

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БЕРЕЗОВСКИЙ

Дмитрий Павлович

**КОМПЛЕКСНАЯ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА И
ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ
МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ
(ЭКСПЕРТНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.03.05 – судебная медицина

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Ю.И. Пиголкин

доктор медицинских наук, профессор
Г.М. Кавалерский

Москва - 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Современные представления о системе гемостаза.....	16
1.2. Актуальные проблемы тромботических осложнений в практике судебно-медицинского эксперта.....	22
1.2.1. Тромбозы глубоких вен нижних конечностей с последующим фатальным осложнением в виде тромбоэмболии легочной артерии, связанные с длительным вынужденным положением потерпевшего (пациента).....	22
1.2.2. Тромботические осложнения, следовавшие после выполненных оперативных вмешательств либо после причинения травмы, или их сочетание.....	24
1.2.3. Современные методы установления срока формирования тромбоза в судебно-медицинской практике.....	26
1.2.4. Случаи внезапной смерти от тромбоэмболии легочной артерии в практике судебно-медицинского эксперта.....	28
1.3. Современные методы лабораторной диагностики нарушений системы гемостаза	29
1.4. Молекулярно-генетические основы тромбофилий	38
1.5. Состояние перекисного окисления липидов в норме и при патологии сосудистой системы.....	52
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	61
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	81
3.1. Анализ фатальных тромботических осложнений по данным танатологического отдела Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области за 2004–2010 годы.....	81

3.2. Мониторинг тромботических осложнений по данным отдела экспертизы живых лиц Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области за 2004–2010 годы.....	93
3.3. Сезонная встречаемость тромботических осложнений по данным танатологического отдела и отдела экспертизы живых лиц Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области за 2004–2010 годы.....	101
3.4. Лабораторные показатели системы гемостаза у лиц с тромботическими осложнениями	103
3.5. Мутации и полиморфизмы генов-кандидатов наследственной предрасположенности к тромбофилии у потерпевших с тромботическими осложнениями механической травмы	111
3.6. Экспериментальная модель умеренной гомоцистеинемии при механической травме опорно-двигательного аппарата	120
3.7. Морфологическое состояние сосудов в зоне травмирования при воздействии твердого тупого предмета в условиях умеренной гомоцистеинемии на примере экспериментальной модели	131
3.8. Состояние системы ПОЛ-антиоксиданты в экспериментальных группах животных	156
3.9. Уровень экспрессии генов <i>NOS</i> (<i>NO</i> -синтаз) в экспериментальных группах животных	168
3.10. Анализ связи тромботических осложнений у потерпевших с механическими повреждениями и/или выполненным оперативным вмешательством	171
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	219
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	259
ВЫВОДЫ	263
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	265
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	268

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОС	антиоксидантная система
АФК	активные формы кислорода
АЧТВ	активированное частичное тромбиновое время
ВТО	венозные тромботические осложнения
ВТЭО	венозные тромбоэмболические осложнения
ВЭГ	внеэритроцитарный гемоглобин
ГГЦ	гипергомоцистеинемия
ГЕМ	гемолизат
ГПО	глутатионпероксидаза
ГЦ	гомоцистеин
ДК	диеновые конъюгаты
КОР	коэффициент относительного риска
МДА	малоновый диальдегид
МНО	международное нормализованное отношение
ОЭЖЛ	отдел экспертизы живых лиц
ПВ	протромбиновое время
ПЖК	подкожно-жировая клетчатка
ПК	плазма крови
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПТИ	протромбиновый индекс
РО	Ростовская область
РФМК	растворимый фибрин-мономерный комплекс
СОД	супероксиддисмутаза
СПА	суммарная пероксидазная активность
СУА	супероксидустраняющая активность
ТанО	танатологический отдел
ТВ	тромбиновое время
ТГВ	тромбоз глубоких вен
ТГВНК	тромбоз глубоких вен нижней конечности
ТО	тромботические осложнения
ТЭЛА	тромбоэмболия легочной артерии
ШО	шиффовые основания
GSH	восстановленный глутатион

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Многие патологические и травматические процессы в организме человека сопровождаются явлением гиперкоагуляции с развитием тромбозов, которые могут обусловить грозное осложнение в виде тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) [О.В. Возгомент, 2012; Т.А. Жирова с соавт., 2012; И.М. Королёва, 2012; Е.В. Кунгурцев с соавт., 2012; Н.С. Станиченко с соавт., 2012; И.В. Чернышев, Д.В. Перепечин, 2012]. Несмотря на успехи современной медицины, тромбоз и ТЭЛА по-прежнему представляют глобальную медико-социальную проблему [Р.Э. Асамов с соавт., 2008; А.А. Ермолаев с соавт., 2012; И.С. Родюкова с соавт., 2012].

Актуальность данной патологии обусловлена высокой частотой встречаемости и тяжелыми последствиями, приводящими либо к смерти, либо к инвалидизации пациента. Частота венозных тромбозов различной локализации составляет 160 на 100 тыс. в год в США, в странах Западной Европы встречается у 1,87% - 3,13% населения, в Российской Федерации ежегодно диагностируется у 240 тыс. человек [Ю.С. Небылицин, 2006]. С тромботическими осложнениями (ТО) как артериального, так и венозного русла сталкиваются врачи практически всех специальностей. В неврологической практике в России ежегодно регистрируется более 400 тыс. инсультов, из них 70% - 85% приходится на ишемический инсульт [В.А. Парфенов, 2002]. После различных общехирургических оперативных вмешательств тромбоз глубоких вен нижних конечностей (ТГВНК) развивается в среднем у 29% больных, после гинекологических операций – у 19%, чреспузырных аденомэктомий – у 38%, протезирования тазобедренного сустава – у 59% [А.А. Баешко, 1999; А.В. Варданян с соавт., 2006; Р.Э. Асамов с соавт., 2011]. Послеоперационный

тромбоз глубоких вен (ТГВ) при онкологических заболеваниях встречается у 66% - 67% пациентов [В.С. Савельев, 1999; А.В. Жернов с соавт., 2010]. Следовательно, высок риск развития ТЭЛА, которая прочно удерживает второе - третье место в структуре летальности в стационарах хирургического профиля [А.В. Варданян с соавт., 2006; С.А. Божкова с соавт., 2012]. В цифровом обозначении риск оценивается с частотой от 0,7% до 30% [W.H. Geerts et al., 2001], при этом в 0,1% - 3,0% случаев ТЭЛА заканчивается летальным исходом [S. Haas, 2000]. Общеизвестно, что у больных, перенесших это осложнение, в течение 3 месяцев формируется стойкая легочная гипертензия с прогрессирующим нарушением функции правых отделов сердца. Немаловажен и тот факт, что после первого эпизода эмболии сохраняется вероятность развития рецидива, нередко заканчивающегося смертью больного. Согласно результатам международного многоцентрового исследования по изучению легочной эмболии, риск летального исхода в течение 3 месяцев после перенесенной обструкции артериального русла легких существует у 17,5% больных, основной причиной смерти которых служит повторная эмболия [W.H. Geerts et al., 2001; Г.Н. Гаас, А.А. Модестов, 2011]. По данным разных авторов в среднем ежегодно ТЭЛА диагностируется у 60 - 160 человек на 100 тыс. населения [В.С. Савельев с соавт., 2001; Ю.С. Небылицин, 2006; Р.Э. Асамов с соавт., 2011]. Как латентное течение этого патологического процесса, так и его бурное развитие может привести к внезапной смерти через развитие угрожающих для жизни состояний.

За последние десятилетия значительно изменились представления о патогенезе тромбоза и ТЭЛА, осуществляется поиск различных независимых факторов риска тромботических осложнений: как наследственного, так и приобретенного характера. Среди наследственных факторов риска рассматриваются мутации в генах, ответственных за синтез белков в системе гемостаза [F. Ferrara et al., 2013; L. Tang et al., 2013; R. Tran et al., 2013]. Активно обсуждается независимая роль повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови вследствие влияния наследственных и приобретенных факторов [S.S. Signorelli et al., 2013].

С другой стороны, на фоне нерешенной проблемы тромбоза и ТЭЛА отмечается тенденция к увеличению количества оперативных методов лечения травм. Применение оперативных методов лечения к пациентам с тяжелой сопутствующей патологией, несомненно, способствует увеличению риска возникновения тромботических осложнений [С.С. Копёнкин, 2005; Г.М. Кавалерский с соавт., 2009; И.В. Залуцкий с соавт., 2011]. В России за год проводится около 8 млн. хирургических вмешательств, из них в 17% имеется высокий риск развития ТЭЛА, в 1% - 2% имеется высокий риск фатальной ТЭЛА. При хирургических операциях риск развития ТЭЛА максимален в ортопедической практике. Рассматривая развернуто тромботические осложнения в практике травматолога ортопеда, можно утверждать, что при проведении операций на тазобедренном суставе тромбоз вен встречается до 80% [Т.Е. Brothers et al., 1997], при переломах бедренной кости – 67%, при операциях на коленном суставе – 25%, при переломах костей голени – 74% - 77% [А.В. Скорогляд, С.С. Копенкин, 2003; И.П. Антропова с соавт., 2011]. При этом технически верно проведенная операция может закончиться инвалидизацией или смертью пациента, что уже предполагает дискуссионный характер выбора тактики лечения (консервативного или оперативного) и способов его осуществления [Ю.Э. Пиктевич с соавт., 2006].

В научной литературе, публикуемой в последние годы, можно встретить словосочетание *«ятрогенная тромбогенная опасность»* или словосочетания, схожие по смыслу [А.Н. Шмаков с соавт., 2002; А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе, 2006].

Не превышая компетенции в вопросе выбора тактики лечения, в случаях возникновения фатальных осложнений травмы, патогенетически связанной с развитием тромбоза, перед судебно-медицинским экспертом правоохранительными органами часто ставится задача установления причинно-следственных взаимоотношений между травмой, проведенным оперативным вмешательством, возникшим после него тромбозом и последовавшей ТЭЛА с фатальным исходом, т.е. генеза тромбообразования. В монографии И.Г. Вермеля

«Вопросы теории судебно-медицинского заключения» кратко обсуждается этот вопрос [И.Г. Вермель, 1979]. Тем не менее, специальных научных работ, посвященных систематизации тромботических осложнений, в судебно-медицинской литературе нет, встречаются лишь единичные публикации экспертных случаев. Особый интерес представляют случаи травм у лиц с предполагаемой наследственной предрасположенностью к повышенному тромбообразованию (тромбофилии) [Н.П. Варшавец, В.А. Породенко, О.Б. Шилоносов, 2007]. В нормативном документе, определяющем квалификацию степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека, о тромботических осложнениях упоминается дважды: в пункте 6.2.8 приложения «Медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека» и в п. 137 Таблицы «Процентов стойкой утраты общей трудоспособности в результате различных травм, отравлений и других последствий воздействия внешних причин» [Приказ Минздравсоцразвития РФ от 24.04.2008 № 194н «Об Утверждении медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека»].

Таким образом, для эксперта вопрос о генезе тромботических осложнений является сложным и может привести к серьезным экспертным ошибкам в установлении объективных признаков причинно-следственной связи между механически причиненными повреждениями, проведенной операцией, возникшим тромбозом и последовавшим фатальным осложнением в виде ТЭЛА. Для предотвращения вероятных экспертных ошибок необходим поиск дополнительных критериев дифференциальной диагностики различных тромботических осложнений. Кроме того, необходима проверка старых методов исследования, их уточнение и поиск новых лабораторных признаков, которые нужны для установления причинной связи между травмой и возникшим тромботическим осложнением. В частности, в настоящее время с целью совершенствования диагностики причин тромбозов все больше внимания уделяется поиску генетических маркеров [Распоряжение правительства РФ от 28 декабря 2012 года № 2580-р «Стратегия развития медицинской науки в

Российской Федерации на период до 2025 года»] и состоянию перекисного окисления липидов, эндотелиальной дисфункции при сосудистой патологии [Р.Е. Калинин, 2006; В.П. Реутов с соавт., 2012]. Поэтому высокие требования к качеству судебно-медицинской диагностики и достоверность их результатов в настоящее время вызывают необходимость постоянного поиска новых диагностических критериев [Д.В. Богомолов с соавт., 2009; Э.А. Порсуков, 2009; А.В. Ковалев, В.А. Фетисов, О.А. Панфиленко, 2014; Ю.И. Пиголкин с соавт., 2014].

Очевидно, что на сегодняшний день судебно-медицинская диагностика ТО затруднена как при выполнении экспертизы трупа, так и при проведении экспертизы живого лица. Обнаружение эмбола в просвете легочной артерии в ходе секционного исследования означает лишь начало экспертного поиска источника ТЭЛА и причины ее возникновения. Такое положение объясняется тем, что в практике судебно-медицинского эксперта оценка ТО еще не стандартизована ни у нас в стране, ни за рубежом. Отсутствие общепринятой системы судебно-медицинской оценки ТО закономерно приводит к ошибочным экспертным выводам. Прогресс в улучшении судебно-медицинской диагностики ТО связан с использованием комплексного исследования, включающего традиционное секционное исследование (при экспертизе трупа), гистологический анализ с применением морфометрии, оценкой биохимических показателей системы гемостаза и результатов генетического типирования. Тема диссертационной работы является актуальной, имеет важное теоретическое и практическое значение для целей повышения качества судебно-медицинских экспертиз.

Цель исследования

Разработка судебно-медицинских критериев диагностики и экспертной оценки тромботических осложнений при механической травме на основе использования комплекса современных методов исследования.

Для достижения поставленной цели были сформулированы **задачи исследования**:

1. Изучить эпидемиологию тромботических осложнений у потерпевших с механическими повреждениями по данным ГБУ Ростовской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы» на основе анализа судебно-медицинских экспертных заключений трупов и живых лиц.

2. Создать экспериментальную модель механической травмы в условиях гипергомоцистеинемии для изучения гиперкоагуляционных нарушений в системе гемостаза, обуславливающих возникновение тромботических осложнений.

3. Изучить в эксперименте морфологические и биохимические показатели, характеризующие состояние микроциркуляторного русла, перекисного окисления липидов, уровня экспрессии генов, в зоне травмированных тканей при наличии предрасположенности к тромботическим осложнениям.

4. Разработать и внедрить дополнительные морфологические, клинико-лабораторные (биохимические и генетические) маркеры, позволяющие диагностировать наличие тромботических осложнений при механической травме.

5. На основе полученных данных разработать и научно обосновать судебно-медицинские критерии, предложить алгоритм экспертной оценки случаев механической травмы с тромботическими осложнениями.

Научная новизна исследования

Впервые в судебной медицине проведено комплексное исследование для выявления тромботических осложнений у потерпевших с механической травмой.

Разработана научная концепция для установления связи между осложнением и предшествовавшей травмой, либо оперативным вмешательством.

Экспериментальным путем определены закономерности и установлены механизмы тромботических осложнений при наличии механической травмы.

Установлен спектр биохимических маркеров, изучены мутации и полиморфизмы генов, ответственных за синтез белков системы гемостаза, необходимых для решения экспертных вопросов.

Доказана перспективность использования генетических методов исследования для судебно-медицинской оценки тромботических осложнений.

Впервые на экспериментальном материале установлены особенности экспрессии генов NO-синтаз при механической травме в условиях умеренной гомоцистеинемии. Доказана однонаправленная корреляционная зависимость между уровнями гомоцистеина и восстановленного глутатиона.

На основе клинико-экспертного экспериментального материала определен морфофункциональный субстрат, ответственный за формирование патогенетических звеньев в развитии тромботических осложнений, предложен способ постмортальной диагностики прижизненного повышенного уровня гомоцистеина (ГЦ).

Впервые дана комплексная характеристика тромботических осложнений у лиц с механическими повреждениями. При этом определены сроки предполагаемого развития ТГВНК и ТЭЛА у потерпевших.

Впервые разработаны объективные критерии установления причинной связи между механической травмой, выполненным оперативным вмешательством и последовавшим вслед за этим тромботическим осложнением.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан алгоритм проведения судебно-медицинской экспертизы у лиц с возникшими тромботическими осложнениями после полученной механической травмы или выполненного оперативного лечения.

Выявлены наиболее часто встречающиеся наследственные факторы тромботических осложнений в практике судебно-медицинского эксперта.

Разработана экспериментальная модель для изучения общих патофизиологических и морфологических закономерностей развития тромботических осложнений при механической травме в условиях умеренной гомоцистеинемии.

Установлены биохимические и генетические маркеры сроков формирования травмы опорно-двигательного аппарата.

Доказано, что определение восстановленного глутатиона может быть использовано в качестве нового маркера для диагностики гипергомоцистеинемии; определение диеновых конъюгатов и шиффовых оснований в качестве биохимических маркеров давности причинения механических повреждений.

На основании проведенного исследования предложены практические рекомендации как по экспертной оценке тромботических осложнений у потерпевших, так и по оценке работы всей экспертной организации в целом.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Тромботические осложнения постоянно встречаются в судебно-медицинской практике; их причиной является механическая травма и наследственная предрасположенность.

2. Основными наследственными факторами предрасположенности к тромбофилии у лиц с механическими повреждениями являются гены, ответственные за синтез белков фолатного цикла, фибринолитической системы и NO-синтазы.

3. Установлено, что расстройство регуляции микроциркуляторного русла в области травмы является одним из пусковых факторов гиперкоагуляционного нарушения механизмов в системе гемостаза, приводящих к тромботическим осложнениям.

4. Разработана экспериментальная модель механической травмы в условиях гипергомоцистеинемии для изучения гиперкоагуляционных нарушений в системе гемостаза, обуславливающих возникновение тромботических осложнений.

5. На основе проведенных исследований определен комплекс клинических, морфологических и биохимических маркеров, указывающих на наличие связей между механической травмой и тромботическими осложнениями.

6. На основе анализа показателей функциональной морфологии предложен способ диагностики давности механической травмы при наличии гиперкоагуляционных нарушений в системе гемостаза.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления, планировании этапов работы, анализе литературных данных, анализе и обобщении полученных результатов. Лично автором проведено изучение основных показателей механических повреждений с последовавшими тромботическими осложнениями за период с 2004 по 2010 годы по данным танатологического отдела и отдела экспертизы живых лиц ГБУ Ростовской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы», рандомизация по группам сравнения и забор экспертно-экспериментального материала, статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных данных. Автор принимал участие при проведении морфометрических, биохимических, молекулярно-генетических исследований.

Автором разработаны критерии экспертной оценки тромботических осложнений в случаях с травмой или выполненным оперативным вмешательством.

Степень достоверности и апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены на Всероссийской конференции «50 лет АО/ASIF» (Москва, 27-28 ноября 2008 г.); VI Съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 14–15 мая 2010 г.); Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 6–9 июня 2010 г.); Международной научной конференции (Минск, 8–11 октября 2012 г.) «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (к 100-летию со дня рождения академика Н.В. Турбина); VII Всероссийском съезде судебных медиков «Задачи и пути совершенствования судебно-медицинской науки и экспертной практики в современных условиях» (Москва, 21–24 октября 2013 г.).

Высокая степень достоверности результатов работы подтверждается большим объемом исследованного материала, использованием современных методик математико-статистической обработки данных.

Внедрение результатов исследования

Разработанный комплексный подход к судебно-медицинской оценке тромботических осложнений при основных видах механической травмы и при оказании медицинской помощи внедрен в практическую деятельность ГБУ Ростовской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы»; ГБУЗ особого типа Владимирской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы»; ОБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Комитета здравоохранения Курской области; ГБУЗ РА «Адыгейское бюро судебно-медицинской экспертизы»; ГБУЗ «Брянское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»; казенное учреждение Республики Калмыкия «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы»; ОБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Ивановской области»; Академии биологии и биотехнологии ФГАО ЮФУ Министерства образования и науки РФ; ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Министерства обороны РФ. В курсы лекций и практических занятий кафедр судебной медицины и права ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ; судебной медицины ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия» МЗ РФ; судебной медицины ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ РФ; судебной медицины ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, также в курсы лекций и практических занятий Академии права и национальной безопасности НОУ ВПО ИУБиП.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 53 научные работы, из них 19 - в журналах, включенных в перечень ведущих и рецензируемых научных журналов ВАК Министерства образования и науки РФ. Материалы диссертации представлены в одной монографии по судебной медицине.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Объем диссертации составляет 304 страницы текста компьютерного набора. Работа иллюстрирована 62 рисунками и 51 таблицей. Список литературы содержит 327 источников, из них 139 отечественных и 188 иностранных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о системе гемостаза

Большинство наших знаний о роли кровеносных сосудов, тромбоцитов и плазменных факторов гемостаза было накоплено в последние три десятилетия. Тем не менее, до этого периода относительно ограниченные, но очень важные рамки представлений о гемостазе медленно, но неуклонно развивались, начиная с 1666 года, когда Мальпиги обнаружил фибрин в кровяных сгустках. На рубеже XX века было признано наличие агрегации тромбоцитов в зоне повреждения кровеносного сосуда и установлено наличие четырех основных факторов свертывания крови: фибриногена, протромбина, тканевого фактора (тромбопластина) и кальция. Прогресс в развитии данной области наметился в 50-е годы прошлого столетия [С.W. McMillan, 1981]. Полученные результаты научных исследований привели к обоснованию молекулярной основы гемостаза. Однако остается еще много неясностей, противоречий, диаметрально противоположных мнений. Таким образом, в настоящее время все эти положения предполагают дальнейший поиск научных обоснований механизма гемостаза. В частности, разработанная в середине XX века концепция гемостаза основывалась на *in vitro* исследованиях и не учитывала реальные условия в системе кровообращения. В последнее десятилетие была создана каскадно-матричная теория гемокоагуляции с учетом взаимодействия не только плазменных белков и тромбоцитов, но и влияния компонентов стенки сосуда и других форменных элементов крови [М.А. Пантелеев и соавт., 2011].

Система гемостаза представляет собой биологическую систему, обеспечивающую поддержание жидкого состояния крови, остановку кровотечения в случае повреждения сосуда путем формирования тромба. Таким образом, термин «гемостаз» включает в себя процессы, направленные на

поддержание циркулирующего объема крови, и механизмы, препятствующие кровотоку, и определяющие возобновление кровотока при обтурации сосуда тромбом [З.С. Баркаган, 1988].

Процесс гемостаза подразделяется на несколько дополняющих друг друга этапов, включающих местный спазм поврежденного сосуда, адгезию тромбоцитов к поврежденной стенке и последующую их агрегацию с участием фибрина и дальнейшим восстановлением кровотока за счет лизиса образованного тромба [А.И. Бернакевич и соавт., 2009].

Механизмы гемостаза. Кровопотеря и процессы тромбообразования в сосудах разного диаметра различаются по проявлению и происходят по-разному. Выделяют два механизма гемостаза.

1-й механизм гемостаза – микроциркуляторный, сосудисто-тромбоцитарный. Он реализуется в венозных и артериальных сосудах до 100-200 мкм в диаметре, а также в капиллярах. В этом процессе участвуют тромбоциты и эндотелий сосудов. Тромбоцитарно-сосудистое звено гемостаза определяется повреждением сосуда и обнажением субэндотелия. Это запускает адгезию тромбоцитов – прилипание к участку поврежденного сосуда. При адгезии часть тромбоцитов разрушается, выделяя биологически активные вещества, стимулирующие спазм поврежденного сосуда и агрегацию тромбоцитов. В результате агрегации между тромбоцитами «улавливаются» лейкоциты и эритроциты, что приводит к формированию смешанно-клеточного свертка или первичного тромба. Нарушения тромбоцитарно-сосудистого гемостаза клинически определяют 80% кровотечений и 95% тромбообразования [J.G. White, 1994].

2-й механизм гемостаза – макроциркуляторный, коагуляционный или плазменный гемостаз. Осуществляется с участием плазменных факторов свертывания крови. Благодаря ему из агрегата клеток образуется тромб, в состав которого, помимо форменных элементов крови, входит и фибрин. Образовавшийся тромб обеспечивает прекращение кровотечения из

поврежденных сосудов, с диаметром более 200 мкм [R.G. Macfarlane, 1964; E.W. Davie, O.D. Ratnoff, 1964].

Физиологически активные вещества, участвующие в процессах гемостаза и находящиеся в плазме, называются плазменными факторами свертывания крови. К ним относятся: фибриноген (FI), протромбин (FII), тканевой тромбопластин (FIII), ионы кальция (FIV), Ас-глобулин (accelerance - ускоряющий) или проакцелерин (FV), проконвертин (FVII), антигемофильный глобулин А (FVIII), антигемофильный глобулин В или фактор Кристмаса (FIX), фактор Стюарта-Прауэра (FX), плазменный предшественник тромбопластина или антигемофильный глобулин С (FXI), контактный фактор или фактор Хагемана (FXII), фибринстабилизирующий фактор или фибриназа (FXIII), фактор Флетчера (прокаллекреин) (FXIV), фактор Фитцджеральда-Фложе (высокомолекулярный кининоген - ВМК) (FXV). Фактор FVI — исключен из номенклатуры. [B. Furie, V.C. Furie, 1992].

Коагуляционный гемостаз - ферментативный каскадный процесс, в котором последовательно активируются факторы свертывания и образуются их комплексы. Конечным этапом гемокоагуляции является переход растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин, который армирует (укрепляет) тромб, который фактически не может подвергнуться обратному развитию за счет активации фибринолиза.

Процесс свертывания крови проходит в три последовательных этапа.

