main morphological features of mammalian erythrocytes, when in smears.

**KEY WORDS:** Red blood cells; Scanning electron microscopy; Blood smears; Organic residues.

*Problems of Forensic Sciences, vol. LVII, 2004, 16–23*  
*Received 3 December 2003; accepted 30 December 2003*

## INTRODUCTION

Vertebrate blood (i.e. blood, in the strict sense) is a suspension of cells (erythrocytes or red blood cells, leukocytes or white blood cells, and thrombocytes or platelets) in a fluid medium (plasma). Unlike other vertebrates, mammals have anucleate erythrocytes [15]. Due to this lack of nucleus, typical mammalian red blood cells (RBC's) have a biconcave disc shape (discocytes). This does not apply to the *Camelidae* family, where RBC's are oval (ovalocytes) [1]. Other physiological shapes – which are minor or pathologic – are: echinocytes (burr or berry cells), dacryocytes (tear drop cells), schizocytes (helmet cells), keratocytes (horn cells), drepanocytes (sickle cells), and many others [2, 3, 4, 5, 15, 20].

The presence of residues on implements is consistent with the well-known criminalistic principle – Locard's Principle of Exchange (“every contact leaves traces”). Indeed, the occurrence of morphological preservation of anucleate, mammalian RBC's in bloodstains has been reported even in palaeolithic tools, estimated to date back as far as 2 million years [17].

## HAEMOTAPHONOMY: A NEW APPROACH TO THE STUDY OF BLOODSTAINS

The term haemotaphonomy was proposed by the author to refer to "the study of bloodstains, and especially of the changes in appearance and size of the cellular components, as well as the characteristics of their cell position and appearance in function of the superficial topography and composition of the substrate" [8]. Thus, the author has carried out a new approach to the study of bloodstains by showing their RBC shapes using scanning electron microscopy (SEM) [8, 9, 10, 11, 12, 13].

This new approach was mainly carried out with a prehistoric bias. Mammals were chosen as the target taxon because this zoological class has long been assumed to be the major animal biomass source for prehistoric man [6, 16, 21]. All the specimens were single coated with gold except for the oldest samples, which were doubly coated with carbon and gold to increase resolution [13]. Then, the specimens were SEM analysed via secondary electrons at an accelerating voltage of 15 kV, except for the thicker smears, which were analysed at 10 kV to decrease electrostatic charge [12]. Furthermore, particular results of this research have led to the creation of general terminology and systematics for smear-origin mammalian erythrocytes (Figure 1). Although this systematics primarily concerns mammals, this does not exclude the possibility that it could be also suitable for other vertebrate taxa [13].

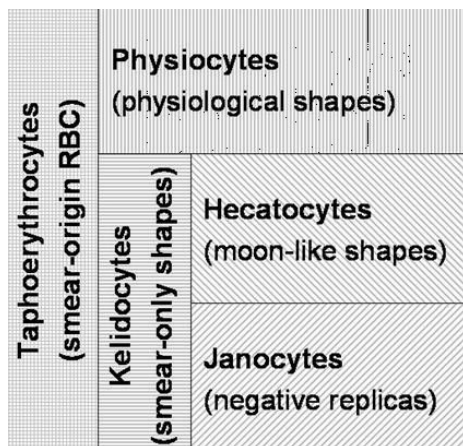


Fig. 1. Systematics for erythrocytes in mammalian bloodstains. This systematics could possibly apply to RBC's in smears from other vertebrates too.

Most of the observed smear-origin RBC shapes have the same morphology as RBC's described in haematology. However, two time-independent RBC shapes are interpreted as being specifically due to blood drying phe-

nomena. Thus, the following morphologies are considered as characteristic of mammalian RBCs in bloodstains: moon-like shapes or hecatocytes (Figure 2), which could be due to erythrocyte-plasma interaction when drying (fracturing), and negative replicas or janocytes (Figure 3), which could be related to the dried plasma matrix (imprinting). The morphology of the corpuscles in suspected “clump” aggregates can also be easily examined under an SEM (Figure 4).