Первый этап самый сложный и продолжительный. Во время этого этапа образуется активный ферментативный комплекс – протромбиназа, который является активатором протромбина. В образовании комплекса участвуют тканевые и кровяные факторы. Результатом является формирование тканевой и кровяной протромбиназы. Образование тканевой протромбиназы начинается с активации тканевого тромбопластина, который образуется при повреждении стенок сосуда и прилегающих тканей. Вместе с VII фактором и Ca^{2+} он активирует фактор X. Результатом взаимодействия активированного фактора X

(FXa) с V фактором и с фосфолипидами тканей или плазмы формируется тканевая протромбиназа. Процесс длится 5-10 секунд. [S.I. Raparort, L.V. Rao, 1995].

Активация XII фактора при его контакте с волокнами коллагена поврежденной стенки сосуда приводит к образованию кровяной протромбиназы. Помимо этого, в активации и действии XII фактора принимают участие калликреин (FXIV) и высокомолекулярный кининоген (FXV). После чего XI фактор будет активирован XII фактором с образованием комплекса. Активный XI фактор совместно с IV фактором активирует IX фактор, который, в свою очередь, активирует VIII фактор. В последующем происходит активация X фактора, который образует комплекс с V фактором и Ca^{2+} , чем и заканчивается образование кровяной протромбиназы. В этой биохимической реакции также участвует тромбоцитарный фактор 3. Длительность процесса составляет порядка 5-10 минут [B. Furie, 2009; K.A. Tanaka et al., 2009].

Второй этап. Под влиянием протромбиназы происходит переход протромбина в фермент - тромбин. В процессе участвуют факторы IV, V, X.

Третий этап. Растворимый фибриноген превращается в нерастворимый фибрин, являющийся основой тромба. Вначале под действием тромбина образуется фибрин-мономер. Следом, при участии Ca^{2+} , образуется растворимый фибрин-полимер (фибрин «S», soluble). Растворимый фибрин полимер пронизывает первично образовавшийся агрегат клеток. Этот процесс обозначают как «армирование тромба». Под влиянием фибринстабилизирующего фактора XIII образуется нерастворимый фибрин-полимер (фибрин «I», insoluble), устойчивый к фибринолизу.

После формирования «рыхлого» тромба начинается его ретракция, т.е. уплотнение и закрепление тромба в поврежденном сосуде. Процесс обеспечивается сократительным белком тромбоцитов - тромбостенином и Ca^{2+} . Спустя 2-3 часа тромб уменьшается на 25-50% от первоначального объема. Схема свертывания крови представлена на рисунке 1.

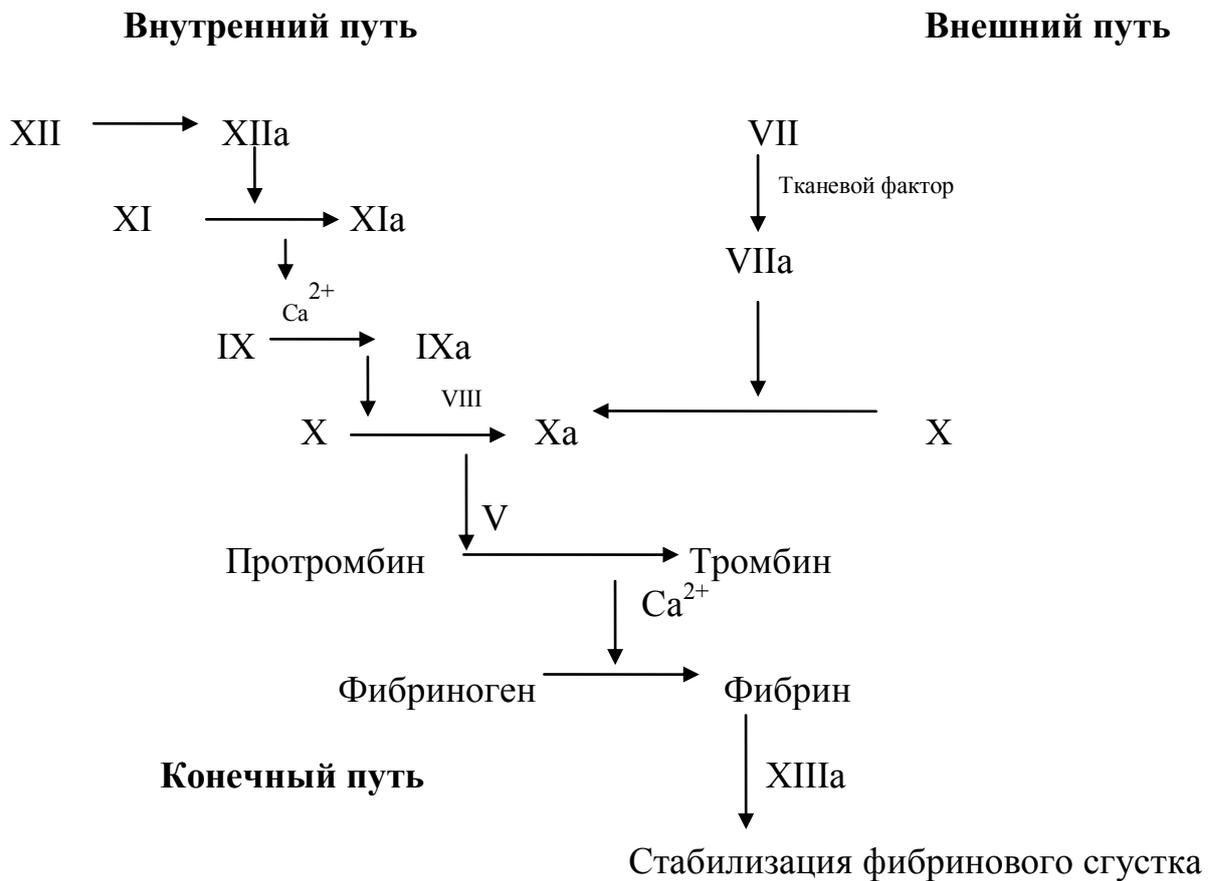


Рис. 1. Схема свертывания крови [цит. по D.J. Perry, K.J. Pasi, 1999]

Фибринолиз – ферментативный процесс, обратный гемокоагуляции, заключающийся в восстановлении просвета сосуда за счет расщепления фибринового свертка. Фибринолиз осуществляется под влиянием плазмина (фибринолизина) и начинается одновременно с ретракцией свертка, однако идет медленнее. Плазмин находится в неактивном состоянии в плазме крови в виде плазминогена. Он активируется под влиянием тканевых и кровяных активаторов плазминогена. Наиболее активным ферментом, активизирующим процесс фибринолиза, считается урокиназа. Инициирование кровяных активаторов фибринолиза, находящихся в плазме крови, происходит благодаря адреналину и лизокиназам. Фибрин расщепляется плазмином на отдельные полипептидные цепи, в результате чего происходит растворение (лизис) фибринового свертка. Механизм фибринолиза изображен на рисунке 2.

Схема фибринолиза

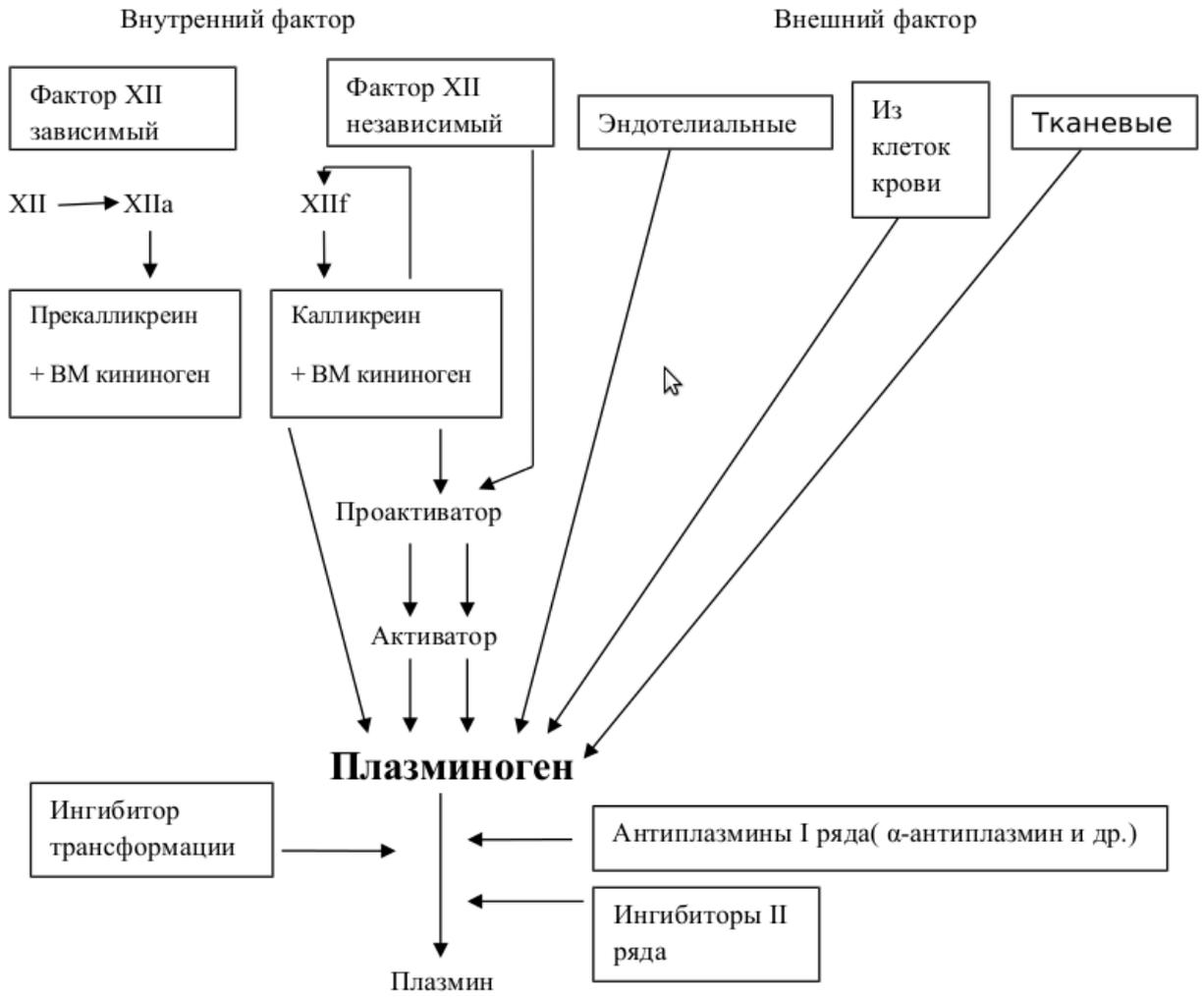


Рис. 2. Механизм фибринолиза [цит. по Н.С. Кизиловой, 2007]

1.2. Актуальные проблемы тромботических осложнений в практике судебно-медицинского эксперта

1.2.1. Тромбозы глубоких вен нижних конечностей с последующим фатальным осложнением в виде тромбоэмболии легочной артерии, связанные с длительным вынужденным положением потерпевшего (пациента)

Первые публикации о тромбозах у военнослужащих относятся к периоду Второй мировой войны [К. Simpson, 1948]. В 1954 году J. Nomans связал формирование ТГВНК именно с нахождением потерпевшего длительное время в вынужденном сидячем положении [J. Nomans, 1954]. Однако точный механизм формирования тромбоза при таких обстоятельствах им достоверно объяснен не был. С развитием услуг длительных пассажирских авиаперелетов было установлено, что у таких пассажиров возрастает риск ТГВНК. Данный синдром получил в литературе название «синдрома эконом-класса» или «автобус-класс синдрома» [I.S. Syminglon, B.H.R. Stack, 1977; S.K. Kakkos, G. Gerovlakis, 2004]. Широкое распространение компьютерной техники в быту и на производстве также предполагает длительное нахождение в сидячем положении за экраном монитора, считается рядом авторов самостоятельным фактором риска развития ТГВНК. В 2004 году Н. Lee была опубликована статья, сообщавшая о случае внезапной смерти молодого человека в возрасте 24 лет после практически непрерывного сидения за экраном монитора в течение 4-х суток с небольшими перерывами на еду и короткий сон. Тело молодого человека было найдено в туалетной комнате. При наружном исследовании каких-либо особенностей, повреждений и т.п. выявлено не было. При внутреннем исследовании тромбозом был найден в основном стволе легочной артерии. Источником тромбоза явились тромбы в подколенных венах обеих ног, имевшие размеры в пределах 13–16 мм в ширину и около 71–107 мм в длину. Проведенное гистологическое исследование легких выявило мультифокальные кровоизлияния и инфаркты легких. Дополняло морфологическое исследование трупа молодого человека токсикологическое исследование, исключавшее наличие каких-либо

токсических веществ. Таким образом, результаты макро- и микроскопического исследования с учетом обстоятельств обнаружения трупа позволили автору считать длительное вынужденное сидячее положение за компьютером основным фактором риска фатального осложнения ТГВНК [Н. Lee, 2004]. Авторы научных публикаций сообщают о разных сроках формирования ТГВНК. Минимальное время нахождения в вынужденном положении с развитием ТЭЛА было сообщено в случае S. Mimasaka и соавт.. У 40-летней женщины формированию ТГВНК и последующей ТЭЛА предшествовало всего лишь пятичасовое нахождение в салоне легкового автомобиля. Интересно отметить, что в данном конкретном случае источником ТЭЛА явился не так уж часто встречающийся тромбоз внутренней подвздошной вены [S. Mimasaka et al., 2008]. Однако с учетом большого диапазона времени нахождения в вынужденном положении, вряд ли можно в настоящее время быть уверенным, что ведущим фактором в таких случаях является только время. Не исключено, что определенную роль могут играть и особенности диеты потерпевшего. В частности, М. Еом и соавт. опубликовали три случая внезапной смерти у паломников, которые в течение нескольких суток находились в позе молящегося. Авторы видят причину тромбоза в сочетании вынужденного положения и соблюдения строгого поста, способствовавшего развитию дегидратации организма [М. Еом et al., 2009]. Если вышеприведенные случаи в юридической практике, наверное, рассматриваются как несчастный случай и не имеют судебной перспективы, то случаи, сообщенные В.С. Dickson, М.С. Pollanen, могут уже быть оценены как некачественно оказанная медицинская помощь. Авторами были проанализированы три случая смерти в психиатрической клинике при длительной фиксации пациентов за конечности с дополнительной пятой точкой фиксации за талию. Длительность вынужденного положения пациентов составила от 3-х до 5-ти суток. Ретроспективное изучение этих случаев не установило наличие у них каких-либо дополнительных факторов риска, коагулопатий и т.п. Стоит отметить, что во всех этих трех случаях было проведено генетическое типирование на предмет наличия мутаций в генах, ответственных за синтез II и V плазменных факторов

свертывания крови. Это исследование не выявило наличия наследственной предрасположенности у пациентов [B.C. Dickson, M.S. Pollanen, 2009]. Однако в цитируемом источнике не рассматривалась возможность побочных тромботических осложнений в результате применения антипсихотических препаратов. R. Thomassen и соавт. обсуждают взаимосвязи тромбоза глубоких вен у пациентов психиатрической клиники. Ими было проанализировано 27 случаев внезапной смерти пациентов за 24-летний период наблюдений, из которых 10 случаев были связаны с развитием ТЭЛА. Авторы не исключают связь ТЭЛА с применением препарата clozapine. В то же время они подчеркивают наличие как минимум трех причин развития фатального осложнения: 1) clozapine способствует повышенной агрегации тромбоцитов; 2) повышение уровня антител к кардиолипину как одному из факторов риска тромбоза; 3) острая фаза психических нарушений сопровождается повышенным уровнем адреналина, который в свою очередь способствует повышенному тромбообразованию. Однако не исключается и другой, четвертый фактор, а именно фармацевтический эффект препарата – гиподинамия пациента в период его применения [R. Thomassen et al., 2001].

1.2.2. Тромботические осложнения, последовавшие после выполненных оперативных вмешательств либо после причинения травмы, или их сочетание

Y. Tajima и соавт. сообщили о случае внезапной смерти 70-летнего мужчины спустя 1 час после дорожно-транспортного происшествия. Каких-либо серьезных травм, которые могли бы стоять в прямой причинной связи со смертью, в результате ДТП причинено не было. В анамнезе за 1 месяц до смерти у пациента была диагностирована ишемическая болезнь сердца вследствие стеноза нисходящей ветви левой коронарной артерии, потребовавшая оперативного вмешательства с имплантацией стента. При судебно-медицинском исследовании трупа был выявлен инфаркт стенки левого желудочка сердца. Визуализировать точную локализацию стента при производстве исследования трупа

макроскопически не представилось возможным, по этой причине было использовано рентгенологическое исследование. Установлены его размеры – 10 мм длиной и 2 мм в диаметре. Ниже расположенного стента микроскопически был выявлен некроз сердечной мышцы, разрастание соединительной ткани и кровоизлияния. Однако не было получено никакого свидетельства о тромбозе стента, что свидетельствовало в пользу того, что окклюзия ветвей нисходящей ветви левой коронарной артерии произошла ниже расположенного стента. Таким образом, делается вывод, что использование рентгенологического исследования может быть полезным при проведении судебно-медицинского исследования трупа в подобных случаях [Y. Tajima et al., 2009]. Очевидно, что стентирование коронарных артерий не может полностью исключить повторного возникновения тромбоза артерии либо самого стента. К сожалению, это не единственное осложнение после подобного рода оперативных вмешательств, с которым могут сталкиваться судебно-медицинские эксперты. Установка стента требует довольно длительной (в течение 1 года) последующей антикоагулянтной терапии, что однозначно ставит врача перед выбором между риском тромбообразования либо риском повышенного кровотечения. Эта проблема уже имеет отношение не только к тактике выбранного послеоперационного ведения больного, но и к судебной медицине и юриспруденции, т.к. в случаях потребности срочного хирургического вмешательства высок риск обильной кровопотери. При этом установка стента и последующая антикоагулянтная терапия являются междисциплинарным вопросом, в том числе требующим обсуждения с пациентом предполагаемых осложнений и документального закрепления их в установленном юридическом порядке [S. Bölükbas et al., 2009]. В частности, о неоднозначном подходе к профилактике тромботических осложнений в хирургии, травматологии и ортопедии, как при консервативном ведении пациентов, так и при выполнении сложных оперативных вмешательств и возможных последствиях сообщают С. Jabłoński и соавт. [С. Jabłoński et al., 2008]. В работе А.М. Davison, освещающей проблемы абдоминальной хирургии и травматологии, сообщается о случае смерти 62-летнего мужчины, которому были причинены повреждения

внутренних органов, потребовавшие проведения лапаротомии. Выявленная в ходе лапаротомии аневризма брюшного отдела аорты была отнесена хирургами к случайной находке. Несмотря на технически правильно выполненную операцию, у пациента на 9-е сутки после травмы и операции была констатирована смерть, вследствие развившейся ТЭЛА. Источником ТЭЛА стали глубокие вены нижних конечностей. В сообщаемом случае авторы не нашли прямой причинной связи между закрытой травмой живота и наступившей смертью [A.M. Davison, 2009].

Не совсем однозначно трактуется термин, используемый в зарубежной литературе, такой как отсроченная смерть. В частности, T. Ishikawa и соавт. рассматривают случай смерти 71-летнего мужчины, страдавшего гипертонической болезнью, сахарным диабетом и подагрой. Ему приблизительно за три недели до смерти была причинена закрытая травма шеи с формированием гематомы, которая впоследствии нагноилась и стала причиной септического состояния. Выполненное судебно-медицинское исследование трупа установило наличие правосторонней хронической гематомы шеи, развившегося тромбоза правой яремной вены. Иных каких-либо морфологических признаков травмы шеи установлено не было. Гистологическое исследование установило частично организовавшиеся тромбы вен шеи и микротромбы в сосудах малого круга кровообращения. Микробиологическим методом выявлено наличие стрептококковой инфекции (колонии микроорганизмов). Посмертно было исследовано содержание С-реактивного белка и неоптерина. Полученные данные позволили утверждать, что причиной смерти явился развившийся сепсис [T. Ishikawa et al., 2008].

1.2.3. Современные методы установления срока формирования тромбоза в судебно-медицинской практике

Во всех вышеприведенных случаях при проведении судебно-медицинского исследования трупа обязательно будет поставлен вопрос: какова давность возникшего венозного (или артериального) тромбоза? Непосредственно после травмы, перед оперативным вмешательством или уже после его выполнения? С

этой целью V. Fineschi и соавт. было проанализировано 2843 акта судебно-медицинского исследования трупа, выполненных за 10 лет. Из 140 отобранных образцов с глубоким венозным тромбозом были квалифицированы: как фаза 1 в 48 случаях (34.29 %), как фаза 2 - в 70 случаях (50 %) и 22 случая (15.71 %) были оценены как старше чем 2 месяца (фаза 3). Авторы уверены, что без использования иммуногистохимии и лазерного сканирующего микроскопа (CLSM) однозначно решить вопрос о давности возникновения тромба не представляется возможным [V. Fineschi et al., 2009]. Для установления времени возникновения тромба M. Nosaka и соавт. предлагают учитывать соотношение нейтрофилов и макрофагов в зоне его формирования. С этой целью было выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием экспериментальных животных. Миелопероксидазоположительные нейтрофилы (MPO) и F4/80-позитивные макрофаги выявлялись в эксперименте при формировании тромба путем наложения лигатуры на нижнюю полую вену. По данным морфометрии наибольшее количество нейтрофилов было в первые сутки после наложения лигатуры, после чего постепенно уменьшалось. В то же время число макрофагов достигло максимума на 7 день после наложения лигатуры. После 5 дней наложения лигатуры соотношение нейтрофилов к макрофагам (N/M) составило коэффициент меньше 2 (в пределах 0,2–1,4). Это позволяет сделать вывод, что коэффициент N/M больше 2-х говорит о возрасте тромба в пределах 1–3 суток. В рамках 1–3 суток коэффициент больше 5 говорит в пользу тромба, сформированного в первые сутки. Вероятнее всего, что отношение N/M 1,0 или меньше указывает на возраст больше чем в 5 дней. Данное исследование продемонстрировало перспективность использования иммуногистохимического метода с целью установления сроков формирования тромба [M. Nosaka et al., 2009].

1.2.4. Случаи внезапной смерти от тромбоэмболии легочной артерии в практике судебно-медицинского эксперта

Зачастую единственным проявлением тромбоза глубоких вен нижних конечностей является остро возникшая тромбоэмболия легочной артерии с летальным исходом. J. Lucena и соавт. провели ретроспективный анализ результатов 2477 судебно-медицинских вскрытий трупов за 32 месяца работы института судебной медицины в Севилье (Испания). Авторами были проанализированы эпидемиологические, клинические и морфологические особенности случаев внезапной смерти, связанных с ТЭЛА. Внезапная смерть от ТЭЛА к общему количеству исследований составила 1,3%. В половом соотношении 59% мужчины и 41% женщины в возрастах $50,3 \pm 13,8$ года в диапазоне от 22 до 74 лет и $50,3 \pm 13,8$ в диапазоне от 18 до 87 лет соответственно. В большинстве случаев (78%) смерть наступила либо дома, либо непосредственно при поступлении в лечебное учреждение. Интересно отметить и временной промежуток – в основном это зима в промежутке времени с 08:00 до 16:00. При жизни антикоагулянтную терапию применяли лишь в 9% случаев. Хирургическое вмешательство было выполнено в 22% случаев. Избыточная масса тела была определена в 75%. Как клиническое проявление – одышка встречалась в 31% случаев. С учетом вышеприведенных данных в обзоре литературы, стоит отметить, что психические расстройства были зафиксированы в 31% случаев [J. Lucena et al., 2009].

Таким образом, частота случаев с тромбозами и их фатальные осложнения в практике судебно-медицинского эксперта занимают не более 2% (около 1,3%) от всех проведенных аутопсий. Сам по себе тромбоз является многофакторным патологическим процессом. На сегодняшний день установлены десятки факторов риска тромбоза, к которым относятся как индивидуальные особенности организма, так и время, и обстоятельства его формирования. Пока нет ясности в вопросе: как из большого количества факторов риска выделить ведущий (основной)? Не исключено, что решение проблемы тромбоза в области судебной медицины во многом связано с установлением времени формирования тромба. Эту

специфическую задачу, наверно, можно решить с использованием ряда методов, в том числе иммуногистохимических. В то же время нет четкого понимания возможности биохимических методов исследования трупного материала при наличии тромботических осложнений. В дополнение, не исключено, что использование генетического типирования биологического материала при проведении подобного рода экспертиз позволит существенно расширить доказательную базу. Однако, несмотря на то, что известно о нескольких десятках генов-кандидатов предрасположенности к тромбофилии, остается неизученным вопрос о вкладе каждой из мутаций и полиморфизмов, в том числе при их сочетании в развитии тромбозов. Не исключено, что генетические методы должны являться одним из завершающих этапов в комплексе используемых экспертных исследований.

1.3. Современные методы лабораторной диагностики нарушений системы гемостаза

Профилактика тромботических и тромбоэмболических осложнений в современной медицине является актуальной и до конца не решенной проблемой, на что указывает направленный поиск в информационной системе pubmed.com по ключевым словам «профилактика тромботических осложнений» (prevention of thrombosis complications). Выполненный поиск выдает тысячи публикаций. Например, в 2012 году было опубликовано 9788 статей, в 2011 году 11654, в 2010 году 11936, в 2009 году 11986, в 2008 году 11092, таким образом, с учетом глубины поиска за пять лет (в период времени с 2008 по 2012 годы) было опубликовано 56456 научных статей.

Ключевым моментом в профилактике ТО и ТЭЛА считается ранняя диагностика предрасположенности к повышенному тромбообразованию для проведения адекватной, своевременной профилактики ТО [О.В. Возгомент, 2012]. Существенную роль в раннем распознавании повышенного риска ТО могут оказывать существующие на сегодняшний день лабораторные исследования, позволяющие раскрыть механизмы свертывания крови. Количество исследований

для оценки системы гемостаза в последние годы уменьшилось, а информативность их возросла [Т.В. Вавилова, 2010].

В обычной клинической практике наиболее часто встречается исследование показателей коагулограммы, либо отдельных факторов, характеризующих свертывающую, противосвертывающую, фибринолитическую системы. В тоже время диагностика нарушений системы гемостаза является одной из самых дорогостоящих в лабораторной практике, как следствие данного утверждения - выполнение всех возможных тестов для уточнения характера нарушений для всех пациентов практически нереальная задача. Поэтому клиницист должен в полной мере осознавать, в каких случаях, для решения каких практических задач применяются данные исследования и как интерпретировать полученные результаты. Логично для оценки риска возможных ТО идти в диагностике от общего к частному, что в первую очередь означает использование скрининговых методов оценки с последующим уточнением и дополнением в зависимости от полученных результатов.

К скрининговым методам оценки состояния коагуляционного (внешнего, внутреннего, общего путей свертывания) и сосудисто-тромбоцитарного звеньев системы гемостаза относят: определение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ; АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ - activated partial thromboplastin time)), протромбинового времени (ПВ; РТ - prothrombin time) или международного нормализованного отношения (МНО; INR - International Normalized Ratio), тромбинового времени (ТВ; ТТ - Thrombin Time), определение концентрации фибриногена (PFR - protein-fibrinogen ratio), количества тромбоцитов (PLT - platelets count).

Стандартных методов исследования коагуляции, таких как активированное частичное тромбопластиновое время и протромбиновое время, вполне достаточно для определения нарушения факторов свертывания, определяющих внутренние и внешние пути соответственно. Нарушения концентраций факторов VIII и IX также могут быть выявлены при одноступенчатых и двухступенчатых

исследованиях образования сгустков [А.Н. Мамаев и соавт., 2007]. Хотя эти методы играют важную роль в оценке начала формирования сгустка крови, в условиях организма его образование является непрерывным процессом, который может быть более широко изучен с помощью общего анализа гемостаза. В настоящее время разрабатывается несколько глобальных анализов, в том числе: исследование образования тромбина, тромбоэластография, волновой анализ сгустка, исследование образования и лизиса сгустка (CloFAL), образование тромбопластина и другие методы исследования образования тромбина и плазмينا. Перечисленные методы исследования могут обеспечить более глубокое понимание природы нарушений в механизмах гемостатического баланса, позволят провести дифференциальную диагностику многих патологических состояний системы гемостаза (коагулопатии – тромбофилии). Одновременно эти анализы могут быть клинически значимыми для оценки результатов лечения с применением заместительной терапии (рекомбинантного активированного FVII и из плазменного очищенного концентрата протромбинового комплекса), используемых для контроля гемостаза при острых кровотечениях у пациентов с врожденной гемофилией А/В. Однако, по мнению многих авторов, лабораторные методы оценки системы гемостаза требуют дальнейшей разработки [M. Chitlur et al., 2011].

Значение АЧТВ характеризует внутренний и общий пути свертывания, активность практически всех плазменных факторов свертывания, за исключением FVII. Наличие слова «частичное» означает отсутствие тканевого фактора, способствующего формированию свертка крови. Для исследования этого показателя используют обедненную тромбоцитами плазму крови. Предварительно, для получения плазмы, кровь собирают в цитратные пробирки для предотвращения инициации ее свертывания в присутствии ионов кальция. Референсные значения АЧТВ составляют 28,6–33,6 сек [T.R. Gaunt et al., 2012; R.K. Schindhelm et al., 2012]. В то же время лабораториям рекомендуют определять свои «уточненные» значения с принятием во внимание прибора и реактивов, используемых конкретно в их работе [Т.В. Вавилова, 2010]. Мнения

исследователей в трактовке укорочения показателя АЧТВ противоречивы. Все же большинство из них считают его укорочение клинически малоинформативным, объясняя полученное значение погрешностями используемой методики, забором и обработкой образцов крови (преаналитические погрешности). Однако существует и противоположное мнение, объясняющее укорочение показателя АЧТВ предрасположенностью к гиперкоагуляции [W. Korte, S. Clarke, J.V. Lefkowitz, 2000]. Как бы то ни было, увеличение показателя АЧТВ свидетельствует о низкой концентрации или активности плазменных факторов свертывания крови за счет врожденных либо приобретенных причин (например, из-за наличия ингибиторов плазменных факторов свертывания крови).

Протромбиновое время (ПВ) – результат данного показателя лаборатории представляют в секундах. Все же чаще значение выражают либо в процентах (по Квику), или в виде результатов нормализованного международного отношения (МНО) [M. Abe et al., 2012; W.E. Dager et al., 2012; J.S. Kim et al., 2013]. В любом случае, результаты этого теста характеризуют внешний и общий пути свертывания. МНО рассчитывается по формуле $\text{МНО} = (\text{ПВ исследуемой плазмы} / \text{ПВ нормальной плазмы})^{\text{МИЧ}}$, где МИЧ – международный индекс чувствительности. Метод определения ПВ основан на том, что к плазме, обедненной ионами кальция, добавляют первоначально ионы кальция, затем тканевой тромбопластин (ФШ), после чего засекают время образования свертка при оптическом измерении. Увеличение ПВ, МНО обусловлено снижением активности, либо дефицитом плазменных факторов свертывания VII, X, V, II. Уменьшение данного показателя может быть обусловлено гиперкоагуляцией, хотя клиницисты считают это малоинформативным [Т.В. Вавилова, 2010].

Тромбиновое время (ТВ) отражает скорость превращения фибриногена в полимеризованный фибрин, который является конечным этапом свертывания крови. Удлинение ТВ может быть вызвано присутствием в крови нативных антикоагулянтов (компонентов противосвертывающей системы, таких как гепарин и др.), парапротеинов, гипофибриногемией, дисфибриногемией (качественный дефект фибриногена), или накоплением продуктов деградации

фибрина и фибриногена (при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) и гиперфибринолизе), которые обладают антитромбиновой активностью и препятствуют полимеризации мономеров фибрина [Т.В. Вавилова, 2010]. Значительное удлинение ТВ свидетельствует о риске кровотечений.

Дискуссии о пользе определения тромбинового времени продолжают до сих пор. Низкий уровень альбумина (<30 г/л) в образцах плазмы может вызвать удлинение тромбинового времени в связи с задержкой полимеризации фибрина [P. Toulon et al., 1995]. Значение теста в диагностике вариантов гипокоагуляции остается достаточно важным, однако использование его в роли скринингового метода является неэффективным [Т.В. Вавилова, 2010].

Фибриноген - основной белок свертывания крови. При гидролизе срединных доменов полипептидной цепочки фибриногена, происходит ориентация мономеров фибриногена в полимерную, сетчатую структуру фибрина, которая и является каркасом сгустка. Наиболее информативным методом определения концентрации фибриногена является метод Клауса, который основан на том, что при добавлении избытка тромбина к разбавленной плазме скорость образования сгустка прямо пропорциональна концентрации фибриногена. Результат обычно выражается в концентрации фибриногена, которая рассчитывается с использованием калибровочной кривой. Клиническую значимость имеет любое отклонение от нормы активности фибриногена в плазме [Т.В. Вавилова, 2010]. Обычно уменьшение концентрации фибриногена является следствием снижения белково-синтетической функции печени, гемодилюции. При воспалении, в острой фазе, наблюдается повышение концентрации фибриногена.

Концентрация фибриногена в плазме для каждого человека является индивидуальным и достаточно стабильным показателем. Референсное значение 2,6 – 3,6 г/л. Несмотря на это, небольшие отклонения концентраций могут свидетельствовать о наступлении геморрагических или коагулопатических патологий. Так, например, показано, что в группе пациентов с концентрацией фибриногена менее 3,3 г/л отмечены: наименьшая частота асимптомной

геморрагической трансформации (АГТ) в виде геморрагического инфаркта (ГИ) 1-го типа при отсутствии геморрагической трансформации ГТ, сопровождающейся клиническим ухудшением, летальным исходом (ЛИ), и наибольшая частота хорошего функционального восстановления. Диапазон концентрации фибриногена 3,85-4,23 г/л характеризовался повышением риска АГТ в виде ГИ 2-го типа, симптоматической ГТ в виде паренхиматозной гематомы с равным распределением 1-го и 2-го типа, повышением частоты ЛИ, снижением шанса функционального восстановления и т.д. [О.В. Лянг и соавт., 2012]. К настоящему времени определение концентрации фибриногена дает наиболее результативные данные в диагностике патологических состояний системы гемостаза при скрининговом анализе и как компонент комплексных исследований.

Одним из современных тестов, позволяющих оценить работу системы свёртываемости крови, является анализ содержания растворимых мономеров фибрина (РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы). Исследования содержания в плазме фибриногена и продуктов его метаболизации (выявляемых с помощью паракоагуляционных тестов, например этанолового, протаминасульфатного, ортофенантролинового, теста склеивания стафилококков) применяется для диагностики внутрисосудистого свертывания крови, в т.ч. тромбогеморрагического синдрома, а также мониторинга антикоагулянтной терапии [А.П. Момот и соавт., 1996]. В норме концентрация РФМК в крови довольно низкая и практически не определяется обычными лабораторными тестами. При некоторых патологиях, связанных с увеличением концентрации тромбина, происходит постоянный процесс трансформации фибриногена в фибрин с появлением в крови фибринопептидов А и В, накоплением мономеров фибрина. Активация фибринолиза сопровождается образованием продуктов деградации фибрина (ПДФ). ПДФ взаимодействуют с мономерами фибрина, увеличивая количество РФМК [Г.Л. Волков и соавт., 2005]. Основным методом определения концентрации РФМК в крови является ортофенантролиновый метод. Принцип метода определения РФМК в плазме крови заключается в появлении в

плазме, содержащей РФМК, зёрен (паракоагулята) фибрина после добавления к ней раствора фенантролина [З.С. Баркаган, А.П. Момот, 2001]. Накопление РФМК свидетельствует не только об активации системы свертывания крови, но и о нарушении динамического равновесия в функционировании систем свертывания крови и фибринолиза [А.Н. Савчук, 2010].

Подсчёт количества тромбоцитов периферической крови является неотъемлемой частью исследования системы гемостаза. Подсчёт целесообразно выполнять на автоматическом гематологическом анализаторе. Большое значение для правильности анализа имеет забор крови, так как наличие микротромбов может исказить результат. Ручной метод подсчёта тромбоцитов актуален только в случае получения тромбоцитопении без клинических оснований, так как коэффициент вариации данного метода не менее 10% (при автоматическом определении - не более 5%) [Т.В. Вавилова, 2010]. Референсное значение содержания тромбоцитов колеблется в диапазоне $150-400 \times 10^9 / \text{л}$.

Патология тромбоцитарной активности широко распространена в клинической практике и может быть как наследственной, так и приобретённой. При количестве тромбоцитов более $600 \times 10^9 / \text{л}$ повышается риск возникновения тромбозов. Геморрагии же возникают при числе тромбоцитов менее $30-50 \times 10^9 / \text{л}$. Однако эти значения имеют условный характер, поскольку частота и выраженность геморрагий или тромбозов зависят от заболевания, вызвавшего тромбоцитарный сдвиг. Современные гематологические анализаторы позволяют в условиях лаборатории определять и некоторые качественные сдвиги тромбоцитарной системы. Помимо указанного выше количества тромбоцитов (PLT), возможны определения степени тромбоцитарного анизоцитоза (PDV), среднего объема тромбоцита (MPV), процента тромбоцитарной массы в объеме крови (PCT) [Ю.В. Первушин и соавт., 2009].

Несмотря на важность данных параметров в дифференциальной диагностике заболеваний, связанных с тромбоцитозами, функциональная активность тромбоцитов не поддается достоверному определению по причине неизбежной активации их при заборе крови. Оценка активации тромбоцитов

наиболее часто проводится методом исследования агрегации тромбоцитов индуцированной смесью прогретой исследуемой плазмы пациента и разной концентрации гепарина. В качестве исследуемых тромбоцитов может применяться как «пул» плазмы богатой тромбоцитами (РАТ-тест), так и взвесь «отмытых» тромбоцитов (НРА-тест). При достаточно высокой специфичности подобные тесты имеют не самую высокую чувствительность [А.Б. Косырев, 2011].

Второй тест оценки активации тромбоцитов (SRA-тест) основан на количественном определении выделения радиоактивно меченного серотонина из тромбоцитов, предварительно насыщенных этим серотонином и активированных смесью плазмы больных с гепарином. Этот тест принято считать «золотым стандартом» [А.Б. Косырев, 2011]. Понятно, что подобный метод исследования достаточно сложен и требует использования радиоактивных меток и соответствующей аппаратуры. Предложено большое количество технологических решений. Работы в этой области продолжаются во всём мире, однако нет в полной мере адекватных лабораторных тестов для диагностики патологии системы гемостаза (агрегатометрия, проточная цитометрия) [Т.В. Вавилова, 2010].

Тромбоэластография (ТЭГ) - метод графической регистрации процессов свертывания крови и фибринолиза. Метод базируется на измерении физической прочности сгустка. Небольшое количество крови (обычно около 0,4 мл) помещается в кювету, которая совершает медленные (6 раз в минуту) вращательные колебания на $4,5^\circ$ градуса. В камеру помещается стержень датчика и добавляются активаторы свертывания. Когда в кювете формируется сгусток, стержень начинает вращаться вместе со сгустком. Амплитуда отклонения стержня регистрируется как функция времени. На тромбоэластограмме можно выделить разнообразные параметры, характеризующие как скорость формирования сгустка, так и его финальные характеристики [V.G. Nielsen, B.T. Geary, M.S. Baird, 2000].

Подобно тестам АЧТВ и ПВ, тромбоэластография измеряет только формирование фибринового сгустка, упуская ценную информацию, которую можно извлечь из кинетики образования тромбина. Другим, более техническим недостатком является трудность массовых параллельных анализов. Современные

коагулометры могут определять АЧТВ и ПВ по конвейерному принципу в многочисленных образцах, затрачивая в итоге на каждый образец не более нескольких секунд. Тест генерации тромбина занимает много времени (от 30 до 60 мин), но его теоретически можно проводить параллельно в 96 лунках стандартного планшета, в то время как большинство тромбоэластографов редко имеют больше, чем две кюветы [М.А. Пантелеев и соавт., 2011]

Тромбоэластография успешно применяется для оценки гемостаза при проведении хирургических операций, а также до и после оперативных вмешательств [У.М. Мухамедова и соавт., 2011].

В настоящее время тромбоэластометрия (тромбоэластография) имеет модификацию в виде технологии ROTEM (ротационная тромбоэластометрия). [Т.Н. Гриневич, 2010]. Принцип работы анализатора системы гемостаза цельной крови ROTEM основан на методе ротационной тромбоэластометрии, усовершенствованной и переработанной формы классической тромбоэластографии. Метод основан на графической регистрации изменений вязкости и упруго-эластических свойств в процессе образования фибринового сгустка [P. Di Benedetto et al., 2003]. Тем самым он отображает кинетику всех стадий формирования тромба, его стабильность и плотность, а также фибринолиз. Метод успешно применялся для выявления риска развития венозных тромбоэмболических осложнений у пациентов травматологического профиля [N. Salooja, D.J. Perry, 2001].

Перспективность теста также подтверждается исследованиями L. Ruggeri et al. [L. Ruggeri et al., 2007], которые обнаружили высокую степень положительной корреляции параметров ROTEM со стандартными тестами коагуляции у пациентов травматологического профиля. Значительная корреляция была найдена с лабораторными тестами ПВ, АЧТВ, уровнем фибриногена и количеством тромбоцитов.

Таким образом, в последние десятилетия активно разрабатываются и внедряются новые методы лабораторной диагностики нарушений в системе гемостаза для практических нужд клиницистов. Тем не менее, сведения о

принципах и методах постмортальной диагностики прижизненных нарушений системы гемостаза в доступной литературе практически отсутствуют. Имеются лишь единичные и разрозненные публикации по данной проблематике. Стоит отметить, что на сегодняшний день не существует надежного диагностического теста, который может быть выполнен в посмертном периоде для ответа на вопрос о том, имел ли умерший при жизни нарушения в системе коагуляции.

Впрочем, заслуживает внимание работа Н. Thomsen, К. Pueschel, в которой исследовалась способность тромбоцитов к агрегации в посмертном периоде в течение первых 10 часов после смерти [Н. Thomsen, К. Pueschel, 1999]. В ней сообщается о том, что способность к агрегации осталась практически не измененной для тромбоцитов, собранных в течение первых 2 часов после смерти, между тем резко снижалась между 4 и 8 часами после смерти и была полностью утрачена к 10 часам после наступления смерти. В свете взаимодействия *in vivo* имеющего место между тромбоцитами и факторами свертывания плазмы, эти результаты показывают, что генерализованное свертывание крови прекращается в течение 10 часов после наступления смерти, что связано с потерей агрегационной активности тромбоцитов. После 10 часов фибрин все еще может сохранять свою активность, но недостаточная концентрация тромбина не может в достаточной степени активировать тромбоциты.

В другой работе G.N. Rutty и соавт. представлены результаты с использованием теста PIVKA II (Proteins Induced by Vitamin K Absence). Установлено, что концентрация и биохимическая активность FII, по всей видимости, остается стабильной в пределах 72 ч и, возможно, даже до 7 дней. Не исключено, что данный метод имеет большой потенциал в отношении и других белков каскада свертывания, которые, возможно, могут быть исследованы с помощью подобного антиген-связывающего метода [G.N. Rutty et al., 2003].

1.4. Молекулярно-генетические основы тромбофилий

Достижения молекулярной генетики в настоящее время позволили полностью расшифровать геном человека. Задачи генной инженерии на

ближайшие десятилетия заключаются в обнаружении функциональных возможностей генов. Экспрессия того или иного гена, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт, может влиять на изменения метаболических процессов, лежащих в основе патогенеза как наследственных, так и приобретенных заболеваний, в том числе и в системе гемостаза [З.С. Баркаган и соавт., 2002].

Неразрывная связь и постоянное взаимодействие двух разнонаправленных систем: свертывающей и противосвертывающей - позволяют обеспечить адекватное кровообращение в органах. Любой сбой, разбалансировка в этой сложной системе ведут к цепи патологических реакций, сопровождающихся нарушением микроциркуляции. В патогенезе этих нарушений важнейшее значение имеет взаимодействие с другими гуморальными факторами (эндокринными, иммунными, системой комплемента и др.) и генетическая детерминированность функционирования гемостатических компонентов [Л.А. Кузьмина, 2001].

За последнее время значительно изменились представления об основных причинах тромбозов. Изучение молекулярных механизмов тромбообразования и противосвертывающей системы позволяет с уверенностью говорить о том, что существуют наследуемые, а иногда и приобретенные в процессе жизни дефекты белков, которые и обуславливают предрасположенность того или иного человека к тромбообразованию [М. Ogawa et al., 2004; R. Kreidy et al., 2012], т.е. определяют наличие у него истинной тромбофилии. В отличие от первых двух причин развития тромбоза, выдвигавшихся Р. Вирховом (патология сосудистой стенки и нарушение кровотока), эти дефекты являются генетически детерминированными и, значит, наследуются [Д.М. Зубаиров, 1997; З.С. Баркаган и соавт., 2002].

Понятие о генетической основе тромбофилий было положено в 1956 г. F.L. Jordan и A. Nandorff [F.L. Jordan, A. Nandorff, 1956], а в 1965 г. была идентифицирована генетическая причина дефицита антитромбина цит по [Р.Н. Reitsma, F.R. Rosendaal, 2007]. В 1980-е годы были установлены причины

дефицита протеина С и кофактора протеина S, а спустя 10 лет установлена причина резистентности фактора V к протеину С. В 1996 г. была выявлена мутация в гене протромбина. В последнее 10-летие были расшифрованы гены, ответственные за синтез белков в системе гемостаза [P.H. Reitsma, F.R. Rosendaal, 2007]. На сегодняшний день генетические варианты, определяющие склонность к тромбофилии представлены в системе гемостаза следующим образом.

В плазменных факторах свертывающей системы:

Фактор I, фибриноген (FGB beta polypeptide), является белком острой фазы воспаления [R.E. Schutgens et al., 2007]. Фибриноген сначала превращается в фибрин-мономер, затем происходит процесс полимеризации его сначала в олиго- и затем в полимеры. Описаны генетические дефекты, проявляющиеся в нарушении структуры любой из трех цепей фибриногена A α -, B β - и γ -цепи. Вариант *A4250G* в гене α -субъединицы фибриногена приводит к замене Thr в положении 312 на Ala. Данный полиморфизм ассоциируется с предрасположенностью к цереброваскулярным заболеваниям [C. Najat et al., 2004]. Вариант *G-455A* в гене β -субъединицы фибриногена (FGB) обуславливает повышенную транскрипцию гена и, соответственно, приводит к повышенному уровню фибриногена в крови, что влечет за собой увеличение вероятности образования тромбов [М.А. Репина с соавт., 2006]. Дисфибриногемии могут быть причиной как тромбозов, так и геморрагий [Y.M. Shen et al., 2011]. Связь между дефектами молекулы и фенотипом тромбозов пока неясна. Среди имеющих тромботических осложнений частота их невелика и составляет 0,8%. Продукт деградации нерастворимого фибрина представлен D-димером, который свидетельствует об активации фибринолиза, т.е. заключительного этапа гемокоагуляции и может служить маркером данной патологии [М.А. Репина с соавт., 2006].

Фактор II, протромбин, представляет собой гликопротеид, синтезируется в печени в присутствии витамина К. Тромбин – узкоспецифичная сериновая протеиназа семейства трипсина, ключевой фермент свертывающей системы крови, образуется в результате частичного протеолиза протромбина под действием

фактора Ха свертывания крови в участках повреждения сосудов и ткани [Л.Р. Горбачева с соавт., 2006]. Мутация $G \rightarrow A$ (20210) в гене протромбина приводит к риску формирования тромбов [С.В. Акиньшина, 2006]. Поскольку данная мутация не затрагивает последовательности, кодирующие аминокислоты, потому что расположена в нетранслируемой зоне гена, механизм ее прокоагулянтного действия до сих пор точно не установлен. Предполагают, что нуклеотидная замена приводит либо к увеличению стабильности мРНК протромбина, либо к повышению эффективности ее трансляции. Действительно, у этой группы больных обнаруживается повышение уровня протромбина в плазме в 1,3–1,4 раза по сравнению с нормой, что косвенно подтверждает высказанное выше предположение и на настоящий момент является единственным выявленным изменением, способным усиливать прокоагулянтный потенциал [Е.А. Калашникова, С.Н. Кокаровцева, 2005]. Частота встречаемости в общей популяции населения Европы данной мутации не превышает 1–4%, причем среди населения южных областей Европы она выявляется значительно чаще, нежели в северных областях. Ее наличие повышает риск венозных тромбозов в 3 раза. Данная мутация может сочетаться с Лейденовской мутацией у больных, страдающих системной красной волчанкой. В клинических исследованиях маркером по определению склонности к повышенному тромбообразованию является определение 1 + 2 фрагментов протромбина. Высказывается мнение, что это более чувствительный биохимический маркер, чем определение D-димера [П.Д. Микко с соавт., 2002].

Фактор III, тканевой тромбопластин (tissue factor – TF), состоит из белка апопротеина III и комплекса фосфолипидов, входит в состав мембран клеток многих тканей. Является матрицей для развертывания реакций, направленных на образование протромбиназы по внешнему пути. Полиморфизм включает два часто встречающихся гаплотипа, характеризующихся наличием (-1208 *Ins*) или отсутствием (-1208 *Del*) последовательности из 18 пар нуклеотидов (пн) в позиции 1208. Аллель 1208 *Ins* ассоциируется с повышенным содержанием

тканевого фактора и возрастанием риска венозных тромбозов [B.S. Donahue et al., 2003]. Тканевой фактор специфичен для каждой клетки организма.

Фактор V, проакцелерин, синтезируется в печени, активируется тромбином (фактор IIa). Создает оптимальные условия для взаимодействия фактора Xa и протромбина (фактор II). В 1993 г. было описано нарушение в системе свертывания крови, обусловленное резистентностью к активированному протеину C (АПС) [P.H. Reitsma, F.R. Rosendaal, 2007; M. Makris, 2012]. Мутация гена (замена гуанина на аденин в положении 1691), кодирующего V фактор свертывания крови, приводит к замещению в его полипептидной цепи аргинина глутамином в положении 506. Это один из трех участков фактора V, в которых он расщепляется естественным антикоагулянтном – активированным протеином C. Данная мутация названа лейденской мутацией фактора V. Эта замена приводит к тому, что фактор Va становится более устойчивым к расщепляющему действию АПС, следовательно, вызывает усиление прокоагулянтной активности крови по следующему механизму: снижение скорости деградации фактора Va, повышение образования тромбина и снижение инактивации активированного фактора VIII. К тому же, прокоагулянтное действие фактора V (Лейден) может опосредоваться через стимуляцию активированного тромбином ингибитора фибринолиза (ТАФИ), что приводит в конечном итоге к повышенной устойчивости фибринового сгустка к деградации. Клиническим проявлением указанной мутации является предрасположенность к манифестации инфаркта миокарда (ИМ) у лиц молодого возраста [Е.Н. Данковцева с соавт., 2005], к тромбозу глубоких вен [G. Grünbacher et al., 2007].