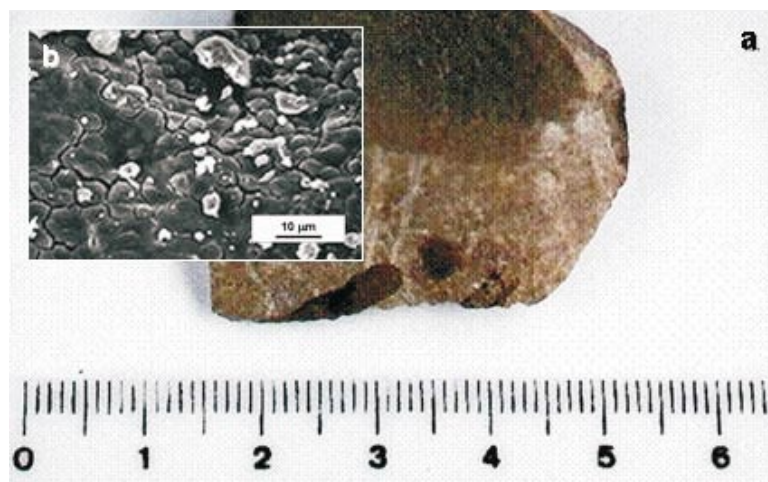


Fig. 2. Author's blood on limestone. Stored unburied, indoors for 8 years and 9 months. a) View through a reflex camera with macrophotography system. b) Moon-like shapes as seen under an SEM. This electron micrograph is a rotated detail with respect to that first exhibited as Fig. 2 c on page 736 in Hortolà 2002 [12]; reprinted from *Journal of Archaeological Science*, vol. 29, Policarp Hortolà, Red blood cell haemotaphonomy of experimental human bloodstains on techno-prehistoric lithic raw materials, pp. 733–739, Copyright (2002), with permission from Elsevier.

Due to the role that drying plays in the appearance of hecatocytes and janocytes, they obviously cannot be found under physiological conditions. At the same time, due to the cause of these shapes found in smears – i.e., fracturing and imprinting of cells in the drying plasma – it is not expected that the presence of a nucleus in non-mammal vertebrates will result in changes in the shapes with respect to the presented systematics for mammalian RBCs.

The main factors which, *a priori*, could seem to affect the morphological integrity of RBCs in bloodstains are time and climate variables. However, the results of haemotaphonomical research indicate that a time span (of ageing) of up to 10 years or even more does not have a negative effect on the general preservation of the RBCs. In this respect, the high level of erythrocyte preservation exhibited in the examined erythrocytes indicates that dried blood tissue is homologous or analogous to mummified blood. In a similar way, it

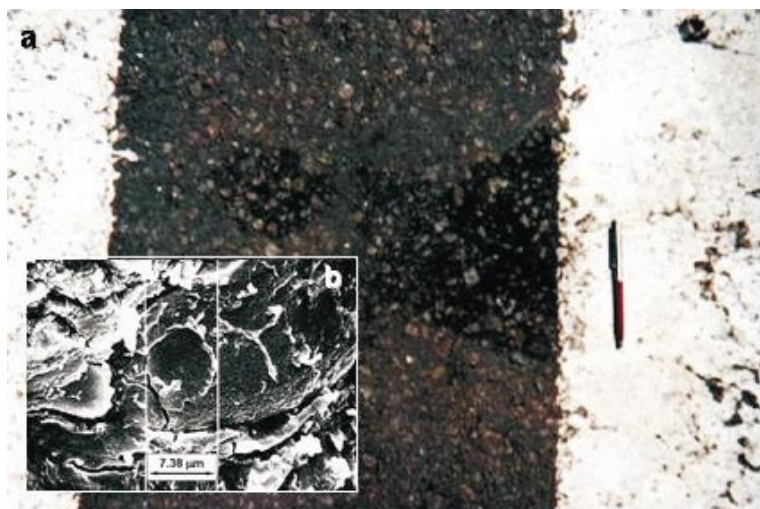


Fig. 3. Suspected human blood on urban asphalt. About 8 months *in situ*, in open air. a) Viewed by the naked eye (photograph taken with an autofocus camera using 40 × 40 mm film). Pen length is 13.8 cm. b) Negative replicas as seen under an SEM. This electron micrograph was first exhibited in Hortolà 1994 [9]; first published by *Microscopy and Analysis* in March 1994, issue no. 40, pp. 19–21, Fig. 4 on page 21 (UK edition) and issue no. 28, pp. 21–23, Fig. 4 on page 23 (European edition), reproduced with permission from the Editor.