Фактор VII, или проконвертин гликопротеид, синтезируется в печени под влиянием витамина К, принимает участие в активации протромбиназы по внешнему пути. Активируется факторами XIIa, Xa, IXa, IIa и при взаимодействии с тромбопластином (фактор III). Активация фактора VII зависит от содержания тканевого фактора. Для фактора VII обнаружен выраженный полиморфизм генов. Все эти изменения вызывают целый ряд порой противоречивых клинических проявлений. Полиморфизм фактора VII может как способствовать повышенному

рisku образования тромбозов, так и наоборот – снижать этот риск. С. Sass и соавт. [C. Sass et al., 2004] предполагают, что полиморфизм гена фактора VII *Arg353Gln 10976 G/A* может ассоциироваться с повышением артериального давления. Двойная мутация у гетерозигот с заменой *A → G* в позиции *10833* и *C → A* в позиции *9643*, как результат – замена аминокислот Met306Val и Thr181Asn соответственно, что вызывает изменение пространственной конфигурации и функции фактора VII [C.Q. Tu et al., 2006]. Полиморфизм в гене фактора VII *R353Q* может быть связан с риском инфаркта миокарда [A.S. Lindman et al., 2005]. Еще один полиморфизм, расположенный в интроне *1a* гена фактора VII, возникает в результате нуклеотидной замены *G* на *A* в позиции *+73*. В исследуемых группах аллель *A73* присутствовал вместе с аллелями *10 bp insertion* и *Q353*, демонстрируя строгое неравновесие по сцеплению. Одновременное присутствие *A73* с аллелями *10 bp insertion* и *Q353* ассоциировалось с наиболее низкими уровнями фактора VII, измеренными по уровням коагулянтной активности, активированного фактора VII и антигена фактора VII, приводя к снижению риска инфаркта миокарда. Таким образом, эта интронная мутация сама по себе или в ассоциации с другими полиморфными маркерами гена фактора VII может оказывать протекторное действие в отношении ИМ [M. Ogawa et al., 2004]. Следующий полиморфизм гена фактора VII, содержащего аллель *-402A*, а также *-401T/-323del/-122C* и *Gln353* аллели также ассоциируется с пониженным риском развития ИМ [A.P. Reiner A.P., 2007].

Фактор фон Виллебранд (vWF или vWA). Представляет собой большой многомерный гликопротеин, сохраняющийся в гранулах тромбоцитов, циркулирующий в кровотоке и содержащийся в эндотелии, маркер повреждения эндотелия. Он обеспечивает адгезию тромбоцитов через рецепторы GP Ib, а при их активации участвует в образовании мостиков через рецепторы GP IIb/IIIa. vWF имеет 2 группы активных центров: первые – для соединения с коллагеном и гликозаминогликанами субэндотелиального матрикса, вторые – для связи со специфическими тромбоцитарными рецепторами. Согласно современным представлениям, vWF взаимодействует в первую очередь с коллагеном и

микрофибриллами субэндотелия, в результате чего происходят конформационные изменения, необходимые для последующего присоединения к GP Ib тромбоцитов. Он связывает коллаген субэндотелия и рецептор тромбоцитов – GP Ib и обеспечивает иммобилизацию и активацию тромбоцитов. vWF необходим для адгезии тромбоцитов к коллагену в участках повреждения сосудов с высокой скоростью (c^{-1}) и напряжением сдвига (H/m^2). Таким образом, vWF становится связующим звеном между тромбоцитом и оголенным субэндотелиальным слоем. Такое его соединение с тромбоцитарными рецепторами приводит к увеличению трансмембранного тока кальция в тромбоцит через кальциевые каналы и дальнейшую активацию тромбоцитарных комплексов IIb/IIIa, при этом последние приобретают способность присоединять как фибриноген, так и vWF. Современными исследованиями установлено, что в атеросклеротически измененных артериях наибольшую роль в агрегационных процессах тромбоцитов приобретает связь vWF – GP IIb/IIIa. Этот факт позволил рассматривать увеличение содержания vWF, наряду с повышением концентрации фибриногена, как основной маркер гиперкоагуляции. В ряде исследований было отмечено, что повышение содержания vWF после перенесенного острого инфаркта миокарда (ОИМ) отражает высокий риск повторного его возникновения и смерти [С.М. Струкова, 2004]. Для гена *vWF* известно 33 полиморфных сайта. Высокий уровень полиморфизма данного гена позволяет его использовать не только в медицинской и популяционной генетике, но применять с целью идентификации личности. Экзоны 17 и 42 гена *vWF* являются «самыми горячими точками» для мутаций [A. Goodeve et al., 2007]. Замена *Thr789Ala* в *vWF* ассоциируется с повышенной концентрацией фактора в плазме крови, что предполагает склонность к повышенному тромбообразованию. Однако проведенные исследования Т. Klemm и соавт. [Т. Klemm et al., 2005] не установили прямую связь между повышенной концентрацией vWF и тромбообразованием.

Факторы VIII и IX, их мутации вызывают наследственное заболевание – гемофилию А и В, в связи с чем в данном обзоре полиморфизм генов VIII и IX факторов свертывания не рассматривается.

Фактор X или **фактор Стюарта-Прауэра** представляет собой гликопротеид, синтезируемый в печени, под влиянием витамина К. Фактор Ха, являясь протромбиназой, активируется факторами VIIa и IXa и активизирует фактор II. Повышение уровня X фактора влечет за собой увеличение риска тромбоза. Проведенные исследования показали, что полиморфизм гена X фактора в зоне промотора *TTGTGA* вставки между положениями *-343A* и *-342G*, *C/T* в положении *-222*, *C/A* в положении *-220* и *C/T* в положении *-40* не имеют отношения к тромбозам [M.C. de Visser et al., 2001]. Наследственный дефицит фактора X объясняется мутацией $G \rightarrow A$ в экзоне 5 гена фактора X. Эта мутация приводит к замене *Arg* на *Gly* в кодоне 114 второго подобного *EGF* домена [E. Morishita et al., 2001].

Фактор XI, или плазменный предшественник тромбопластина, представляет собой гликопротеид, гомодимер, состоящий из двух полипептидных цепей с 607 аминокислотами, синтезируется в печени и активируется факторами XIIa, Флетчера и Фитцджеральда. При активации фактор XI подразделяется на тяжелую и легкую цепи. Тяжелая цепь обладает четырьмя активными центрами с определенными функциями. Ген фактора XI имеет 15 экзонов. В существующих базах данных насчитывается более 81 мутации гена фактора XI. Часто наблюдаемые мутации – тип II и мутации типа III (*Gln116Stop* и *Phe283Leu*) и *Cys38Arg*. Значителен полиморфизм аллелей фактора XI у европеоидов и народов негроидной расы [A. Dossenbach-Glaninger, P. Hopmeier, 2005]. В Японии в 2000 г. была выявлена мутация гена фактора XI с заменой $G \rightarrow A$ в кодоне *501*, экзона *13*. Клинически, каким-либо образом, данная мутация себя не проявила. Увеличение в сыворотке крови концентрации фактора XI приводит к повышенному риску тромбозов глубоких вен и венечных артерий. В то же время, есть сообщения, рассматривающие этот ген как кандидата на роль глубоких венозных тромбозов у женщин в постменопаузальном периоде. Концентрация фактора XI в сыворотке крови может возрасть из-за эндотоксикаций. Данный факт был установлен при проведении исследований на здоровых добровольцах [P.H. Reitsma et al., 2003; P.H. Reitsma, F.R. Rosendaal, 2007], Высказывается мнение, что взаимоотношение

между уровнем фактора XI и тромботической болезнью является результатом повреждающих влияний. Какие же именно вещества влияют на повышение уровня концентрации фактора XI в настоящее время не установлено. Таким образом, пока нет достоверных сведений о мутациях в гене фактора XI, которые бы приводили к развитию тромбозов. Выявленные мутации в гене сами по себе не влияли на фенотип [J. Taron-Bretonnière, 2000].

Фактор XII (фактор Хагемана), белок, синтезируемый эндотелиальными клетками, лейкоцитами, макрофагами, гепатоцитами. Фактор XII активируется отрицательно заряженными поверхностями, адреналином, калликреином; запускает внешний и внутренний пути образования протромбиназы и фибринолиза, активирует фактор XI и прекалликреин. Имеется корреляционная зависимость между полиморфизмом $46 C \rightarrow T$ гена фактора XII и концентрацией фактора XII в плазме крови [R.M. Bertina et al., 2005]. Данная зависимость объясняется низкой эффективностью трансляции или же влиянием на стабильность мРНК. При снижении концентрации фактора XII, вне зависимости от возраста пациента, риск тромбообразования увеличивается в 6 раз [G. Grünbacher et al., 2007]. Для повышенного риска тромбообразования в венечных артериях характерно преобладание генотипа T/T над C/C или C/T , что обуславливает низкое содержание фактора XII [R.F. Franco, P.H. Reitsma, 2001]. Носители гомозигот не увеличивают риск тромбозов. Дефицит фактора XII вызывает увеличение длительности активизированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), но не приводит к значительному кровотечению. Фактор XII активизирует фибринолитическую активность. Дефицит его предполагает склонность к венозным тромбозам, а у женщин еще и к привычным выкидышам. Однако T. Koster и соавт. [T. Koster et al., 1994] выражают сомнения в том, что имеется прямая зависимость между низким содержанием фактора XII и возникновением тромбоза глубоких вен. Таким образом, в отношении развития тромбоза глубоких вен полиморфизм гена фактора XII не является облигатным, а его определение является неэффективным [G. Grünbacher et al., 2007]. Тем не менее, в качестве прогноза тромбоза венечных

артерий и привычного выкидыша у женщин вопрос, скорее всего, остается открытым.

Фактор XIII – фибринстабилизирующий фактор. Глобулин, термолабилен, стабилен при хранении плазмы, в сыворотке отсутствует. Трансглутаминаза, тетрамерная структура которой представлена двумя активными А и двумя защитными субъединицами В. Расщепление у 37 аминокислоты N – концевого пептида от субъединицы фактора XIII – тромбином А приводит к формированию активизированного фактора XIII. Трансглутаминаза поперечно сшивает фибрин мономер, что повышает устойчивость свертка крови к фибринолитическим ферментам. Выявлен общий полиморфизм фактора XIII с заменой *Val34Leu*, что ассоциируется с антитромботическим эффектом в венах и в артериях [V.S. Hancer et al., 2006], что связано с заменой *G* на *T* в кодоне 34 экзона 2, который кодирует валин-лейциновое изменение в субъединице А, расположенной близко к участку активации тромбина. Врожденный дефицит фактора XIII является редкой аномалией, сопровождающейся диатезом, повышенной кровоточивостью.

В тромбоцитарном факторе гемостаза исследован полиморфизм *L33P C* → *T* гена тромбоцитарного рецептора фибриногена (*ITGB3*). Этот полиморфизм имеет прогностическое значение, позволяющее определить риск развития заболеваний сердечно-сосудистой системы вследствие нарушений в свертывающей системе крови, оценить вероятность сердечно-сосудистой патологии у потомства. Ген *ITGB3* кодирует аминокислотную последовательность белковой молекулы тромбоцитарного рецептора фибриногена. Рецептор фибриногена обеспечивает взаимодействие тромбоцитов с фибриногеном плазмы крови, в результате чего происходит агрегация тромбоцитов и образование тромба. Полиморфизм *L33P C* → *T* связан с заменой нуклеотида цитозина (*C*) на тимин (*T*) в участке ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность белковой молекулы тромбоцитарного рецептора фибриногена. Вследствие нуклеотидной замены происходит замена аминокислоты в белковой цепи рецептора, что приводит к изменению его свойств. В случае варианта *G* полиморфизма тромбоциты приобретают повышенную склонность к агрегации. В

то же время, у пациентов с этим вариантом полиморфизма отмечается лучшая эффективность аспирина как противосвертывающего препарата [E.J. Weiss et al., 1996].

Тромбоцитарные мембранные гликопротеины Адгезия и агрегация тромбоцитов происходят с участием специфических тромбоцитарных мембранных гликопротеинов GPIa/IIa, GPIba и GPIIb/IIIa, и эти процессы являются начальной ступенью в формировании тромба и развитии острых коронарных синдромов. Гликопротеин Ia (интегрин $\alpha 2\beta 1$, GPIa) входит в состав гликопротеинового рецептора Ia/IIa, находящегося на поверхности тромбоцитов. При участии этого рецептора происходит адгезия тромбоцитов к коллагену, размещение их в субэндотелиальных структурах и последующая активация. Идентифицирована точечная мутация гена *GPIa C807T* в кодоне *Phe224*, которая ассоциируется с низкой или высокой плотностью тромбоцитарных рецепторов Ia/IIa и соответственно с низкой или высокой скоростью адгезии тромбоцитов к коллагену типа I. Таким образом, описанный полиморфизм может лежать в основе генетической предрасположенности к развитию тромботических заболеваний [G. Candore et al., 2006].

В последние годы активно обсуждается повышенный уровень гомоцистеина в плазме крови как независимый фактор риска развития тромботических осложнений [С.В. Акиншина с соавт., 2006; А.С. Петриков с соавт., 2012]. Высокий уровень гомоцистеина в плазме крови обусловлен нарушениями в системе фолатного цикла. В частности, фермент метилентетрагидрофолатредуктаза - играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Фермент катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, который является ее активной формой, необходимой для образования метионина из гомоцистеина и далее - S-аденозилметионина, играющего ключевую роль в процессе метилирования ДНК [P.M. Ueland, R. Rozen, 2005]. Наиболее изученной мутацией является вариант, в котором нуклеотид цитозин (C) в позиции 677 заменен тимидином (T), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на

остаток валина (позиция 223) в сайте связывания фолата. Такой полиморфизм MTHFR обозначается как мутация *C677T*. У лиц, гомозиготных по данной мутации (генотип *T/T*), отмечается термоллабильность MTHFR и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения. В целом, по населению земного шара мутация *677T* гена *MTHFR* распространена достаточно широко у представителей европейской расы - до 62 - 72% [I. Spiroski et al., 2008]. Дефекты в данном гене часто приводят к различным заболеваниям с широким спектром клинических симптомов: умственное и физическое отставание в развитии, пренатальная смерть или дефект плода, кардиоваскулярные и нейродегенеративные заболевания, диабет, рак и другие. У носителей гетерозигот *C/T* во время беременности наблюдается дефицит фолиевой кислоты, что может приводить к дефектам развития нервной трубки у плода. Курение усиливает влияние мутации. У носителей двух аллелей *T/T* (гомозиготное состояние) особенно высок риск развития побочных эффектов при приеме лекарственных препаратов, используемых в химиотерапии рака. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является независимым фактором риска атеросклероза и атеротромбоза (независимым от гиперлипидемии, гипертензии, сахарного диабета и т.д.). Установлено, что 10% риска развития коронарного атеросклероза обусловлено повышением уровня гомоцистеина в плазме крови. При исследовании группы пациентов с ГГЦ и группы здоровых доноров гомозиготная форма *677T* была найдена у 73% пациентов с ГГЦ и только у 10% здоровых доноров. Наличие гомозиготной формы *677T* приводит к почти 10-кратному повышению риска ГГЦ. Пациенты с ГГЦ также имели пониженные уровни фолиевой кислоты и витамина В₁₂, потребляли больше кофе и курили чаще, чем здоровые доноры [A.V. Guttormsen et al., 1996]. При исследовании связи между мутацией *677T* и сердечно-сосудистыми заболеваниями обнаружено, что гомозиготная мутация *677T* встречается гораздо чаще у пациентов с кардиоваскулярными заболеваниями, чем у здоровых доноров. У молодых пациентов, имевших ишемию артерий, гомозигота *T/T* встречается в 1,2 раза чаще [M. Klerk et al., 2002; R.J. Kim, R.C. Becker, 2003].

PAI-1 (Ингибитор активатора плазминогена SERPINE1 – PAI-I) Полиморфизм –675 4G/5G – этот белок (известный также как SERPINE1 и PAI-1) один из основных компонентов тромболитической плазминоген-плазминовой системы [A. Hamsten et al., 1985]. PAI-1 ингибирует тканевой и урокиназный активаторы плазминогена. Соответственно, PAI-1 играет важную роль в предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям. Гомозиготный вариант 4G полиморфизма –675 4G/5G является фактором риска развития тромбозов и инфаркта миокарда. Распространенность гомозиготной формы данного варианта в европейских популяциях составляет 5-8%. Вариант 4G приводит к повышенной экспрессии гена и, следовательно, к повышенному уровню PAI-1 в крови. Следовательно, тромболитическая система менее эффективна и риск тромбообразования возрастает. В исследовании больших выборок населения (357 пациентов и 281 здоровых доноров) было установлено, что вариант 4G/4G повышает риск развития тромбозов в среднем в 1,7 раза. Повышение риска было гораздо выше для подгрупп пациентов с тромбозом портальной вены и тромбозом внутренних органов. Однако не было установлено статистически значимых корреляций для подгрупп пациентов с глубоким тромбозом вен, церебральным или ретинальным тромбозами [G. Balta et al., 2002]. Исследование 1179 здоровых доноров и их близких родственников показало, что вариант 4G ассоциирован с наличием семейного анамнеза ишемической болезни сердца. В этом исследовании большой выборки населения, среднестатистическое повышение риска при наличии гомозигот составило 1,6 раза [M. Margaglione et al., 1998]. Варианты полиморфизма 4G/5G особенно заметно коррелируют со средними уровнями PAI-1 в крови при наличии ожирения.

Оксид азота (NO) – эндотелиальный фактор релаксации [R.M. Palmer et al., 1987] – играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов (вазодилатация) и тромбогенеза [S. Moncada et al., 1991]. Снижение содержания NO ведет к нарушению нормальной деятельности сосудов и вазомоторики, усилению процессов тромбообразования и атерогенеза [J.P. Cooke, P. Tsao, 1992; G.K. Davis, D.H. Roberts, 1997]. NO вырабатывается из L-аргинина при участии

фермента NO-синтазы [R.M. Palmer et al., 1988]. Известно три формы данного фермента, кодируемые разными генами [R.G. Knowles, S. Moncada, 1994]. Эндотелиальная NO-синтаза является продуктом гена *NOS3*, расположенного на хромосоме 7q36 [S. Nadaud et al., 1994]. Среди генов, кодирующих NO-синтазу, наиболее вероятным кандидатом на участие в развитии сердечно-сосудистых заболеваний является именно ген *NOS3*. В интроне 4 данного гена расположен минисателлит *ecNOS4a/4b*, насчитывающий два аллеля, которые состоят из 4 (аллель 4a) или 5 (аллель 4b) тандемных повторов размером 27 п.н. [X.L. Wang et al., 1996]. В популяции аллель с пятью повторами встречается значительно чаще, чем с четырьмя. У лиц, гомозиготных по редкому аллелю, повышен уровень нитратов и нитритов в крови, напрямую связанный со скоростью выработки NO эндотелием сосудов, что свидетельствует о потенциальной генетической роли генотипа *4a/4a*, как фактора риска развития атеросклероза и заболеваний, приводящих к нарушению нормальной выработки NO [X.L. Wang et al., 1997; T. Tsukada et al., 1998].

В литературе также имеются сведения о генетических вариантах, определяющих склонность к тромбозам за счет нарушений противосвертывающей системы крови (ПСК) - антитромбин III [С. Бутенас, К.Г. Мяни, 2002]; тромбомодулин [L. Norlund, 1997]; протеин С и протеин S [G. Castaman et al., 2007]; протеин Z [С.У. Vossen et al., 2007]; в иммунной системе (лимфотоксин- α [F.W. Asselbergs et al., 2007]).

Таким образом, стоит отметить, что в настоящее время насчитывается порядка двух десятков генов-кандидатов свертывающей и противосвертывающей систем, которые в той или иной мере влияют на возникновение тромбоза. Один из способов решения задачи в разграничении наследственных и приобретенных тромбофилий может заключаться в выявлении маркеров наследственной и/или приобретенной патологии, в проведении молекулярно-генетического типирования факторов системы гемостаза. Не все мутации генов этой системы играют существенную роль в развитии патологии. Высокую группу риска составляют люди с такими наследственными формами тромбофилии, как мутация в гене

метилентетрагидрофолатредуктазы *C677T* [С.М. Баймурадова с соавт., 2004], мутация в гене протромбина *G20210A* [П.Д. Микко с соавт., 2002; Е.А. Калашникова, С.Н. Кокаровцева, 2005; Л.Р. Горбачева с соавт., 2006; С.В. Акиншина, 2006], мутация Лейден в гене фактора V [G. Grünbacher et al., 2007], мутация *675 4G→5G* в гене PAI-1 [A. Hamsten et al, 1985; A.L. Miranda-Vilela, 2012], мутация *G455A* в гене фибриногена [С. Hajat et al., 2004; М.А. Репина с соавт., 2006], мутация *1565 T→C (1A/2A)* в гене гликопротеина IIIa [G. Candore et al., 2006]. Имеющиеся сведения позволяют предположить, что в настоящее время нет строгой количественной оценки вклада того или иного полиморфного аллеля в определенное клиническое состояние развития тромбоза. Для индивидуального прогнозирования и создания рекомендаций необходимо учитывать особенности конкретной популяции, а это невозможно без опоры на молекулярно-генетические исследования. Не исключен для каждой популяции строго определенный набор генов-кандидатов по заболеваниям, в том числе и сердечно-сосудистым. Поэтому проверка прогностического значения полиморфизма генов-кандидатов и других факторов риска для патологии, сопровождающейся повышенным образованием тромбов, в различных популяциях и этнических группах на основе молекулярно-генетического исследования является актуальной; с учетом того, что около 1/3 случаев тромбозов в клинике на сегодняшний день остаются без установления истинной причины [J. Stikarová et al., 2012].

1.5. Состояние перекисного окисления липидов в норме и при патологии сосудистой системы

Перекисное окисление липидов – это сложный процесс последовательных реакций окисления кислородом липидов, преимущественно полиненасыщенных жирных кислот, включающий стадии взаимодействия липидов со свободнорадикальными соединениями с образованием свободных радикалов липидной природы.

Свободные радикалы – это молекулы или части молекул, имеющие на внешней орбитали неспаренный электрон. Наличие неспаренного электрона на внешней орбитали является обязательным признаком и лежит в основе высокой реакционной способности свободных радикалов. Заряженные свободные радикалы, называемые катион- или анионрадикалами, образуются в процессе одноэлектронного окисления или восстановления. [В.П. Скулачев, 1999; Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина, 2009].

Перекисное окисление нарушает строение биологических молекул. В белках происходит окисление некоторых аминокислот, в результате нарушается их структура, между ними образуются ковалентные связи, что активизирует протеолитические ферменты в клетке, которые гидролизуют неповрежденные белки [О.Л. Белая с соавт., 2009]. Активные формы кислорода также разрушают структуру ДНК. Связывание атома Fe^{2+} с ДНК облегчает образование ОН-радикалов, нарушающих структуру азотистых оснований [К.Т. Турпаев, 2002; Е.Б. Меньщикова с соавт., 2006, 2008].

Жирные кислоты, содержащие двойные связи, расположенные через $-CH_2-$ группу наиболее подвержены действию активных форм кислорода. Именно от этой $-CH_2-$ группы свободный радикал (инициатор окисления) легко отнимает электрон, в результате чего липид, содержащий эту кислоту, превращается в свободный радикал [Н. Sies, W. Stahl, 1995; Е.Б. Меньщикова с соавт., 2008].

Природные свободные радикалы подразделяются по механизму образования и участию в дальнейших реакциях на первичные, вторичные и третичные. Первичные радикалы образуются в реакциях с участием специализированных молекулярных механизмов (семихиноны, супероксид, монооксид азота).

Вторичные радикалы образуются из первичных в результате дальнейших реакций. К ним относится гидроксильный радикал, образующийся из H_2O_2 при участии ионов металлов переменной валентности, и пероксинитрит ($ONOO$), который образуется в реакции между оксидом азота (NO) и супероксид анионрадикалом (O_2^-) кислорода. Вторичные радикалы обладают большей

активностью и поэтому наносят организму большой вред [И.И. Матвеева с соавт., 2008].

К третичным радикалам относятся соединения, образующиеся при взаимодействии первичных и вторичных радикалов с антиоксидантами или какими-либо другими легко окисляющимися веществами. Чужеродные радикалы образуются в организме при действии экзогенных физико-химических факторов: ионизирующая и ультрафиолетовая радиация, техногенные токсические продукты и т.д. [А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012].

Обязательным участником свободнорадикального ПОЛ является кислород, но не молекулярный, а его свободнорадикальные формы, называемые активными формами кислорода (АФК). К АФК относят и редко встречающийся в клетке синглетный кислород - $^1\text{O}_2$. Он образуется при переходе одного из электронов на другую орбиталь с инверсией спина, при этом образуются молекулы кислорода, содержащие на одной π -орбитали спаренные электроны с антипараллельными спинами [К. Briviba et al., 1997; А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012]. Таким образом, перекисная гипотеза гибели клетки подтверждается следующими обстоятельствами (рисунок 3):

Во-первых, в биологических мембранах содержатся основные субстраты ПОЛ – ненасыщенные жирные кислоты и главный катализатор процесса – негеминовое железо, а также вещества, способные регенерировать активную двухвалентную форму железа (аскорбиновая кислота, SH – соединения). В нормально функционирующей клетке скорость ПОЛ ограничена самой структурой биомембран и наличием природных антиоксидантов. Нарушение молекулярной организации мембран или разрушение антиоксидантов приводят к усилению ПОЛ.

Во-вторых, ПОЛ в мембранах идет с возрастающей скоростью, вследствие самого аутокаталитического механизма свободнорадикального окисления и в результате разрушения антиоксидантов и нарушения мембранной структуры.

В-третьих, продукты ПОЛ, вызывая полимеризацию белков и липидов, разрушая ферменты и рецепторы, изменяя проницаемость мембран, приводят к

разрушению и самих структур биомембран, в которых идет процесс ПОЛ. [Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, 1972]

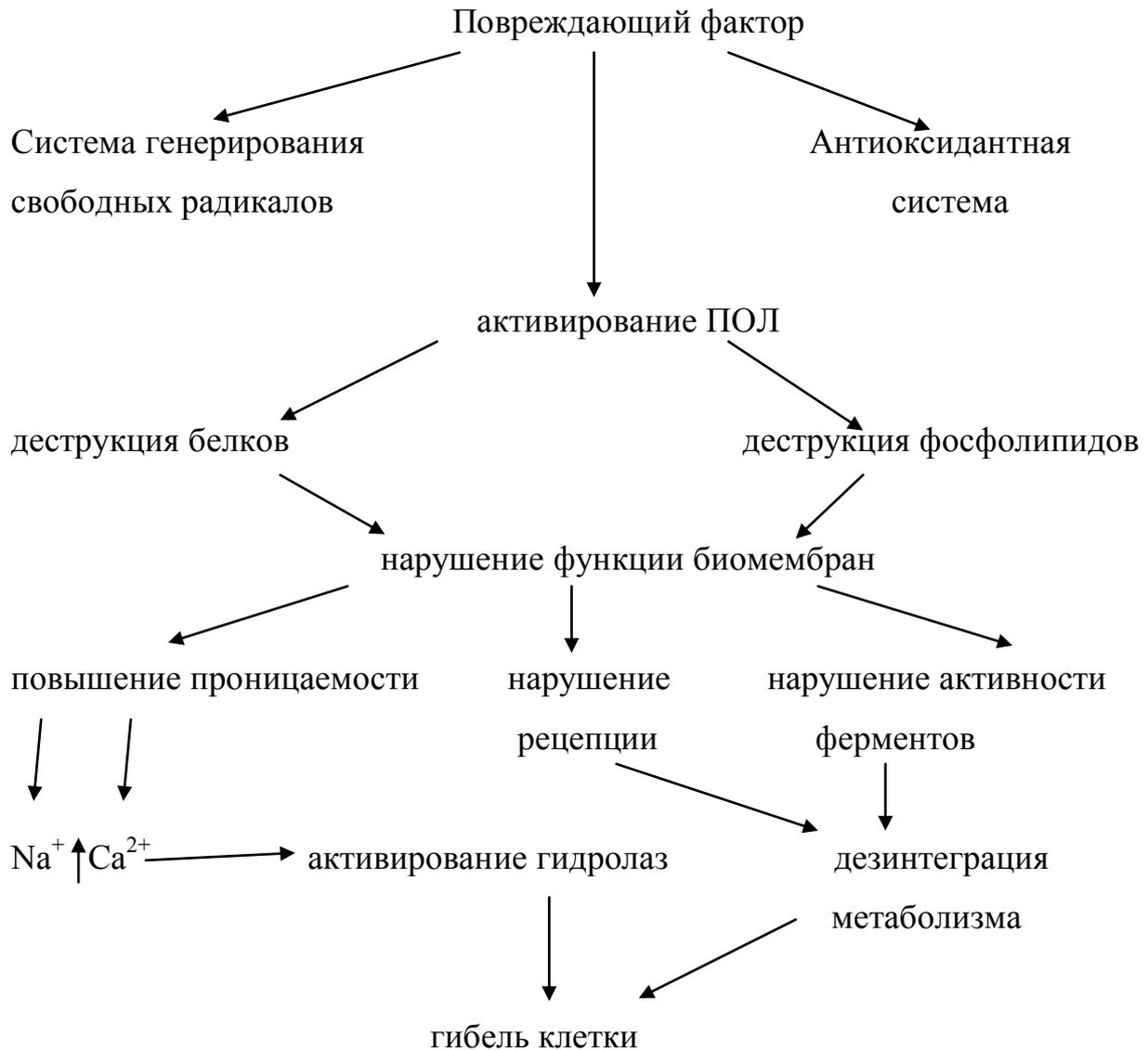


Рис. 3. Перекисная гипотеза гибели клетки

Антиоксидантная система

Существование животных организмов и человека в кислородсодержащей воздушной среде, обеспечивающей постоянное генерирование АФК и образование токсических продуктов свободнорадикального окисления, было бы невозможно без системы, регулирующей эти процессы. В организме существует антиоксидантная система (АОС), сопоставимая по мощности с системой стимулирующей свободнорадикальное окисление, таким образом, оба процесса являются уравновешенными [Д.М. Габитова с соавт., 2006]. Поэтому в

физиологических условиях организм использует систему свободнорадикального окисления для обеспечения процессов жизнедеятельности, не вызывая при этом повреждения биологических структур, так как все процессы ПОЛ находятся под контролем и регулируются соответствующими компонентами АОС [Б.Н. Лю с соавт., 2006].

Выделяют три уровня регуляции интенсивности свободнорадикального окисления. Первый уровень – поддержание в клетках и тканях сравнительно низкого парциального давления кислорода. Сюда в первую очередь относятся дыхательные ферменты, обеспечивающие в организме различные окислительные реакции [Б.Н. Лю с соавт., 2006].

Следует отметить, что провоцирующим фактором, стимулирующим свободнорадикальное окисление, может выступать как гипероксия, так и гипоксия, поскольку в условиях гипоксии возрастает содержание восстановленных кофакторов, катализирующих образование АФК [В.Т. Майданник с соавт., 2006]. Второй уровень защиты – антирадикальный, который обеспечивается веществами различного характера, нейтрализующими свободные радикалы, переводя их в нерадикальные соединения [А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012]. Третий уровень – антиперекисный - заключается в уничтожении уже образовавшихся перекисей [Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, 1972].

В организме существует ряд взаимосвязанных антиоксидантных систем, основная роль которых заключается в поддержании ферментативных и неферментативных реакций свободнорадикального окисления на стационарном регулируемом уровне [Э.Г. Горожанская, 2010]. На каждом этапе ПОЛ существует своя специализированная система, осуществляющая эти антиоксидантные функции. Часть из этих систем строго специфична, например, супероксиддисмутаза, каталаза, другие, такие как глутатионпероксидаза или α -токоферол, обладают большей широтой действия и меньшей субстратной специфичностью. Следует отметить, что одна из частей тканевых антиоксидантов имеет гидрофильный, другая гидрофобный характер, что обуславливает

активность их как в водной, так и в липидной фазах (рисунок 4) [Д.М. Габитова с соавт., 2006].

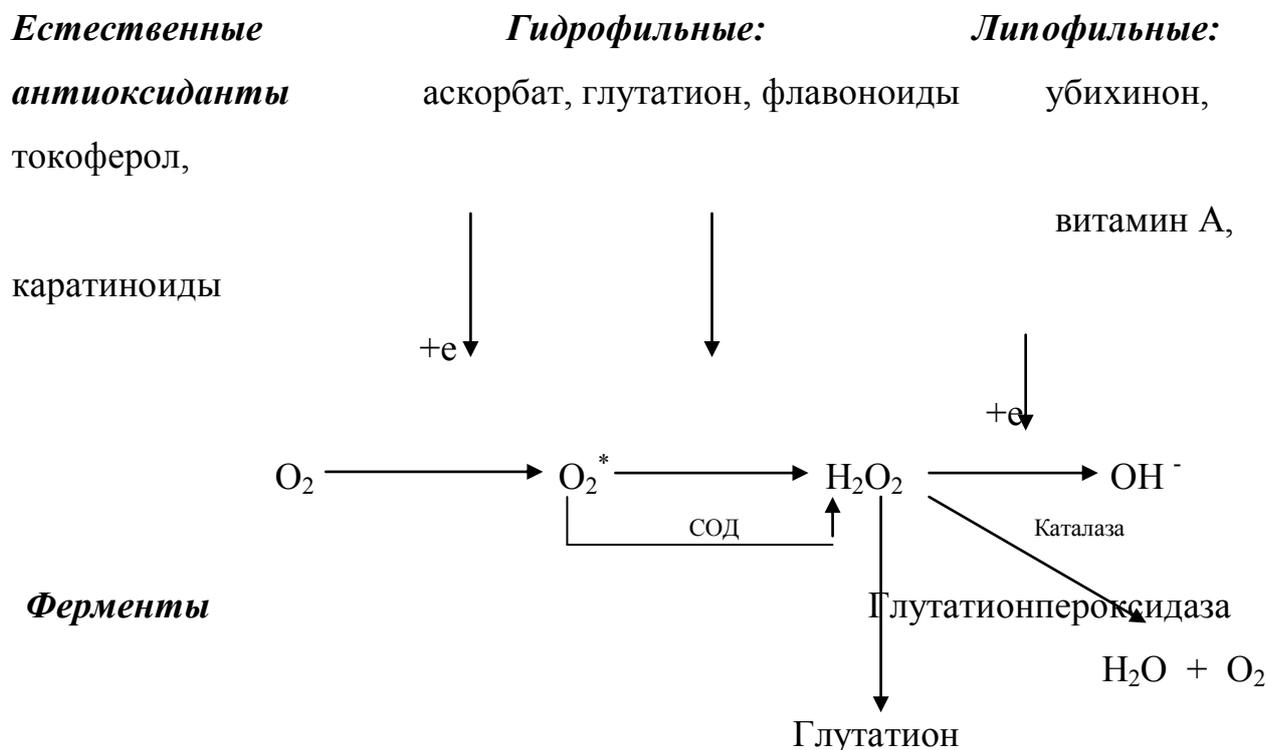


Рис. 4. Одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода до воды, которое происходит в клетках при участии ряда ферментов [А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012].

В настоящее время известны следующие ферментные системы: 1) супероксиддисмутаза+каталаза; 2) глутатионпероксидаза+ глутатионредуктаза; 3) глутатион-S-трансфераза+глутатионредуктаза.

Супероксиддисмутаза (СОД) – ключевой фермент, лимитирующий скорость всего цикла превращений супероксидного анион-радикала в другие активные формы кислорода и контролирующей тем самым скорость перекисного окисления липидов. СОД имеет несколько изомерных форм, отличающихся строением активного центра. Молекула СОД состоит из двух идентичных субъединиц, связанных дисульфидным мостиком. Каждая субъединица содержит один атом Cu^{2+} и один атом Zn^{2+} , атом цинка стабилизирует молекулу СОД, а медь участвует в реакции дисмутирования. Медь-цинковая форма чувствительна

к цианиду, содержится в цитоплазматическом матриксе, ядрах, пероксисомах и в митохондриальном пространстве эукариотических клеток. [Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, 1972; I. Fridovich, 1997]. Марганцевая форма (Mn-SOD) цианидрезистентна, локализована в митохондриях, состоит из 4 субъединиц, содержащих ион Mn в активном центре. Ее характерной особенностью является устойчивость к действию перекиси водорода, а также индуцибельность [А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012].

В организме человека и животных Cu,Zn-SOD и Mn-SOD являются преимущественно внутриклеточными ферментами и в межклеточных жидкостях быстро разрушаются. В 1982 г. была обнаружена экстрацеллюлярная форма (Э-SOD), представляющая собой гликопротеин, состоящий из 4 субъединиц, каждая из которых содержит по одному атому меди и цинка [А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012].

Э-SOD синтезируется преимущественно гладкомышечными клетками, альвеолоцитами II типа, легочными макрофагами и некоторыми линиями фибробластов. Экстрацеллюлярная SOD является главным изоэнзимом внеклеточных жидкостей (плазмы, лимфы, синовиальной жидкости), и в небольших количествах обнаруживается практически во всех тканях [А.Ш. Бышевский с соавт., 2003]. Так как в активный центр SOD входят ионы меди, цинка или марганца, то при дефиците их в организме активность SOD снижается [А.Ш. Бышевский с соавт., 2003]. Подобные факты были установлены при экспериментальном недостаточном поступлении их в организм с пищей. У животных, находившихся на диете, дефицитной по меди, активность SOD в печени снижалась в 9 раз, в сердце – в 3,8 раза; в головном мозге при этом изменений активности SOD не обнаружено [Д.М. Габитова с соавт., 2006]. SOD осуществляет инактивацию супероксидных анионов кислорода. Фермент обнаружен во всех аэробных организмах [Т. Finkel, N.J. Holbrook, 2000; А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012]. Все виды SOD содержат в активном центре либо медь и цинк, либо марганец. В цитозоле клеток человека находится Cu,Zn-SOD, в митохондриях – Mn-SOD. Под действием SOD осуществляется реакция

диспропорционирования свободных радикалов кислорода в присутствии протонов. Особенно активна СОД в фагоцитирующих клетках, в которых АФК генерируются в качестве бактерицидных факторов [А.П. Шепелев с соавт., 2001]. СОД в данном случае исполняет роль регулятора, обеспечивающего выполнение биологических функций свободных радикалов кислорода на уровне, не превышающем порог безопасности для клетки. Издержками этого ферментативного процесса является образование перекиси водорода, способной образовывать высокореакционные гидроксильные радикалы. Особая опасность перекиси водорода заключается в том, что её молекула небольших размеров, заряда не имеет и может диффундировать на большие расстояния, что представляет серьезную опасность для жизненно важных структурных элементов клетки. Однако в клетках перекись водорода быстро обезвреживается с помощью другого фермента – каталазы [А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012].

Каталаза – один из самых мощных ферментов, известных в настоящее время. Одна молекула каталазы способна обеспечить разложение 44000 молекул H_2O_2 за 1 сек. Каталаза обнаружена во всех клетках животного организма. Особенно в больших количествах каталаза содержится в печени и эритроцитах [Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, 1972]. Исследованиями последних лет доказано, что перекись водорода (0,1 - 50,0 мкМ) активирует калиевые каналы плазматической мембраны, дозозависимо усиливает окислительный взрыв нейтрофилов и макрофагов в ответ на хемотактический пептид, опосредует хемотаксис гладкомышечных клеток к тромбоцитарному фактору роста, ускоряет выход органических анионов из макрофагов, влияет на циклооксигеназную активность эпителиальных клеток и тромбоцитов, усиливает секрецию простагландинов из эндотелиальных клеток, усиливает фагоцитоз макрофагами частиц опсонизированного латекса, участвует в образовании тиреоидных гормонов и агрегации тромбоцитов, стимулирует выброс гистамина из тучных клеток, адгезию лейкоцитов к эндотелию и эндоцитоз эндотелиальных клеток. [А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун, 2012].

Принципы перекисного окисления липидов тесно связаны с системой гемостаза и активно влияют на тромбогенез путем воздействия на кровяные клетки, в особенности на тромбоциты. Также это подтверждает тот факт, что при введении антиоксидантов (активации антиоксидантной системы) снижается уровень агрегации тромбоцитов [А.В. Пустынников с соавт., 2007]. Интенсивность внутрисосудистого свертывания крови полностью отражает систему гемостаза, а именно ее активацию или ее замедление. Было доказано, что при патологических явлениях, сопровождающихся активацией ПОЛ и падением АОС, происходит увеличение темпа непрерывного внутрисосудистого свертывания крови [А.Ш. Бышевский с соавт., 2003]. ПОЛ оказывает свое действие на гемостаз опосредованно воздействуя на тромбоциты через эритроциты, моноциты и нейтрофилы. Все вышесказанное можно объединить в схему:

Активация ПОЛ → Снижение АОС → Рост прокоагуляционной активности тромбоцитов → Увеличение непрерывного внутрисосудистого свертывания крови. [Е.А. Матейкович, 2004].

За счет активности процессов гемостаза, а также нарушения кровообращения, создается угроза тромбообразования [А.Ш. Бышевский с соавт., 2004]. Перекисное окисление липидов усиливается в том участке сосуда, где произошло нарушение его целостности, что обуславливается местным дефицитом кислорода и ведет к более быстрой регенерации тромбина [А.Ш. Бышевский с соавт., 2003].

У больных с высоким риском тромбоза на фоне снижения АОС повышается уровень первичных и вторичных продуктов липопероксидации. Дополнительно, у этих пациентов активирован гемостаз, а именно уровень продуктов деградации фибрина, повышена общая активность тромбоцитов, уровень маркеров внутрисосудистого свертывания, а также уровень тромбоцитарных факторов P3 и P4 [Д.М. Зубаиров, 2000].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Набор клинико-экспертного экспериментального материала, а также исследования были проведены на базах: 1) ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ; 2) ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ (РостГМУ); 3) Центр коллективного пользования «Молекулярно-генетические технологии» ФГАОУВО «Южный федеральный университет» Минобрнауки РФ; 4) Филиал № 2 федерального государственного казенного учреждения «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» МО РФ; 5) ГБУЗ Бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ РО; 6) ФГУ ГБОУ медико-социальной экспертизы по РО, Филиал № 14 г. Ростов-на-Дону; 7) ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» МЗ РФ («РНИИАП»); 8) ГБУ РО «Областной клинико-диагностический центр» (ГБУ РО ОКДЦ); 9) ФГКУ «1602 военный клинический госпиталь» МО РФ; 10) ГБУ «Областная клиническая больница № 2», г. Ростов-на-Дону.

Объектами исследования послужили:

1) Акты судебно-медицинского исследования трупа и заключения экспертов танатологических отделений (№ 1 и № 2) Ростовского областного Бюро судебно-медицинской экспертизы за 2004 – 2010 годы.

2) Акты судебно-медицинского освидетельствования и заключения экспертов отдела экспертизы потерпевших, обвиняемых, подозреваемых и других лиц (отдел экспертизы живых лиц (ОЭЖЛ)) Ростовского областного Бюро судебно-медицинской экспертизы за 2004 – 2010 годы.

3) Лица, подлежащие очередному освидетельствованию в Бюро медико-социальной экспертизы, и акты МСЭ освидетельствования граждан за 2008 – 2009 годы.

4) Пациенты и медицинские карты стационарного больного отделения сосудистой хирургии клиники РостГМУ, 1602-го окружного военного госпиталя, травматологического отделения областной клинической больницы № 2 г. Ростова-на-Дону за 2007 – 2010 годы.

Отбор заключений экспертов, актов судебно-медицинского исследования (освидетельствования), медицинских карт стационарного больного, актов медико-социальной экспертизы осуществлялся методом сплошной выборки.

5) Экспериментальный материал был представлен лабораторными животными (белые беспородные крысы-самцы).

Количество отобранных объектов для исследования (анализа) приведено в таблице 1.

Таблица 1

Количественная характеристика отобранных объектов для исследования
(анализа)

	Объект исследования	Отбранное количество объектов для исследования (анализа)
1	Акты судебно-медицинского исследования трупов и заключения экспертов	143
2	Акты судебно-медицинского освидетельствования живых лиц и заключения экспертов	14
3	Лица, подлежащие очередному освидетельствованию, во МСЭК и акты МСЭК	64
4	Медицинские карты стационарного больного	184
5	Контрольная группа лиц	100
6	Лабораторные (экспериментальные) животные	72

Для выполнения поставленных задач исследование было разделено на 4 этапа.

На первом этапе работы был проведен анализ экспертных документов танатологического отдела (ТанО) и отдела экспертизы потерпевших, обвиняемых, подозреваемых и других граждан (отдела экспертизы живых лиц (ОЭЖЛ)) Ростовского областного Бюро судебно-медицинской экспертизы.

При анализе 31594 экспертных документов танатологического отдела были сформированы группы.

Первую (I) группу (n=67) составили случаи скоропостижной смерти, обусловленные ТЭЛА и отнесенные экспертами к ненасильственной категории смерти.

Вторую (II) группу (n=33) составили случаи смерти пациентов, обусловленные ТЭЛА и характеризующиеся как насильственная категория смерти. При этом пациенты находились в лечебном учреждении по поводу полученной травмы и велись лечащими врачами консервативным путем либо с применением малоинвазивных оперативных вмешательств.

Третью (III) группу (n=38) составили случаи смерти пациентов, обусловленные ТЭЛА и характеризующиеся как насильственная категория смерти. При этом пациенты находились в лечебном учреждении по поводу полученной травмы, которым в различные сроки после получения повреждений был выполнен значительный объем оперативных вмешательств.

Дополнительно, в процессе проведения анализа экспертных документов была выделена **четвертая (IV) группа** (n=5), в которую вошли случаи с неустановленным источником смертельной тромбоэмболии, либо неясные и не уточненные случаи, которые были расценены как дефект экспертной продукции.

Учитывался объем проводимых судебно-медицинским экспертом исследований, использования гистологического и биохимических методов. Проводилась сравнительная оценка данной судебно-медицинским экспертом причинной связи между травмой, оперативным вмешательством и конкретным тромботическим осложнением. Отбор в исследуемые группы осуществляли на основе подтвержденного клинически и/или морфологически наличия тромбоза и его осложнений.

Анализ 203555 экспертных документов отдела экспертизы живых лиц включал в себя подборку актов судебно-медицинского освидетельствования и заключений экспертов в сочетании травмы и наличия тромботических осложнений, появившихся после травмы, либо при наличии сопутствующей

сосудистой патологии (*группа V* (n=14)). Анализу были подвергнуты все экспертные случаи артериального и венозного тромбоза, верифицированные инструментальными методами исследования (по данным предоставленной медицинской документации), либо подтвержденные морфологически при исследовании биопсийного материала.

В сформированных группах были определены половозрастные характеристики и их особенности в сравнении между группами, время причинения травмы и время проявления первых клинических признаков развития фатального осложнения в виде ТЭЛА, промежутки времени между травмой и оперативным вмешательством, оперативным вмешательством и возникшим тромботическим осложнением.

На втором этапе исследования изучали клиничко-лабораторные показатели состояния гемостаза у потерпевших и пациентов, находившихся на лечении в клинике РостГМУ, 1602-ом военном госпитале и травматологическом отделении 2-й клинической больницы г. Ростова-на-Дону, на основе данных, изложенных в отобранных медицинских документах. Изучали состояние плазменного и сосудисто-тромбоцитарного звеньев гемостаза: 1) активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ, в сек); 2) протромбинового времени (ПВ, сек); 3) тромбинового времени (ТВ, сек); 4) растворимого фибрин-мономерного комплекса (РФМК, мг%); 5) фибриногена (г/л); 6) международного нормализованного отношения (МНО, усл ед.); 7) протромбинового индекса (ПТИ, в %).

На данном этапе исследования все потерпевшие и пациенты были разделены на группы:

Группа «traum» (n=64) была представлена лицами, имевшими механические повреждения опорно-двигательного аппарата, но не имевшими тромботических осложнений до и после выполненного оперативного вмешательства по поводу переломов костей конечностей. При этом показатели гемостаза оценивались на момент поступления в лечебное учреждение.

Группу «thromb» (n=75) составили лица с верифицированным тромбозом глубоких вен нижних конечностей и не имевших никаких механических травм в анамнезе.

В группу «traum+thromb» (n=45) были включены потерпевшие, имевшие травму опорно-двигательного аппарата, подвергшиеся оперативному методу лечения в связи с имеющейся травмой, последовавшим после выполненного оперативного вмешательства тромбозом глубоких вен нижних конечностей, осложнившегося развитием ТЭЛА, которая и стала причиной смерти.

Для пациентов групп сравнения «thromb» и «traum+thromb» показатели системы гемостаза оценивались по данным, содержащимся в медицинских документах – медицинской карте стационарного больного и исследовательской части заключения эксперта.

Распределение количества наблюдений по группам представлено в таблице 2.

Таблица 2

Распределение количества наблюдений по группам

Группа	Характеристика группы	Количество наблюдений
1.	traum	64
2.	thromb	75
3.	traum+thromb	45

На третьем этапе проводимого исследования был осуществлен забор генетического материала у 251 лица с целью проведения генетического типирования на предмет наличия мутаций и полиморфизмов в генах-кандидатах предрасположенности к повышенному тромбообразованию. Все случаи при проведении ДНК-анализа были разделены на группы.

Первая (IG) группа была представлена лицами в возрасте от 21 до 61 года с верифицированным клинико-морфологическим диагнозом тромбоза глубоких вен нижних конечностей и тромбоемболии легочной артерии, которые были диагностированы после причинения механической травмы и/или выполненного

оперативного вмешательства на сегментах нижней конечности по поводу имевшегося перелома. В эту группу вошло 12 наблюдений (10 мужчин, 2 женщины).

Вторую (IIГ) группу составили лица в возрасте от 18 до 80 лет с верифицированным клинико-морфологическим диагнозом ТГВНК без какой-либо механической травмы или выполненного оперативного вмешательства в анамнезе – 75 человек (45 мужчин, 30 женщин).

Третья (IIIГ) группа была представлена 64 лицами (20 мужчин, 44 женщины) в возрасте от 57 до 81 года с механическими повреждениями, в частности, с переломами сегментов нижней конечности и выполненном в последующем оперативном вмешательстве по поводу травмы ОДА без каких-либо клинических и морфологических проявлений ТГВНК.

Контрольную группу составили 100 практически здоровых лиц в возрасте 17 – 40 лет (14 мужчин, 86 женщин) (IVГ).

Рассматривая венозные тромбоэмболические осложнения (ВТЭО) как многофакторный патологический процесс, для каждой из выделенных групп был определен коэффициент относительного риска (КОР) возникновения ТГВНК и ТЭЛА, предложенный международной группой экспертов на XIX Конгрессе Международного общества по тромбозам и гемостазу (2003) [цит. по W. Geerts et al., 2004]. При подсчете КОР учитывали удельный вес в баллах каждого из известных факторов риска развития ВТЭО (пол, возраст, масса тела, наличие вредных привычек, степень сложности выполненного оперативного вмешательства, сведения о приеме оральных контрацептивов, уровень гематокрита и пр.).

Для проведения генетического типирования на известные гены-кандидаты предрасположенности к повышенному тромбообразованию (*FV Leiden*, *PRT (FII)*, *MTHFR*, *PAI-1*, *FGB*, *NOS3*) у пациентов с их согласия осуществлялся забор венозной крови и/или образцов слюны.