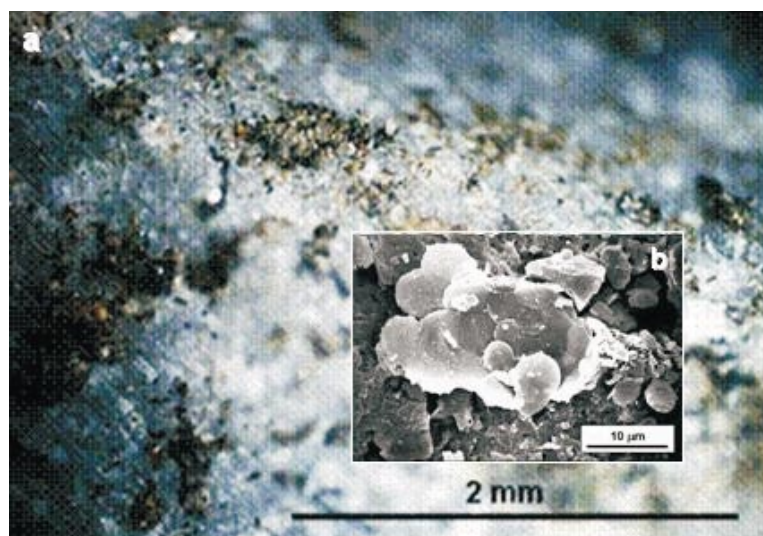


Fig. 4. Blood from Dorcas gazelle (*Gazella dorcas* L., family *Bovidae*) on white chert. Stored buried, outdoors for 1 year. a) View under a low-power stereobinocular microscope. b) Suspected RBC “clump” aggregate as seen under an SEM. This electron micrograph is a broader view with respect to that first exhibited as Fig. 8 on page 101 in Hortolà 2001 [10]; published in *Environmental Archaeology*, vol. no. 6, pp. 99–104.

may be concluded from these results that, at least in a Mediterranean climate, neither fluctuating temperatures nor relative humidities affect general preservation of RBC's.

## CONCLUSION

Cytomorphological studies of RBC's in bloodstains have implications in fields such as forensic biology and prehistoric archaeology. In forensic biology, the presence of RBC's in a smear is considered to be confirmation of the presence of blood [7]. In turn, in prehistoric archaeology, the presence of blood on an artefact provides the possibility of recovering ancient DNA [18]. Despite these facts, interest in bloodstain analysis has largely been focused on the molecular level, even in the case of prehistoric research [14, 19, 22]. Meanwhile, knowledge of the morphological characteristics of bloodstain-origin RBC has not been taken into account. However, haemotaphonomy – with its SEM analysis of taphoerythrocytes – constitutes a new field that allows us to uncover cytomorphologic secrets hidden in bloodstains from the past to the present.

### References:

1. Banks W. J., Applied veterinary histology, Williams & Wilkins, Baltimore 1981.
2. Barnhart M. I., Wallace M. A., Lusher J. M., Red blood cells, [in:] Biomedical research applications of scanning electron microscopy, vol. 3, Hodges G. M., Carr K. E. [eds.], Academic Press, London 1983.
3. Bessis M., Corpuscles: atlas of red blood cell shapes, Springer, Berlin 1974.
4. Bull B. S., Breton-Gorius J., Morphology of the erythron, [in:] Williams hematology, Beutler E., Lichtman M. A., Coller B. S. [et al.; eds.], McGraw-Hill, New York 1995.
5. Castoldi G. L., Erythrocytes, [in:] Atlas of blood cells: function and pathology, Zucker-Franklin D., Greaves M. F., Grossi C. E. [et al; eds.], Ermes/Lea & Febiger, Milano 1981.
6. Davis S. J. M., The archaeology of animals, Yale University Press, New Haven 1987.
7. Fiori A., Detection and identification of bloodstains, [in:] Methods of forensic science, vol. 1, Lundquist F. [ed.], John Wiley & Sons, New York 1962.
8. Hortolà P., SEM analysis of red blood cells in aged human bloodstains, *Forensic Science International* 1992, vol. 55, pp. 139–159.
9. Hortolà P., SEM characterization of blood stains on stone tools, *The Microscope* 1992, vol. 40, pp. 111–113.