Генетическое типирование образцов ДНК, полученных от пациентов всех вышеперечисленных групп, включало выделение (экстракцию) ДНК из образцов

крови и слюны с помощью метода органической экстракции. В стерильную микроцентрифужную пробирку вносили 0,5 мл лизирующего раствора (10 mM трис-HCl, pH 7,5; 10 mM Na₂ЭДТА; 50 mM NaCl; 2 % SDS). Добавляли фрагмент носителя с пятном крови и/или слюны размером около 5 мм². Добавляли 20 мкл протеиназы К (10 мг/мл), осторожно перемешивали. Инкубировали при температуре +56°C в течение 3 часов. К полученному продукту лизиса и ферментной обработки добавляли равный объем смеси фенола/хлороформа/изоамилового спирта (25:24:1) и перемешивали на вортексе. Очистку фенолом повторяли трижды. Центрифугировали в течение 3 мин при 10000 об/мин до разделения двух фаз. Переносили верхнюю водную фазу в стерильную микроцентрифужную пробирку. К водной фазе добавляли 5M NaCl до конечной концентрации 0,2M и 2-2,5 объема холодного 96% этанола, перемешивали содержимое путем легкого встряхивания. Инкубировали при температуре +20°C в течение 1 часа. Центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин. К осадку добавляли 70% раствор этанола и перемешивали. Центрифугировали в течение 10 мин при 15000 об/мин. Осадок высушивали при температуре +50°C в течение 5 минут. К осадку добавляли 50 мкл TE буфера, перемешивали, затем инкубировали при +56°C в течение 30 мин. Центрифугировали в течение нескольких секунд при 10000 об/мин. Качество выделенной ДНК оценивали при помощи электрофореза в 0,8% агарозном геле. Количество выделенной ДНК (РНК) определяли с помощью спектрофотометра «Nanodrop ND-1000» (производства Nanodrop Technologies Inc.). Перед началом работы измерительную поверхность прибора NanoDrop ND-1000 промывали дистиллированной водой и насухо протирали во избежание влияния на результаты измерения пыли или веществ, которые могли остаться от прошлых измерений. Открывали программу Nanodrop и соответствующий модуль (ДНК или РНК). При запуске программы прибор требует автокалибровки, для этого верхний кабель поднимали, и помещали 2 мкл дистиллированной воды на сенсор. Верхний кабель опускался. Прибор производил самодиагностику. В панели программы выбиралась команда стандартизации (blank). Сенсор открывали путем

поднятия верхнего кабеля. Поверхность сенсора промывали дистиллированной водой, протирали, и на него помещали 2 мкл соответствующего бланка. Верхний кабель опускался. В панели программы выбирали команду бланк. Сенсор открывали путем поднятия верхнего кабеля. Поверхность сенсора промывали дистиллированной водой, протирали, и на него помещали 2 мкл соответствующего образца. Верхний кабель опускали. В панели программы выбирали команду измерения (официальный сайт фирмы Nanodrop).

Концентрацию ДНК в растворах оценивали по значениям оптической плотности при 260 нм. Для оценки степени очистки образцов ДНК от белковых примесей использовали отношение значений оптических плотностей при 260 и 280 нм. Раствор ДНК перед генотипированием хранили при температуре -20°C .

Генотипирование исследуемых образцов. Типирование полиморфных локусов *FV Leiden*, *PRT (FII)*, *MTHFR*, *PAI-1*, *FGB*, *NOS3* проводили методом энзиматической амплификации с последующей постановкой реакций рестрикции продуктов ПЦР с последующим анализом продуктов рестрикции в агарозном геле с помощью наборов «АмплиКит» (Ампликит, Россия, Санкт-Петербург). Энзиматическую амплификацию ДНК осуществляли методом ПЦР с помощью термоциклера GeneAmp PCR System 9700 «PE Applied Biosystems». Для оценки специфичности реакции амплификации использовали положительные и отрицательные (проба без ДНК) контроли. Визуализацию продуктов рестрикции выполняли с помощью гель-документирующей системы BioDoc Analyze («Biometra»).

Параллельно типирование полиморфных локусов проводили методом энзиматической амплификации «в реальном времени». Энзиматическую амплификацию «в реальном времени» осуществляли с помощью наборов реагентов серии «SNP-Скрин» (Синтол, Россия, Москва) с использованием компьютеризированного четырехканального устройства «АНК-32» (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/08892 от 21.09.2010 г.) для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекции специфической последовательности нуклеиновых кислот методом полимеразной

цепной реакции. Для оценки специфичности реакции амплификации использовали три положительных (+/+, +/- и -/-) и один отрицательный (проба без ДНК) контроли.

Реакционную смесь готовили следующим образом (таблица 3):

Таблица 3

Состав реакционной смеси

Наименование	Объем на реакцию, мкл
2,5X Реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения ПЦР-РВ	10
2,5X Разбавитель	10
Тaq-ДНК-полимераза, 5 Ед/мкл	0,5

В реакционные ПЦР-пробирки вносили по 20 мкл смеси компонентов. Затем в каждую ПЦР-пробирку вносили по 5 мкл нормализованного раствора ДНК исследуемого образца (5 нг/мл), отрицательных и контрольных образцов. Перемешивали содержимое пробирок с помощью смесителя (вортекса) и центрифугировали для сброса капелек жидкости с крышек пробирок. ПЦР проводили при соответствующих условиях (таблица 4).

Таблица 4

Условия, при которых проводили ПЦР

Прогрев блока -	1. 95 °С 120 сек
цикл	2. 65 °С 20 сек
	3. 69 °С 20 сек
	4. 55 °С 20 сек – <u>измерение флуоресценции</u>
	5. 95 °С 10 сек
	6. переход на шаг № 2 45 раз

Использовали цветовые каналы FAM и R6G.

В ходе реакции при накоплении ампликонов происходило разрушение связанного с кДНК-мишенью зонда за счет 5'-экзонуклеазной активности Таq-ДНК-полимеразы, что приводило к высвобождению красителей FAM (в случае

аллеля дикого типа) и R6G (в случае мутантного аллеля). Для сравнения графиков, полученных при проведении ПЦР «в реальном времени», использовали значения порогового цикла C_t . Обработку результатов с целью определения порогового цикла осуществляли с помощью программного обеспечения «ANK32 для Windows версия 1.1» института аналитического приборостроения РАН.

Характеристика исследованных генов и их аллельных вариантов представлены в таблице 5.

Таблица 5

Характеристика исследованных генов и их аллельных вариантов

Ген, локализация	Название белкового продукта гена	полиморфизм	
FII 11p11	протромбин	G20210A	rs1799963
FV 1q23	проакцелерин	G1691A	rs6025
MTHFR 1p36.3	метилентетрагидрофолатредуктаза	C677T	rs1801133
FGB 4q28	фибриноген	-455 G/A	rs1800790
PAI-1 7q21.3-q22	Ингибитор активации плазминогена	-675 5G/4G	rs1799768
NOS3 7q35-36	Эндотелиальная NO-синтаза (NO-синтаза 3-го типа)	G894T	Rs1799983

Список генов-кандидатов для изучения полиморфизма был составлен на основе имеющихся литературных данных об их роли в регуляции системы гемостаза. Определялась частота встречаемости генотипов. В результатах генетического типирования ожидали существенные отличия в сравниваемых группах по гену, ответственному за синтез белка фолатного цикла – метилентетрагидрофолатредуктазы. Точечная мутация в гене MTHFR C677T обуславливает повышенное содержание гомоцистеина в плазме крови человека, что считается одним из независимых факторов риска тромботических осложнений. Однако ретроспективно изучить динамику данного показателя по медицинским документам у пациентов в группах сравнения не представилось возможным. По этой причине был выполнен четвертый этап исследования с моделированием в экспериментальных группах животных повышенного содержания гомоцистеина за счет метиониновой диеты в условиях травмы опорно-двигательного аппарата.

Четвертый этап проводимого исследования был представлен экспериментальной частью работы, выполненной на беспородных крысах-самцах с первоначальной массой тела 205 – 360 г. Животные содержались в стандартных клетках в условиях 12-часового режима освещения и свободного доступа к корму и воде. Содержание животных соответствовало санитарным правилам, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) – «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Кормили животных натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами, утвержденными приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 708н от 23 августа 2010. Перед экспериментами животные проходили карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 дней.

Животные были рандомизированы в одну из восьми групп.

I группа (contr) – контрольная (интактные животные).

II группа (traum) – животные, которым не вводили внутривенно при помощи зонда метионин, однако был сформирован закрытый перелом костей голени спустя две недели от начала эксперимента. Перелом формировали при помощи специально сконструированного устройства, позволяющего дозированно воздействовать на конечность животного.

III группа (hhcy) – животные, которым ежедневно в течение шести недель вводили внутривенно при помощи зонда метионин в концентрации 2,46 г/кг [S. Dayal, S.R. Lentz, 2008].

IV группа (hhcy traum) – животные, которым в течение первых четырех недель внутривенно вводили метионин, затем после четырех недель от начала эксперимента формировали закрытый перелом костей голени. И еще в течение двух недель внутривенно вводили метионин.

V группа (hhcy traum 2 недели) – животные, которым в течение первых двух недель внутривенно вводили метионин, затем после двух недель от начала

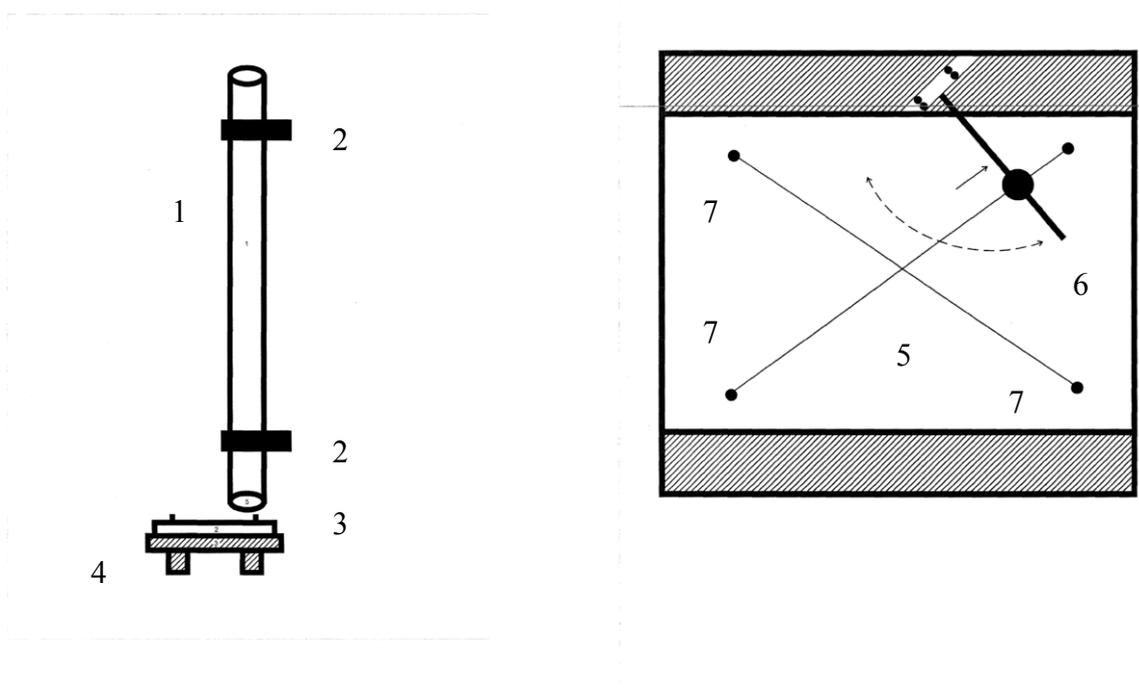
эксперимента формировали закрытый перелом костей голени. И еще в течение двух недель внутривенно вводили метионин.

VI группа (traum 1 день) – животные, которым не вводили внутривенно при помощи зонда метионин, однако был сформирован закрытый перелом костей голени. Выводили животных из эксперимента спустя 24 часа от момента сформированного перелома.

VII группа (hhcy 29 дней) – животные, которым в течение 29 дней вводили внутривенно метионин в концентрации 2,46 г/кг, т.е. в течение четырех недель плюс еще один день.

VIII группа (hhcy traum 29 дней) – животные, которым в течение четырех недель вводили внутривенно метионин, после чего формировали закрытый перелом костей голени и через 24 часа после сформированного перелома животных выводили из эксперимента.

С целью унификации воздействия травмирующего агента нами было разработано оригинальное механическое устройство для формирования переломов сегментов задней конечности экспериментального животного (рисунок 5). Устройство представлено в виде двух компонентов: первый - это труба (1) с внутренним сечением 100 мм и высотой 1500 мм, по которой происходит разгон травмирующего объекта с ускорением свободного падения для дальнейшей передачи необходимой кинетической энергии при формировании перелома длинной трубчатой кости крысы. Труба фиксирована хомутами с диаметром 120 мм (2). Под «разгонной трубой» находится площадка, выполненная из паркетной доски, с периметром сторон 450х450 мм (3), между площадкой и полом находится амортизирующий материал, который «гасит» импульс силы, возникающий при контакте травмирующего объекта с площадкой (4).



а) вид сбоку

б) вид сверху

Рис. 5. Принципиальная схема механического устройства для формирования переломов сегментов задней конечности экспериментального животного (объяснение в тексте)

На основную площадку помещается «предметный столик», представленный листом древесно-стружачей плиты и вкрученных по периметру петель с целью фиксации конечностей животного (5). Столик имеет размеры 300x450 мм. Для обеспечения однообразных переломов был разработан «шлагбаум» (6), который опускается на конечность животного в том месте, где необходимо произвести перелом. В конечном итоге перелом осуществляется путем фиксации животного, находящегося под эфирным наркозом, с помощью гибкого соединения с фиксирующими петлями (7), столик с фиксированным животным и откинутым «шлагбаумом» помещается на опорную площадку. Шлагбаум опускается на конечность животного. Далее, отпуская с верхнего края трубы травмирующий агент массой 500 г, который ударяет по широкой части шлагбаума (6), при этом энергия удара передается на конечность и происходит формирование закрытого перелома.

В ходе эксперимента осуществляли еженедельный контроль массы лабораторных животных в группах. По окончании срока эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом.

Для гистологического исследования изымали мягкие ткани из зоны сформированного перелома, а также интактной конечности, фиксировали в 10% нейтральном формалине в соотношении ткань/формалин как 1:10. Окраску препаратов проводили по стандартной методике гематоксилин-эозином. Микроскопию изготовленных препаратов осуществляли с использованием микроскопа МИКМЕД 6 с тринокулярной насадкой с использованием окуляр-микрометра МОВ-1-16. При микроскопии полученных срезов оценивали показатели: 1) диаметр поперечнополосатого скелетного миоцита, его минимальное значение (ДППМ мин) (мкм); 2) диаметр поперечнополосатого скелетного миоцита, его максимальное значение (ДППМ макс) (мкм); 3) диаметр ядра миоцита (ДЯМ) (мкм); 4) диаметр капилляра (ДКап) (мкм); 5) толщина стенки капилляра (ТСК) (мкм); 6) толщина эндотелиальной выстилки капилляра (ТЭК) (мкм); 7) диаметр вены малого калибра (ДВ) (мкм); 8) толщина стенки вены (ТСВ) (мкм); 9) толщина эндотелиальной выстилки вены (ТЭВ) (мкм); 10) диаметр артерии малого калибра (ДА) (мкм); 11) толщина стенки артерии (ТСА) (мкм); 12) толщина эндотелиальной выстилки артерии (ТЭА) (мкм); 13) визуальное наличие или отсутствие тромбов в исследуемом материале (+/-).

Морфометрическое исследование гистопрепаратов осуществляли как на травмированной конечности, так и на интактной во всех экспериментальных группах.

Подсчет лейкоцитарной формулы производили путем приготовления мазков периферической крови на предметных стеклах. На тщательно вымытое и обезжиренное предметное стекло наносили на расстоянии 1–2 мм от его края каплю периферической крови. Мазок делали шлифованным стеклом, поставив его под углом 45° к предметному стеклу впереди капли. Подведя стекло к этой капле, ждали, пока кровь расплывется вдоль его ребра, и затем быстрым легким движением проводили шлифованное стекло вперед, не отрывая его от

предметного раньше, чем иссякнет вся капля. Мазок распределяли на стекле до получения щеточной каемки. Приготовленные мазки высушивали на воздухе в течение 15-20 минут. Номер исследования отмечали карандашом на высушенных мазках справа у края стекла. Фиксацию мазков проводили по Грюнвальду, окрашивание по Романовскому-Гимзе. Подсчет производили в окрашенных мазках периферической крови. Подсчитывали не менее 200 клеток, а затем выводили процентное соотношение отдельных видов лейкоцитов. Подсчет производили всегда в одном порядке: половину клеток считали в верхней, половину – в нижней частях мазка, не заходя на самый край и середину, по зигзагу (3-4 поля зрения вдоль мазка, 3-4 поля под прямым углом к середине мазка, затем 3-4 поля в сторону параллельно краю, вновь под прямым углом вверх и т.д. в одну сторону).

Для подсчета тромбоцитов в 1 мкл крови, в пробирку наливали 12,5 мкл 6% ЭДТА. Добавляли в эту же пробирку 50 мкл периферической крови. Через 5 - 10 минут готовили мазок, который затем фиксировали и окрашивали, как указано выше. Подсчет тромбоцитов в мазке крови производили по отношению к 1000 эритроцитов. Зная абсолютное число эритроцитов в 1 мкл крови, вычисляли количество кровяных пластинок в 1 мкл крови.

Для проведения биохимических исследований после декапитации лабораторного животного производили забор крови в пробирки «VACUETTE» 4ml K3E K3EDTA 13×75 50 pcs. Premium Фирмы “Greiner Bio-One”. Перед определением ряда биохимических показателей цельную кровь отмывали. Центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин, и отбирали плазму, а к 2 мл эритроцитов добавляли 5 мл физиологического раствора (сильно перемешав), ставили центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин. Затем сверху из пробирки сливали плазму и физиологический раствор, добавляли 5 мл физиологического раствора и 5 минут центрифугировали (повторяя эту процедуру еще два раза). После окончательных промываний физиологическим раствором готовили из отмытого осадка эритроцитов 1% гемолизат: к 100 мкл осадка эритроцитов добавляли 9,90 дист. H₂O.

Дальнейшее определение биохимических показателей проводили в двух биосубстратах: плазме и 1% гемолизате эритроцитов.

Спектрофотометрическим методом на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США) определяли содержание первичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов [И.Д. Стальная, 1977], продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой – малонового диальдегида (МДА) [И.Д. Стальная, 1977], восстановленного глутатиона [G.L. Ellman, 1959], гемоглобина в гемолизате эритроцитов и внеэритроцитарного гемоглобина в плазме крови с помощью стандартного клинического набора реактивов производства «La Chema», общих липидов [В.Г. Колб, В.С. Камышников, 1982], общего белка [О.Н. Lowry et al., 1951], активность супероксиддисмутазы и супероксидустраняющей активности [R. Fried, 1975; З.П. Черемисина, Т.Б. Сулова, Л.Г. Коркина, 1994; Т.В. Сирота, 1999], активность каталазы [М.А. Королюк и др., 1988], суммарную пероксидазную активность (СПА) [А.А. Покровский, 1969], активность глутатионпероксидазы [В.М. Моин, 1986]. Содержание шиффовых оснований определяли спектрофлуориметрическим методом [W.R. Bidlack, A.L. Tappel, 1973] на приборе Shimadzu RF-5301PC (Япония).

Концентрацию гомоцистеина в плазме крови определяли с использованием энзиматического метода набором фирмы DyaSis (Германия) на автоматическом анализаторе Sapphire - 400 (Япония). Принцип метода основан на реакции гомоцистеина и L-серина с формированием цистатионина, катализируемой цистатионин-бета-синтетазой. Затем фермент цистатионин-бета-лиаза (CBL) катализирует преобразование цистатионина в гомоцистеин, пируват и аммиак. Измеренная скорость образования пирувата при добавлении лактатдегидрогеназы и NADH в реакционную смесь прямо пропорциональна концентрации гомоцистеина. Результаты выражали в мкмоль/л.

Определение уровня экспрессии генов NO-синтаз

Выделение РНК с помощью коммерческого препарата Trizol™ (Invitrogen) модифицированным методом Хомчинского

При декапитации экспериментального животного производили отбор образца крови в объеме 50 мкл дозатором и смешивали с раствором тризола. Проводили пипетирование в течение 5 секунд, а затем все образцы перемешивали на вортексе в течение 5 секунд.

Гомогенизированные образцы инкубировали 5 минут при +15-30 °С для полного разрушения нуклеопротеиновых комплексов. Добавляли 0,2 мл хлороформа на 1 мл тризола. Пробу встряхивали в течение 15 секунд до появления молочно-белого цвета. Инкубировали при +15-30 °С 2-3 минуты. Образцы центрифугировали не более чем при 12000 g 15 минут при +2-8 °С. По окончании центрифугирования смесь разделялась на нижнюю фазу, содержащую фенол-хлороформ, интерфазу, содержащую ДНК, и верхнюю водную бесцветную фазу, в которой содержалась РНК. Объем водной фазы составлял примерно 40% объема тризола, использованного для гомогенизации.

Водную фазу отбирали и переносили в стерильную микропробирку типа Эппендорф. РНК осаждали путем ее смешивания с охлажденным изопропиловым спиртом. Использовали 0,5 мл изопропилового спирта на 1 мл тризола. Образцы инкубировали при +15-30 °С в течение 10 минут и центрифугировали не более чем при 12000 g в течение 10 минут при +2-8 °С.

Супернатант удаляли путем декантации. Осадок РНК отмывали 75% охлажденным этанолом, добавляя не менее 1 мл этанола на 1 мл тризола, использованного для гомогенизации. Образцы вортексировали и центрифугировали при 7500 g в течение 5 минут при +2-8 °С.

Супернатант удаляли путем декантации. Образцы сушили на термостате «Гном» при +50 °С. РНК растворяли в свободной от РНКаз воде и инкубировали при +56 °С в течение 10 минут.

РНК оставляли на хранение в морозильной камере при -80 °С.

Электрофоретическое разделение образцов РНК в геле агарозы

ТВЕ/формаид электрофорез проводили в 1,2% геле агарозы, содержащем 1xТВЕ буфер (0,04 М Трис-ацетат, 1мМ ЭДТА), который также используется в качестве рабочего буфера. Непосредственно перед электрофорезом образцы РНК смешивали с деионизованным формаидом в количестве не менее 60% от общего объема с 1/10 10x краски (50мМ Трис-НСl, рН 7,6, 0,25% бромфенол синий, 60% глицерол) и 1 мкл этидиум бромид. Далее образцы денатурировали путем нагревания до +65°C и последующей инкубацией в течение 5 минут. Образцы немедленно переносили в лед на 5 минут. Затем образцы помещали в лунки геля. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля равной 5 В/см. Когда бромфеноловый синий проходил 2/3 геля, источник тока отключали. Гель помещали в ультрафиолетовую камеру ChemiDoc фирмы Bio-Rad и визуализировали свечение интеркалирующего красителя при воздействии длинноволновым ультрафиолетом [Т. Masek et al., 2005]. Спектрофотометрический анализ полученных образцов РНК был указан выше по тексту.

Обратная транскрипция

Для проведения обратной транскрипции использовали набор MultiScribe™ Reverse Transcriptase фирмы Applied Biosystems с рекомбинантной ревертазой мышиноного вируса лейкемии (recombinant Moloney murine leukemia virus (mmLV) reverse transcriptase).

В набор входит: 10X RT-buffer, 25X dNTP Mix (100mM), 10X RT Random primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, RNase inhibitor (таблица 6).

Таблица 6

Схема приготовления раствора для обратной транскрипции в расчете на одну пробу

Вещество	Объем (мкл)
10X RT-buffer	2
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
10X RT Random primers	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0

Продолжение табл. 6

Вещество	Объем (мкл)
RNAse inhibitor	1,0
diH ₂ O	3,2
Раствор РНК	10

Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин для удаления капель со стенок и крышек микропробирок типа Эппендорфа.

Далее образцы помещали в термоциклер Applied Biosystems и инкубировались при следующем режиме согласно инструкции фирмы Applied Biosystems (таблица 7):

Таблица 7

Режим инкубации образцов в термоциклере Applied Biosystems

Этап	Температурный режим (°С)	Продолжительность этапа
1	25	10 мин
2	37	120 мин
3	85	5 сек
4	4	∞

При +37°С происходила обратная транскрипция, при +85°С - инактивация обратной транскриптазы и разрушение РНК.

ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали прибор iQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad) и набор реагентов, для определения количества фрагментов кДНК в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green 1 (таблица 8).

Таблица 8

Схема приготовления раствора для ПЦР в реальном времени в расчете на одну пробу

Вещество	Объем (мкл)
дНТФ, 2,5 мМ	2,5
10X ПЦР буфер Б	2,5
MgCl ₂ 25мМ	2,5

Продолжение табл. 8

Вещество	Объем (мкл)
Смесь праймеров, 10 пкмоль/мкл	0,5
Taq ДНК-полимераза, 5Е/мкл	0,5
Комплементарная ДНК (кДНК)	5
Деионизированная вода	11,5

Программировался режим со следующими этапами (таблица 9):

Таблица 9

Температурный режим (в °С), последовательность и продолжительность этапов (в сек) ПЦР в реальном времени

Этап	Температурный режим (°С)	Продолжительность этапа (сек)
1	95	300
2	62	50
3	95	15

Этапы 2 и 3 повторялись 40 раз, после чего данная операция завершалась.

Принцип метода состоит в том, что интеркалирующий краситель SYBR Green 1, связываясь с ДНК, увеличивает свое фоновое свечение в 1000 раз, в связи с чем возможна детекция продуктов, полученных в реакции энзиматической амплификации. В качестве референсного гена использовали «ген домашнего хозяйства» - β -actin. По отношению уровней экспрессии β -actin судили об активности генов NO-синтазы.