10. Hortolà P., Application of SEM to the study of red blood cells in forensic bloodstains, *Microscopy and Analysis* 1994, vol. 40, pp. 19–21.
11. Hortolà P., Experimental SEM determination of game mammalian bloodstains on stone tools, *Environmental Archaeology* 2001, vol. 6, pp. 99–104.
12. Hortolà P., Morphological characterisation of red blood cells in human bloodstains on stone: a systematical SEM study, *Anthropologie* 2001, vol. 39, pp. 235–240.
13. Hortolà P., Red blood cell haemotaphonomy of experimental human bloodstains on techno-prehistoric lithic raw materials, *Journal of Archaeological Science* 2002, vol. 29, pp. 733–739.
14. Hyland D. C., Tersak J. M., Adovasio J. M. [et al.], Identification of the species of origin of residual blood on lithic material, *American Antiquity* 1990, vol. 55, pp. 104–112.
15. Jain N. C., Schalm's veterinary hematology, Lea & Febiger, Philadelphia 1986.
16. Klein R. G., Reconstructing how early people exploited animals: problems and prospects, [in:] The evolution of human hunting, Nitecki M. H., Nitecki D. V. [eds.], Plenum Press, New York 1987.
17. Loy T. H., Organic residues on Oldowan tools from Sterkfontein Cave, South Africa, [in:] Dual congress of the International Association for the Study of Human Paleontology, and International Association of Human Biologists, Raath M. A., Soodyall H., Barkhan K. L. K. D. [et al.; eds.], Department of Anatomical Sciences, University of the Witwatersrand Medical School, Johannesburg 1998.
18. Loy T. H., Dixon E. J., Blood residues on fluted points from eastern Beringia, *American Antiquity* 1998, vol. 63, pp. 21–46.
19. Newman M., Julig P., The identification of protein residues on lithic artifacts from a stratified boreal forest site, *Journal Canadien d'Archéologie / Canadian Journal of Archaeology* 1989, vol. 13, pp. 119–132.
20. Rozman C., Woessner S., Feliu E. [et al.], Cell ultrastructure for hematologists, Doyma, Barcelona 1993.
21. Straus L. G., Hunting in Late Upper Paleolithic Western Europe, [in:] The evolution of human hunting, Nitecki M. H., Nitecki D. V. [eds.], Plenum Press, New York 1987.
22. Tuross N., Barnes I., Potts R., Protein identification of blood residues on experimental stone tools, *Journal of Archaeological Science* 1996, vol. 23, pp. 289–296.

# „DZIWNY” ŚWIAT ELEMENTÓW KOMÓRKOWYCH PŁAM KRWAWYCH. WPROWADZENIE DO HEMOTAFONOMII

Policarp HORTOLÁ

## WSTĘP

Krew kręgowców, a więc krew *sensu stricto*, jest zawiesiną komórek (erytrocytów zwanych czerwonymi krwinkami, leukocytów, zwanych białymi krwinkami i trombocytów, zwanych płytkami krwi) w płynnym medium (osoczu). W przeciwieństwie do innych kręgowców, ssaki posiadają bezjądrzaste erytrocyty [15]. W związku z brakiem jądra komórkowego, typowe czerwone krwinki (ang. RBCs) ssaków posiadają kształt dwuwklęsłych dysków (normocyty). Wyjątek stanowią zwierzęta z rodziny *Camelidae*, w przypadku których czerwone krwinki mają kształt owalny (owalocyty) [1]. Inne kształty fizjologiczne, które są rzadkie lub patologiczne, posiadają: echinocyty, lakrymocyty, schizocyty, akantocyty, drepanocyty i wiele innych [2, 3, 4, 5, 15, 20].

Z drugiej strony, obecność różnych pozostałości na przedmiotach zgadza się z powszechnie znaną w kryminalistyce zasadą wymiany Locarda (ang. Locards's principle of exchange), która mówi, iż „każdy kontakt pozostawia ślady”. Idąc tym tropem, występowanie utrwalonych pod względem morfologii bezjądrzastych czerwonych krwinek ssaków w plamach krwi wykazano nawet na narzędziach z okresu paleolitycznego, których wiek oszacowano na 2 miliony lat [17].

## HEMOTAFONOMIA: NOWE PODEJŚCIE DO ANALIZY PŁAM KRWI

Pojęcie hemotafonomii zostało zaproponowane w odniesieniu do „badania plam krwawych, a w szczególności zmian w wyglądzie i rozmiarach ich elementów komórkowych, jak również takich właściwości, jak położenie komórek i ich wygląd, w zależności od powierzchniowej topografii i składu podłoża” [8]. Autor cytowanej pracy opracował nowe podejście badania plam krwawych poprzez analizę kształtów erytrocytów z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) [8, 9, 10, 11, 12, 13].