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием прикладных субпрограмм программного продукта Microsoft Excell 2000 в разделе описательной статистики, определения стандартных отклонений и сравнения выборок. В каждой из групп сравнения высчитывали среднее арифметическое, ошибку среднего. О достоверности отличий учитываемых показателей в группах судили по величине t-критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Анализ фатальных тромботических осложнений по данным танатологического отдела Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области за 2004–2010 годы

Согласно приведенным в главе по обзору литературы данным в отношении актуальных проблем тромботических осложнений в практике судебно-медицинского эксперта целесообразно рассмотреть некоторые аспекты эпидемиологии тромботических осложнений в танатологическом отделе.

За анализируемый промежуток времени с 2004 по 2010 годы в Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области было исследовано 31594 трупа с насильственной и ненасильственной категориями смерти. Методом сплошной выборки за этот период времени в танатологическом отделе областного Бюро судебно-медицинской экспертизы было зафиксировано 143 случая смертельных тромботических осложнений, которые через ТЭЛА, обусловившей развитие острой дыхательной и сосудистой недостаточности, привели к наступлению смерти потерпевшего. Объем экспертных случаев с тромботическими осложнениями от общего числа исследованных трупов за семилетний период составил 0,45%.

Отобранных 143 случая были распределены на четыре группы сравнения:

I группу составили лица с тромботическими осложнениями без какой-либо механической травмы, предшествовавшей наступлению смерти. Основной судебно-медицинский диагноз в этой группе был представлен тромбофлебитом глубоких вен нижней конечности в сочетании либо без варикозного расширения вен нижней конечности.

II группа была представлена лицами с механической травмой и последовавшим тромбозом. В отношении лиц данной группы применялись

консервативные или малоинвазивные методы лечения в виде скелетного вытяжения, иммобилизации места перелома гипсовой повязкой.

III группа также была представлена лицами с механической травмой и последовавшим тромбозом. Однако в отношении данных лиц с механической травмой применялись оперативные методы лечения в виде накостного металлоостеосинтеза и пр.

Для II и III групп ТГВНК и последовавшая ТЭЛА в судебно-медицинском диагнозе были расценены экспертами как осложнение основного травматического процесса.

Количество случаев за семь лет соответствовало в I группе 67, во II группе - 33, в III группе - 38, что по отношению к общему числу проведенных исследований составило 0,21%, 0,1%, 0,12% соответственно. Распределение случаев по годам в каждой группе с учетом пола представлено в таблице 10.

В IV группу были отобраны случаи, расцененные как дефект экспертной продукции, где исследование тела умершего было выполнено в нарушении существующих нормативных положений. Помимо этого, в данных отобранных случаях источник ТЭЛА судебно-медицинскими экспертами выявлен не был. Учитывая незначительное количество случаев в IV группе (всего 5 наблюдений – 0,02% от общего числа всей экспертной продукции), следует считать полученные данные недостоверными, в связи с чем дальнейшему анализу не подвергались.

По половому признаку мужчины и женщины распределились в практически равных количествах (по 50%) и в абсолютных цифрах составили по 71 и 72 наблюдений соответственно. Соотношение в каждой группе по анализируемому признаку составило: в I группе - 38,81% мужчин и 61,19% женщин, во II группе - 57,58% и 42,42%, в III группе - 65,79% и 34,21% соответственно. Полученные данные свидетельствуют о большем количестве летальных исходов с женщинами при ненасильственном характере смерти. В то время как при наличии повреждений, наоборот, больше подобных наблюдений относилось к мужчинам.

Распределение количества анализируемых случаев по годам (n)

Год	пол	Группы сравнения				Всего по каждому году
		I	II	III	VI	
2004	м	0	2	2	1	5
	ж	1	2	0	0	3
	всего	1	4	2	1	8
2005	м	3	3	1	0	7
	ж	7	1	2	1	11
	всего	10	4	3	1	18
2006	м	9	2	8	1	20
	ж	7	2	4	1	14
	всего	16	4	12	2	34
2007	м	3	4	2	0	9
	ж	8	3	1	1	13
	всего	11	7	3	1	22
2008	м	4	3	4	0	11
	ж	6	2	2	0	10
	всего	10	5	6	0	21
2009	м	3	2	3	0	8
	ж	5	2	2	0	9
	всего	8	4	5	0	17
2010	м	4	3	5	0	12
	ж	7	2	2	0	11
	всего	11	5	7	0	23
Всего	м	26	19	25	2	72
	ж	41	14	13	3	71
ИТОГО		67	33	38	5	143

Статистика показывает значительное преобладание экспертных случаев с мужчинами над женщинами в III группе (почти в два раза). Для наглядности гендерные (половые) соотношения в каждой из групп приведено на рисунке 6.

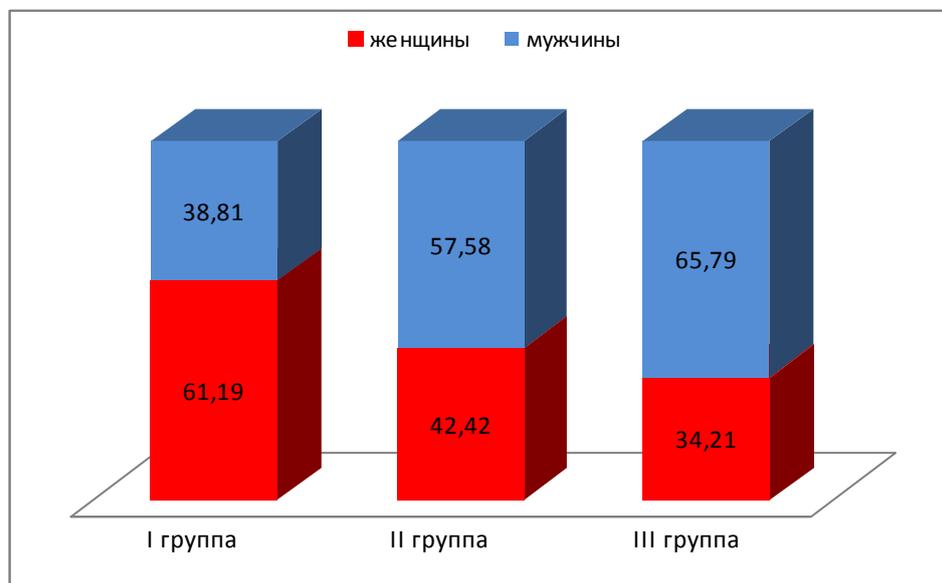


Рис. 6. Распределение по полу в группах сравнения за анализируемый период по данным танатологического отдела (в %)

Относительное количество экспертных случаев с венозными тромбозными осложнениями за весь анализируемый период в I группе по отношению ко всей экспертной продукции в танатологическом отделе составили 0,21%, во II группе - 0,1%, в III группе – 0,12%, а в объединенной группе по признаку наличия механических повреждений и тромботических осложнений (объединенная II и III группы) – 0,22%.

В анализируемый период отмечается некоторое увеличение количества случаев в зависимости от пола в промежутке с 2004 по 2006-2007 годы с последующим уменьшением и некоторой стабилизацией на протяжении 2008 – 2010 годов, что, в общем, позволяет говорить о некоторой волнообразной тенденции фатальных тромботических осложнений. Эти результаты лишь частично согласуются с данными литературы об увеличении количества пациентов с сердечно-сосудистой патологией [С.Е. Глова с соавт., 2006] и

увеличением количества оперативных вмешательств [С.С. Копёнкин, 2005]. Преобразованные числовые значения указаны на рисунке 7.

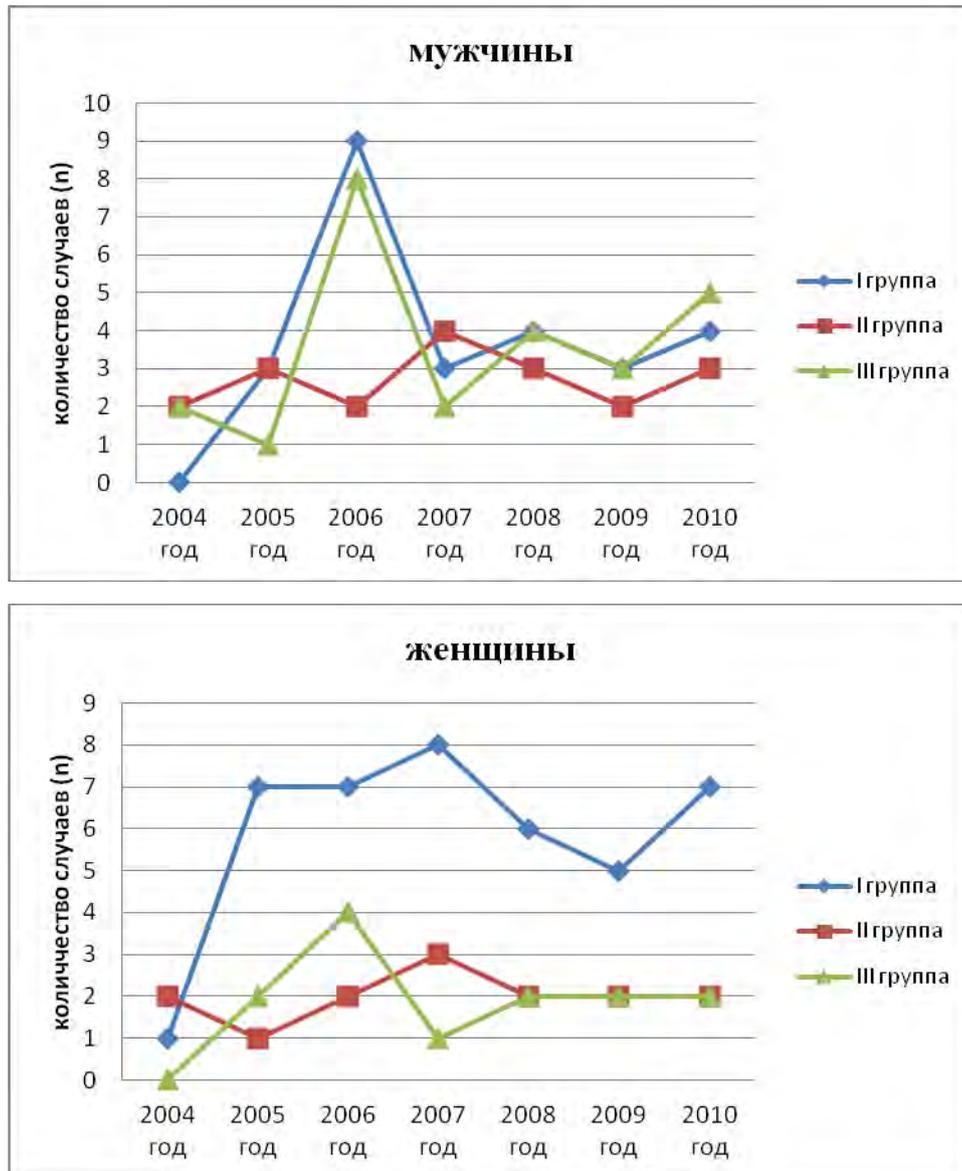


Рис. 7. Динамика случаев венозного тромбоза в зависимости от пола по анализируемым годам в танатологическом отделе (n)

Динамика случаев ТГВНК и ТЭЛА в сравниваемых группах примерно одинаковая. Это позволяет предположить, что полученные потерпевшими телесные повреждения во II и III группах, по всей видимости, не могут в полной мере считаться ведущим фактором формирования тромба и последующих фатальных осложнений, т.к. и оперативное вмешательство может стать причиной формирования тромба.

Возрастная характеристика в каждой из анализируемых групп дана в таблице 11.

Таблица 11

Возрастная характеристика в каждой из анализируемых групп, $M \pm m$

группа/ пол	М	Ж
I группа	56,53±4,15	64,78±3,53
II группа	51*±2,88	67,88*±4,32
III группа	45,38*±4,09	73,71*±2,51
* (p<0,05)		

Проведенный статистический анализ с использованием критерия Стьюдента показал наличие достоверных различий в возрасте между мужчинами и женщинами во II и III группах (p<0,05) и отсутствие таковых в I группе. Во II и в III группах возраст женщин значительно превышал возраст мужчин. Стоит отметить важный факт, что мужчины подвергались оперативному лечению травмы в более молодом возрасте, в то время как у женщин все было наоборот. По всей видимости, объяснение лежит в современном подходе врачей-клиницистов к плану ведения больного [А.В. Бондаренко, 2004; В.М. Шаповалов и соавт., 2011; А.В. Королев и соавт., 2014].

В подавляющем большинстве случаев тромботические осложнения возникали при повреждениях, наносимых тупыми предметами, в том числе при транспортной травме и/или падениях с высоты. В настоящем исследовании не проводили подробный анализ видов транспортной травмы. Структура механических повреждений в анализируемых II - III группах представлена на рисунке 8.

Анализ потерпевших в объединенной группе (II-III) показал, что лица с O(I) группой крови встретились в 22,54% случаев от общего количества, A(II) – 46,48%, B(III) – 8,45%, AB(IV) – 22,54%.

Также был проанализирован временной промежуток между сроками причинения травмы, проведенным оперативным лечением и наступившей смертью для III группы и временем причинения травмы и наступившей смертью

для II группы с учетом пола потерпевших, результаты которого приведены в таблице 12.

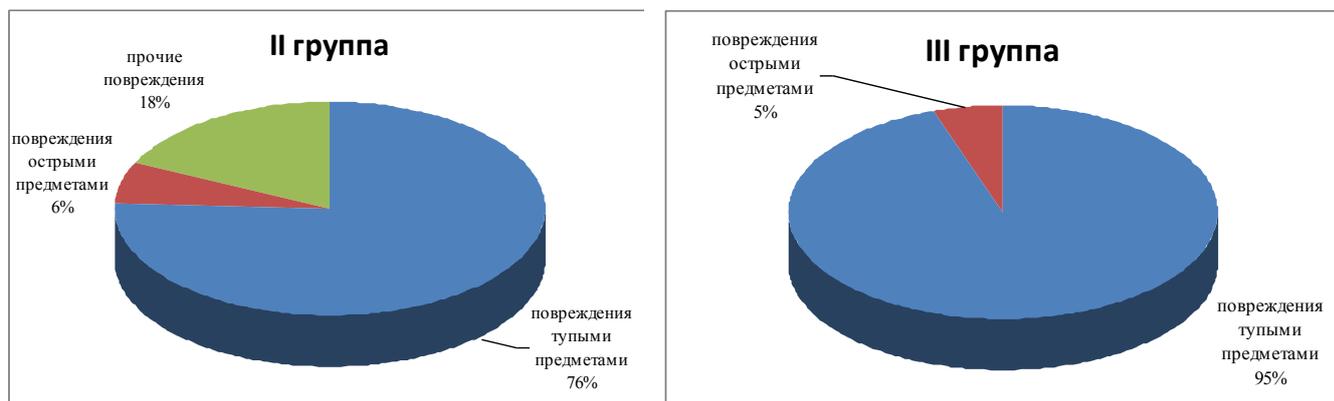


Рис. 8. Структура механических повреждений в анализируемых группах (в %)

Таблица 12

Временные промежутки между травмой и наступившей смертью в анализируемых группах, $M \pm m$

группы	промежуток между травмой и наступившей смертью (в сутк.)		сроки оперативного лечения после травмы (в сутк.)		сроки наступления смерти после проведенного оперативного вмешательства (в сутк.)	
	м	ж	м	ж	м	ж
II	13,53±2,12	9,71±1,52	-	-	-	-
III	26,56*±4,96	12,62*±1,23	15,09*±2,73	7,0*±0,88	14,43±3,05	6,08±0,96
* (p<0,05)						

Результаты анализа показали, что по половому признаку временные различия во II группе между травмой и наступившей смертью потерпевших носили статистически недостоверный характер, в то время как, в III группе эти же различия были статистически значимыми ($p < 0,05$). Между тем были выявлены достоверные различия в сроках между проведенным оперативным вмешательством и возникшим смертельным осложнением. Однако полученные нами результаты не в полной мере согласуются с литературными данными о формировании основной части тромбозов в первые трое суток после операции и/или травмы [В.А. Батрашов с соавт., 2001], но временные промежутки между травмой и сроками проведенного оперативного вмешательства, проведенным

оперативным вмешательством и наступившей смертью практически одинаковые (рисунок 9).

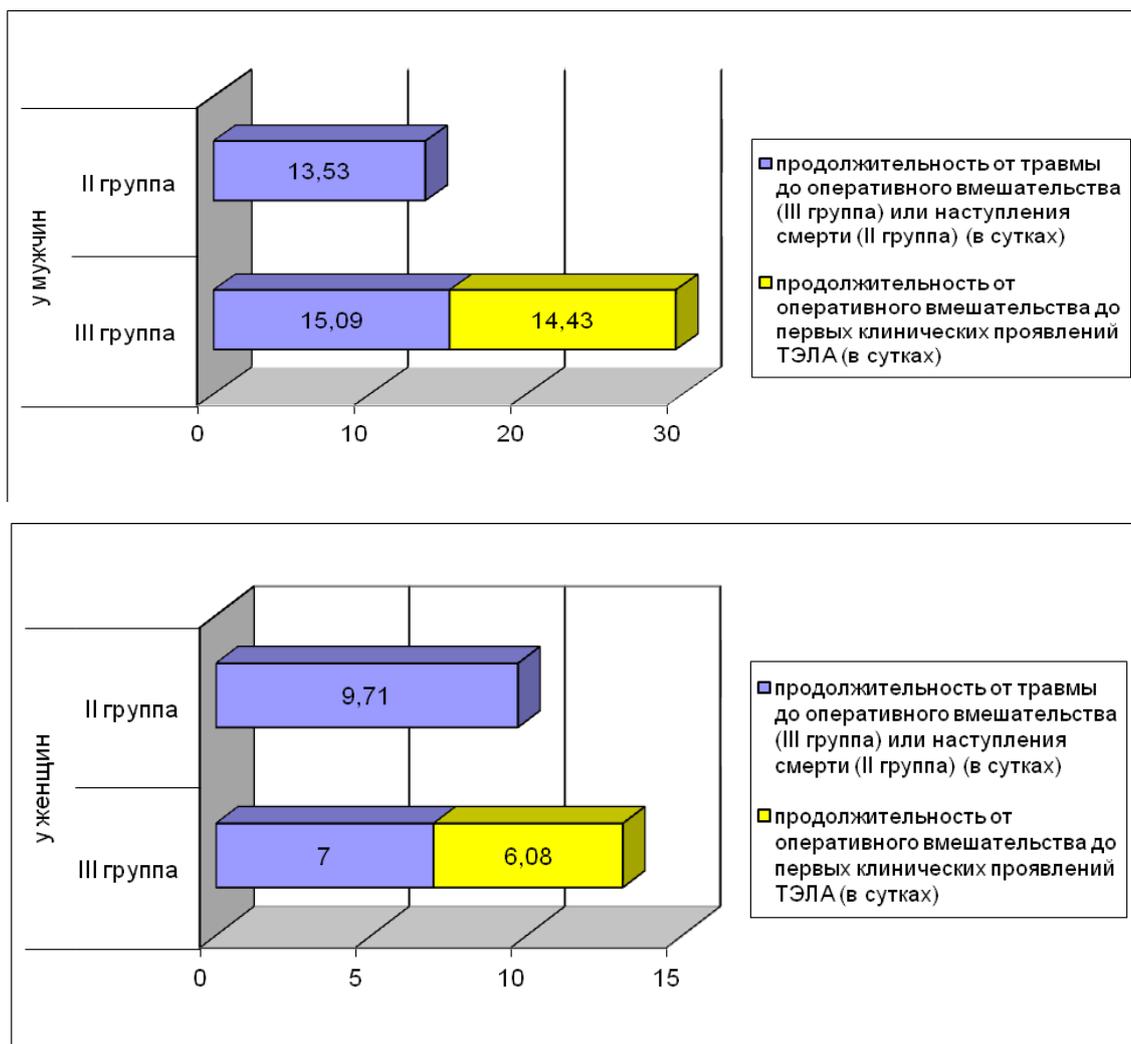


Рис. 9. Соотношение временных промежутков (в сутках) между травмой и смертью вследствие наступившего фатального осложнения и между травмой, оперативным вмешательством и смертью во II и III группах

Критерии, по которым в травматологической практике относят пациентов к высокой степени риска образования тромбозов, формируют по двум группам факторов: обусловленные операцией и обусловленные состоянием самого больного.

К первым факторам относят ортопедические операции на крупных суставах и костях и планируемую продолжительность оперативного вмешательства более двух часов. Ко второй группе факторов относят иммобилизацию больного более

4-х дней до операции, возраст старше 45 лет, наличие сердечной или легочной недостаточности второй степени и более, сахарного диабета, прием эстрогенов, ожирение, висцеральные злокачественные новообразования, химиотерапия, тромбофилии, варикозное расширение вен, тромбозы в анамнезе [С.В. Моисеев, С.С. Копёнкин, 2006].

По результатам наших исследований, все случаи в III группе наблюдений относились по факторам ожидаемых тромботических осложнений, обусловленных операцией и состоянием самого больного (потерпевшего) к высокой степени риска тромботических осложнений [Приказ Минздрава РФ от 09.07.2003 № 233 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Профилактика тромбоэмболии легочной артерии при хирургических и иных инвазивных вмешательствах»]]. При этом следует подчеркнуть, что в этом случае речь идет о жизни больного и лечебные средства применяются по витальным показаниям [С.Е. Глова с соавт., 2006].

Так как одним из условий, способствующих развитию тромбоза, является избыточная масса тела потерпевшего, было проведено сравнение толщины подкожно-жировой клетчатки (ПЖК) на передней стенке груди и живота по данным секционного исследования в анализируемых группах (таблица 13).

Как видно из таблицы 13, каких-либо статистически достоверных различий в сравниваемых группах выявлено не было ($p > 0,05$). Однако выявлена тенденция превышения толщины ПЖК в группах II и III по сравнению с I группой. Таким образом, сопоставление этих значений не исключает истинность суждения, что подкожно-жировая клетчатка, т.е. ее толщина не является ведущим фактором, способствующим формированию тромбоза при наличии повреждений.

Какие-либо иные сведения об общеизвестных факторах риска в анализируемых документах выявить не представилось возможным.

Толщина ПЖК в анализируемых группах (в см), $M \pm m$

	I группа		II группа		III группа	
	М	Ж	М	Ж	М	Ж
толщина ПЖК на передней грудной стенке	1,09±0,22	1,71±0,25	1,33±0,35	2,08±0,15	1,44±0,22	1,86±0,54
толщина ПЖК на передней стенке живота	2,31±0,53	4,01±0,76	2,76±0,53	3,92±0,58	2,53±0,36	4,86±1,0
t-критерий ПЖК на передней грудной стенке			0,59	0,90	1,12	0,23
t-критерий ПЖК на передней стенке живота			0,58	0,07	0,32	0,65

При мониторинге полноты произведенного секционного исследования, выполненных судебно-биохимических методов и предоставленных судебно-медицинскому эксперту информации в медицинской документации получены данные, которые отражены в таблице 14.

Приведенные в таблице 14 показатели свидетельствуют, что в исследовательской части заключения эксперта или акта судебно-медицинского исследования трупа в единичных случаях цитировались результаты клинко-лабораторных анализов, отражающие состояние системы гемостаза, и/или исследовалась уже трупная кровь на фибриноген А и фибриноген Б, несмотря на то, что определение последних в настоящее время реально доступно в условиях БСМЭ.

Тем не менее, эксперты практически в 90% случаев во II и III группах наблюдений констатировали наличие прямой причинно-следственной связи между травмой и возникшим тромботическим осложнением. Как контраргумент, стоит привести факт, что практически во всех анализируемых случаях был ограничен объем проводимого экспертного исследования. А именно – в 23,94% от общего числа анализируемых экспертных документов приводятся сведения об общем анализе крови, в 16,90 % имеются сведения о количестве тромбоцитов, в 4,23% приводятся сведения о состоянии системы гемостаза. Это лишь отчасти

Количество случаев использования экспертами показателей клинико-лабораторных и биохимических исследований при экспертизе трупа

Номер группы	Анализируемый год	Клинико-лабораторные анализы					Биохимические исследования при экспертизе трупа	
		толерантность к гепарину	время рекальцификации	тромбо-тест	фибриноген	ПТИ	фибриноген А	Фибриноген Б
I	2004	0	0	0	0	0	0	0
	2005	1	1	1	1	1	1	1
	2006	0	0	0	0	0	0	0
	2007	0	0	0	0	0	0	0
	2008	1	1	1	1	1	1	1
	2009	2	2	2	2	2	2	2
	2010	0	0	0	0	0	0	0
II	2004	0	0	0	0	0	0	0
	2005	0	0	0	0	0	0	0
	2006	2	2	2	2	2	2	2
	2007	1	1	1	1	1	1	1
	2008	0	0	0	0	0	0	0
	2009	0	0	0	0	0	0	0
	2010	2	2	2	1	1	0	0
III	2004	0	0	0	0	0	0	0
	2005	1	1	1	0	0	0	0
	2006	0	0	0	1	0	1	1
	2007	1	1	1	1	1	1	1
	2008	2	2	2	2	2	2	2
	2009	1	2	0	0	0	2	1
	2010	2	0	0	1	3	2	1

можно объяснить отсутствием целенаправленного скринингового исследования факторов гемостаза у больных в клинике. Лишь в 5,63% указана длительность оперативного вмешательства, в 16,90% - вид анестезии. Несомненно,

сведений для оценки клинических данных явно недостаточно для суждения о состоянии гемостаза и его роли в тромбообразовании. Что же касается дополнительных лабораторных исследований, примененных судебно-медицинскими экспертами, стоит отметить, что в 100% случаев проводилось гистологическое исследование с использованием традиционной окраски гематоксилин-эозином. Ни в одном из этих наблюдений не использовались специальные окраски на фибрин и элементы крови (по Зербино, Шуенинову, MSB), которые должны применяться согласно Приказу Минздравсоцразвития РФ от 12.05.2010 № 346Н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации», что явно бы дало большую информацию о давности (возрасте) фибрина. Ни в одном из случаев не были выявлены такие важные элементы тромба, как его головная часть, не говоря уже о гистологическом исследовании именно этой части, плотно прикрепленной к стенке поврежденного сосуда.