Podejście to było głównie stosowane do materiału pochodzącego z czasów prehistorycznych. Jako docelową jednostkę taksonomiczną do prowadzonych badań wybrano ssaki, co spowodowane było faktem, iż ta właśnie grupa zwierząt stanowiła, zgodnie z danymi naukowymi, główne źródło biomasy zwierzęcej dla prehistorycznego człowieka [6, 16, 21]. Próbki badawcze pokrywano pojedynczą warstwą złota. Wyjątek stanowiły najstarsze próbki, które, w celu podniesienia rozdzielczości, pokrywano warstwą węgla oraz złota [13]. Tak przygotowane próbki analizowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego, stosując drugi strumień elektronów przy napięciu przyspieszającym 15 kV. W przypadku cienkich rozmazów, w celu obniżenia pola elektrostatycznego, stosowano niższe napięcie – 10 kV [12]. Poszczególne wyniki prowadzonych eksperymentów doprowadziły do powstania zasadniczej terminologii i systematyki erytrocytów ssaków pochodzących z rozmazów

(rycina 1). Mimo, że stworzona systematyka odnosi się zasadniczo do ssaków, to nie należy wykluczać jej użyteczności również dla innych grup taksonomicznych zwierząt kręgowych [13].

Większość kształtów krwinek czerwonych, które zaobserwowano w rozmazach, jest zgodna pod względem morfologii z tymi, które opisuje hematologia. Jednak gena za dwóch rodzajów kształtów erytrocytów, które – jak stwierdzono – nie są zależne od czasu naniesienia krwi, jest przypisywana zjawisku wysychania plamy krwi. Morfologie rozważane jako charakterystyczne dla erytrocytów ssaków obecnych w plamach krwi, to: hekatocyty (kształtami przypominające księżyc) – rycina 2, które prawdopodobnie powstają na skutek oddziaływania erytrocytów z osoczem podczas suszenia (pęknięcie) oraz janocyty (negatywne repliki) – rycina 3, których powstawanie prawdopodobnie związane jest z wysuszoną macierzą osocza (piętnowanie). Morfologia krwinek w podejrzanych agregatach – „kępkach” – może być z łatwością analizowana z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (rycina 4).

W związku z rolą, jaką odgrywa suszenie w powstawaniu hekatocytów oraz janoocytów, oczywiście jest, iż formy te nie mogą być znalezione w warunkach fizjologicznych. Podobnie, w związku z pochodzeniem tych dwóch kształtów charakteryzujących rozmazy, a wynikającym z pęknięcia i piętnowania komórek w schnącym osoczu, nie należy oczekiwać, że obecność jądra komórkowego u kręgowców nie należących do ssaków będzie wywoływać zmiany w tych kształtach względem systematyki stworzonej dla erytrocytów ssaków.

Głównymi czynnikami, które niejako *a priori* wydają się wpływać na morfologiczną integralność czerwonych krwinek w plamach krwi, są: czas oraz zmienne klimatyczne. Wyniki prezentowanych tutaj badań hemotafonomicznych świadczą jednak o tym, że czas starzenia się rozmazów, wynoszący co najmniej 10 lat, nie wpływa negatywnie na ogólne utrwalenie erytrocytów. Pod tym względem wysoki stopień zachowania erytrocytów w badanych plamach pokazuje, że wysuszona krew jest homologiczna lub analogiczna do krwi zmumifikowanej. Uzyskane wyniki badań wskazują, że co najmniej w przypadku klimatu śródziemnomorskiego ani zmieniające się temperatury, ani relatywnie wysoka wilgotność, nie wpływają negatywnie na ogólne utrwalenie czerwonych krwinek.

#### PODSUMOWANIE

Cytomorfologiczne badania czerwonych krwinek w plamach krwi stanowią zagadnienie mieszczące się w obrębie zainteresowania biologii sądowej oraz archeologii. W przypadku biologii sądowej, wykazanie obecności czerwonych krwinek w śladzie uważane jest za potwierdzenie obecności krwi [7]. Z kolei w archeologii obecność krwi na przedmiotach stworzonych przez człowieka otwiera możliwość analizy DNA pochodzącego z czasów starożytnych [18]. Pomimo tego, plamy krwawe budzą największe zainteresowanie w aspekcie analizy molekularnej, nawet jeśli chodzi o badania prehistoryczne [14, 19, 22]. Natomiast wiedza dotycząca charakterystyki morfologicznej erytrocytów pochodzących z plam krwawych nie była brana pod uwagę. Tymczasem hemotafonomia umożliwiającą analizę kształtów erytrocytów poprzez zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej otwiera nowe możliwości badania sekretów cytomorfologicznych ukrytych zarówno w dawnych, jak i współczesnych plamach krwawych.