Исходя из изложенного, нельзя утверждать, что все тромботические осложнения можно безоговорочно поставить в прямую причинно-следственную связь с травмой и тем более при наличии оперативного вмешательства.

Полученные данные позволяют говорить о том, что флеботромбозы развиваются в первые недели после травмы и/или операции, когда пациент (потерпевший) наименее активен, а нарушения гемодинамики, связанные с вмешательством, наиболее значимы. В этой связи требует тщательного и обоснованного экспертного анализа последовательная цепочка событий: наличие факта травмы → продолжительность от момента травмы до госпитализации в специализированное лечебное учреждение → отсутствие угрожающих для жизни состояний на момент госпитализации и в последующие дни до принятия врачами решения об оперативном ведении пациента (лечения перелома) → оперативное вмешательство, накостный металлоостеосинтез → через несколько суток возникновение осложнения в виде ТЭЛА и констатация смерти, что может быть достигнуто внедрением в экспертную практику алгоритма решения задачи.

Ретроспективный анализ вероятности как тромботических, так и эмболических осложнений может помочь более точно оценить возможные риски оперативного лечения и установить причинную связь. Использование в настоящее время при проведении подобного рода экспертиз лишь морфологических методик и, как показал анализ, применение их даже в неполном объеме, является недостаточным для формирования однозначных экспертных суждений, требует поиска и внедрения в практику новых диагностических методов для подтверждения биохимических и генетических маркеров предрасположенности к тромбофилии.

3.2. Мониторинг тромботических осложнений по данным отдела экспертизы живых лиц Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области за 2004–2010 годы

Методом сплошной выборки был проведен анализ заключений экспертов и актов судебно-медицинского освидетельствования потерпевших в период времени с 2004 года по 2010 год, который включал определение общего числа случаев лиц с тромботическими осложнениями; их долю ко всему объему выполненных экспертиз; характер повреждений у потерпевших с учетом половозрастных признаков, а также объем использованных дополнительных лабораторных и инструментальных методов исследования; частоты привлечения специалистов клинического профиля; оценка обоснованности экспертных выводов о наличии или отсутствии причинной связи между повреждениями и возникшими тромботическими осложнениями.

По нашим данным, за анализируемый период в отделе экспертизы живых лиц было проведено 203555 освидетельствований и экспертиз граждан, количество которых по годам распределилось следующим образом: в 2004 году было выполнено 22369, в 2005 году – 30782, в 2006 году – 32124, в 2007 году - 31198, в 2008 году - 29559, в 2009 году - 29178, в 2010 году – 28345 освидетельствований и экспертиз. Это к общему количеству экспертной продукции за анализируемый период составило соответственно по годам

10,99±0,07%, 15,12±0,08%, 15,78±0,08%, 15,33±0,08%, 14,52±0,08%, 14,33±0,08%, 13,92±0,08%, что в графическом виде представлено на рисунке 10.

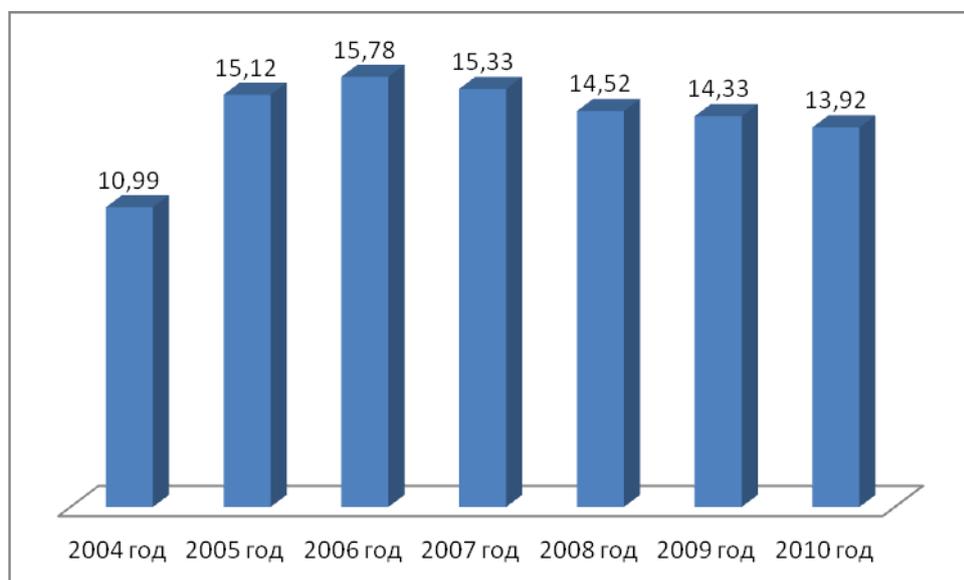


Рис. 10. Долевое распределение количества выполненной экспертной продукции по годам в отделе экспертизы живых лиц (в %)

Из представленного рисунка видно, что с 2004 года по 2006 год отмечен рост количества экспертной продукции в отделе с последующим медленным снижением к 2010 году. При этом прирост количества выполненной продукции по отношению к 2004 году носил статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Из всего объема представленной выборки было отобрано 14 экспертных случаев с имевшими место после причинения повреждений артериальными и/или венозными тромбозами. Количество случаев по годам распределилось следующим образом: в 2004 году – 2, в 2005 году – 3, в 2006 году – 1, в 2007 году – 3, в 2008 году – 3, в 2009 году – 1 и в 2010 году – 1. При этом в 13 случаях имел место венозный тромбоз (92,86%) и в 1 случае - артериальный (7,14%). Распределение количества случаев по годам и доля артериальных и венозных тромбозов по отношению к общему объему тромботических осложнений представлено на рисунках 11-12.

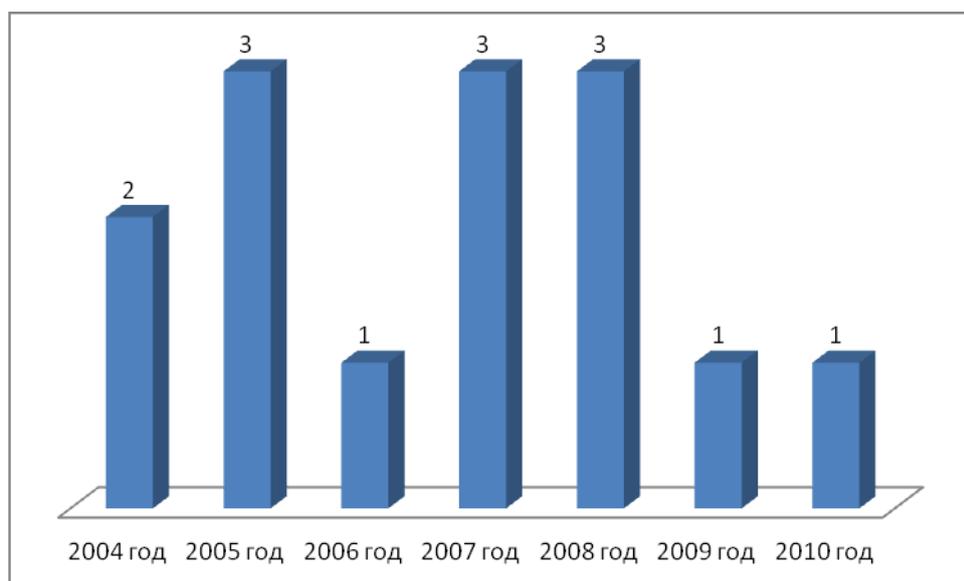


Рис. 11. Распределение случаев с тромботическими осложнениями по анализируемым годам в отделе экспертизы живых лиц (n)

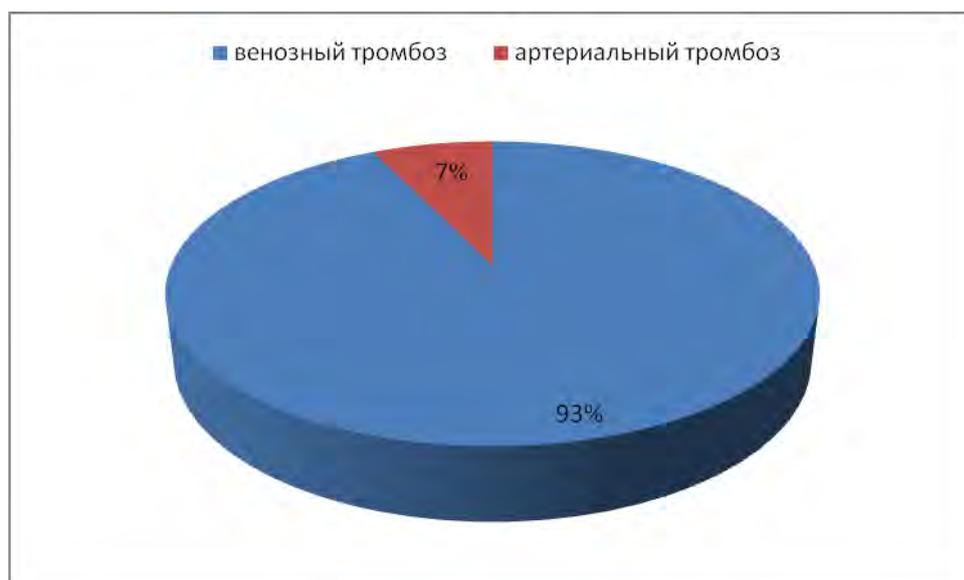


Рис. 12. Долевое соотношение венозных и артериальных тромбозов по данным отдела экспертизы живых лиц (в %)

Т.е. по отношению к общему количеству выполненных экспертиз по годам случаи с тромботическими осложнениями встретились в 2004 году в 0,009%, 2005 – 0,01%, 2006 – 0,003%, 2007 – 0,01%, 2008 – 0,01%, в 2009 – 0,003%, в 2010 – 0,004%, и в целом за анализируемый период частота встречаемости экспертных случаев по отношению ко всей экспертной продукции в ОЭЖЛ составила 0,007%.

Из 14 отобранных случаев потерпевших мужчин было 9 (64,29%), женщин - 5 (35,71%), соотношение полов (мужчина/женщина) составило приблизительно 2/1. Средний возраст всех потерпевших составил $39,14 \pm 3,0$ лет, для мужчин - $38 \pm 2,67$ лет, для женщин - $43,3 \pm 11,41$ года. Учитывая малое количество в выборке значений, для определения наличия или отсутствия статистической достоверности между мужчинами и женщинами, разницу в возрасте среди мужчин и женщин оценивали по критерию Манна-Уитни. Полученные коэффициенты $z=0,552$ и $p=0,581$ указывают на достаточную численность в группах для применения нормального распределения при проверке значимости t-критерия, который составил 0,46, что свидетельствует о том, что статистически значимых различий по возрасту между мужчинами и женщинами не было ($p > 0,05$). Полученные результаты предполагают, что различия в возрасте между полами вряд ли можно считать одним из ведущих факторов в патогенезе тромботических осложнений.

По обстоятельствам и характеру повреждений, предшествовавших тромботическим осложнениям, в 13 случаях повреждения были причинены твердыми тупыми предметами и в 1 - вследствие действия острого (колюще-режущего) предмета. Из 13 случаев нанесения повреждений твердыми тупыми предметами в 1 случае повреждения были причинены вследствие многократных ударов твердым тупым предметом, а в 12 случаях – повреждения возникли в условиях дорожно-транспортных происшествий (ДТП): переезд колесами автомобиля (2 случая), в пяти случаях соответственно при травме внутри салона автомобиля, столкновение автомобиля с пешеходом (5 случаев) (рисунок 13).

По срокам формирования тромбоза у потерпевших было установлено, что в случае артериального тромбоза осложнение возникло непосредственно после причинения повреждений в течение первых трех часов с момента госпитализации в лечебное учреждение и диагностировано в момент выполнения оперативного вмешательства. При этом у потерпевшего имел место закрытый оскольчатый перелом медиального мыщелка большеберцовой кости со смещением костных отломков и повреждением интимы подколенной артерии. В случае с причинением повреждения колюще-режущим предметом у потерпевшего было

диагностировано торакоабдоминальное ранение, что привело к смещению части желудка через рану в диафрагме в левую плевральную полость, а сам тромбоз селезеночной вены был установлен только при выполнении оперативного вмешательства на 6 сутки после причинения повреждения. Во всех остальных случаях у потерпевших ТГВНК клинически себя проявил в сроки $43,77 \pm 5,44$ суток после травмы. Что касается травмы внутренних органов, то таких случаев было всего 2: закрытая травма живота с разрывом селезенки, осложнившаяся развитием ТГВНК на 9 сутки, и проникающее торакоабдоминальное ранение живота с дислокацией желудка, осложнившееся тромбозом селезеночной вены на 6 сутки после ранения.

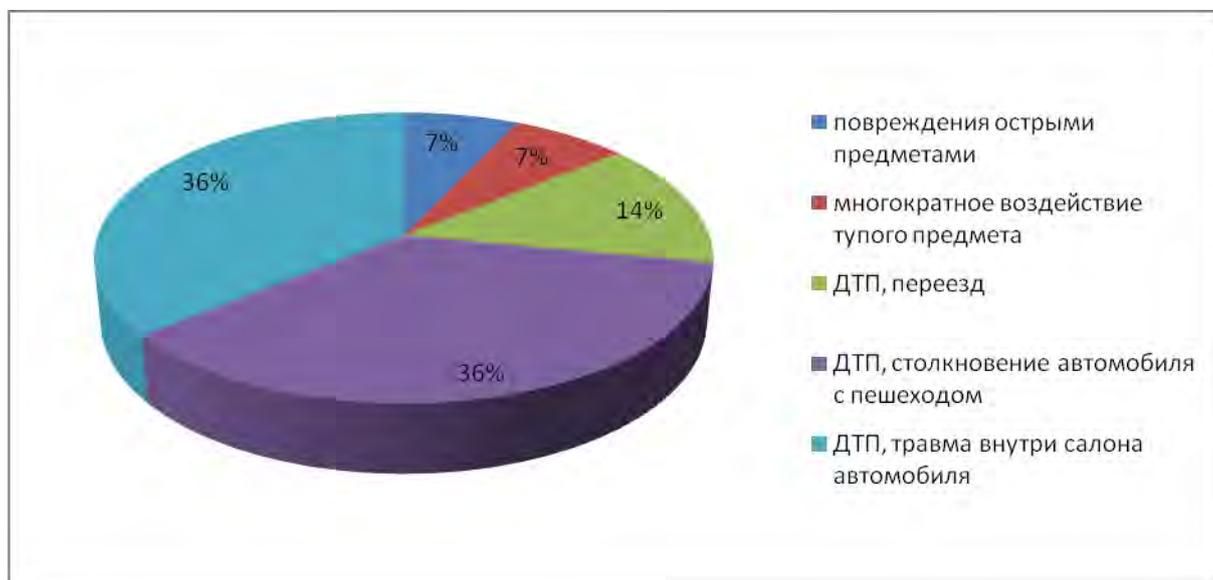


Рис. 13. Долевое соотношение видов механической травмы при тромботических осложнениях по данным отдела экспертизы живых лиц (в %)

Распределение экспертных случаев в соответствии с установленным клиническим диагнозом представлено в таблице 15.

В 38,46% случаев венозные тромбы локализовались либо в бедренно-подколенном сегменте, либо в глубоких венах голени, в 15,38% - в илеофemorальном сегменте, и в 7,69% - в селезеночной вене.

Статистика привлечения в качестве экспертов врачей-специалистов клинического профиля к проведению экспертиз в отношении лиц с

тромботическими осложнениями свидетельствует, что лишь в двух случаях (14,29%) привлекался специалист клинического профиля (хирург), во всех остальных случаях (85,71%) экспертизы были выполнены самостоятельно судебно-медицинским экспертом.

Таблица 15

Распределение экспертных случаев в соответствии с установленным клиническим диагнозом (n, %)

распределение по диагнозу						
Диагноз:	всего	%	м	%	ж	%
закрытая травма живота, разрыв селезенки, гемоперитонеум	1	7,14	1	7,14	0	0,00
перелом вертлужной впадины	3	21,43	3	21,43	0	0,00
перелом диафиза бедренной кости и/или мыщелка бедренной кости	3	21,43	3	21,43	0	0,00
перелом диафиза большеберцовой кости и/или наружной и внутренней лодыжки	3	21,43	2	14,29	1	7,14
обширная скальпированная рана голени	2	14,29	0	0,00	2	14,29
посттромбофлебитический синдром	1	7,14	0	0,00	1	7,14
проникающее торакоабдоминальное ранение	1	7,14	0	0,00	1	7,14
ВСЕГО	14	100,00	9	64,29	5	35,71

В исследовательской части заключения эксперта клиничко-лабораторные данные, характеризующие систему гемостаза, были приведены судебно-медицинскими экспертами в двух случаях (14,29%), семейный анамнез в исследовательской части не был указан ни в одном из анализируемых случаев, как и не изучался самостоятельно самим судебно-медицинским экспертом.

Ходатайство на предоставление гистопрепаратов удаленного сосуда с тромбом из всех анализируемых случаев встретилось всего лишь один раз (7,14%), которое без указания причин не было удовлетворено правоохранительными органами.

Что касается установления причинно-следственных взаимоотношений между имевшимися повреждениями и возникшим тромботическим осложнением, то лишь в одной экспертизе (7,14%) было обоснованно отвергнуто наличие

прямой причинной связи между причиненными повреждениями и тромбозом, также в одном случае была установлена прямая причинная связь (7,14%), в пяти случаях (35,71%) эксперты отказались от решения данного вопроса, мотивируя свои выводы недостаточностью информации в предоставленной медицинской документации, либо тем, что потерпевший не явился для очного освидетельствования. Во всех остальных семи случаях (50%), несмотря на то, что в предоставленной медицинской документации имелись сведения, подтверждающие наличие тромботических осложнений, эксперты в своих выводах вообще не упоминали о наличии или отсутствии какой-либо причинной связи.

Нет сомнений в том, что судебные медики сталкиваются с проблемами тромботических осложнений после причинения повреждений, и самое главное для них - это дать оценку этим осложнениям [А. Ro et al., 2008]. Анализ проведенных судебно-медицинских экспертиз показывает, что количество случаев с повреждениями и последовавшим артериальным или венозным тромбозом, либо после выполненного оперативного вмешательства в отделе экспертизы живых лиц по сравнению с клинической практикой незначительное и составляет не более 0,003% - 0.01% от общего количества выполненных экспертиз. По сравнению с танатологическим отделом за тот же анализируемый период также отмечено меньшее количество случаев. Так в 2004–2010 годах в отделе экспертизы трупов случаи с венозным тромбозом в среднем составили 0,45% от общего числа исследований (45 случаев на 10 тыс. экспертиз).

Во всех анализируемых случаях тромботическим осложнениям предшествовала механическая травма от воздействия твердых тупых предметов, однако лишь в одном случае (7,14%) это осложнение было достоверно исключено как прямое следствие механического воздействия. В то время как в половине случаев экспертами не была дана судебно-медицинская оценка данного тромботического осложнения, несмотря на то, что в медицинских критериях определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека, имеются соответствующие пункты – 6.2.8 и пункт 43 приложения к медицинским

критериям определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека [Приказ Минздравсоцразвития РФ от 24.04.2008 № 194н «Об Утверждении медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека»]. В дополнение можно отметить, что ни в одном из направительных документов на проведение судебно-медицинского освидетельствования или судебно-медицинской экспертизы правоохранными органами также не задавался конкретно вопрос об установлении связи между причиненными повреждениями и последовавшим тромботическим осложнением.

По классическим представлениям Р. Вирхова [цит. по J. Cervantes, G. Rojas, 2005; C.N. Vagot, R. Arya 2008; D.R. Kumar et al., 2010] причина тромбоза может быть объяснена патологией сосудистой стенки, уменьшением кровотока и патологией свертывающей системы крови. Первые две причины могут иметь место в анализируемых случаях при травме опорно-двигательного аппарата и вынужденного нахождения потерпевшего длительное время в лежащем положении. В то же время судебно-медицинскими экспертами не предпринималась в большинстве случаев (92,86%) какая-либо попытка проанализировать показатели системы гемостаза.

Помимо классической триады, в настоящее время к причинам тромбофилии относят и наследственные факторы предрасположенности, а именно: наличие мутаций и полиморфизмов в генах-кандидатах наследственной предрасположенности – *FII (G20210A)*, *FV (G1691A)*, *MTHFR (677TT и 677CT)* [Д.М. Зубаиров, 1997; З.С. Баркаган с соавт., 2002] как наиболее часто встречающихся, а также и других генов, ответственных за синтез белков системы гемостаза [Y. Fromovich-Amit et al., 2004; Z.M. Ruggeri, 2007]. Однако ни в одном из экспертных случаев с тромботическим осложнением экспертами не была предпринята попытка сбора семейного анамнеза, не говоря уже о проведении дополнительного генетического типирования на предмет наличия мутаций и полиморфизмов в генах-кандидатах наследственной предрасположенности, в то время как на сегодняшний день методы молекулярно-генетического исследования

нашли широкое применение в судебно-медицинской практике [V. Fineschi et al., 2012; Z. Ali, J.C. Troncoso, D.R. Fowler, 2014].

3.3. Сезонная встречаемость тромботических осложнений по данным танатологического отдела и отдела экспертизы живых лиц Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области за 2004–2010 годы

За весь анализируемый период времени с 2004 по 2010 годы в танатологическом отделе было выполнено 31594 экспертных исследований, в ОЭЖЛ – 203555.

Из них в ТанО всего случаев с ТГВНК и ТЭЛА было зафиксировано 143, среди которых мужчины составили 71 (~50%), женщины 72 (~50%), в ОЭЖЛ – 14 (мужчин – 9 (64,29%), женщин – 5 (35,71%)). Данное количество экспертных исследований составило 0,45% и 0,007% соответственно от всей экспертной продукции областного Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области.

При этом в I группу было отобрано 67 эпизодов с тромботическими осложнениями (42,68% от всех случаев с тромботическими осложнениями), во II – 33 (21,02%), в III – 38 (24,20%), в V – 14 (8,92%). Случаи, составившие IV группу сравнения (n=5) по причине малочисленности, неясности и не установленного источника смертельной ТЭЛА не подвергались анализу.

Средний возраст в анализируемых группах с учетом гендерной характеристики указан в таблице 16.

Таблица 16

Средний возраст потерпевших в анализируемых группах, $M \pm m$

Пол / группа	I группа	II группа	III группа	V группа
М	56,53 ± 4,15	51 ± 2,88	45,38 ± 4,09	38* ± 2,67
Ж	64,78 ± 3,53	67,88 ± 4,32	73,71* ± 2,51	43,3 ± 11,41
М+Ж	60,66 ± 3,83	59,44 ± 3,3	59,55 ± 7,41	39,14* ± 3
* (p<0,05)				

По характеру травмы в большинстве анализируемых наблюдений повреждения были причинены вследствие воздействия твердых тупых предметов и в основном по обстоятельствам причинения были обусловлены дорожно-транспортными происшествиями.

Динамика распределения частоты встречаемости случаев по месяцам и временам года указана на рисунке 14.

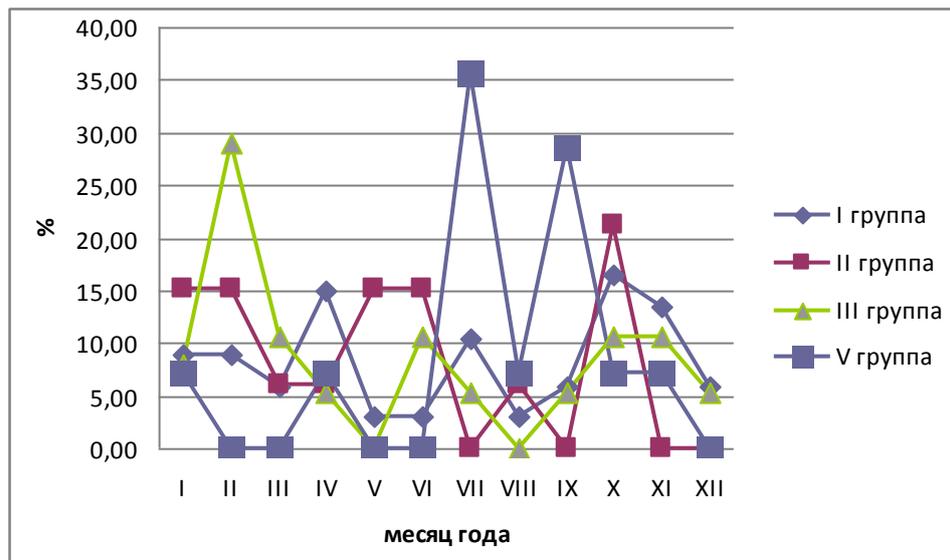


Рис. 14. Распределение частоты встречаемости случаев с тромботическими осложнениями по месяцам года (в %)

Для I группы лиц было отмечено два пика высокой частоты встречаемости тромботических осложнений в весенне-осенний период, а именно - в апреле и октябре. В эти месяцы частота встречаемости тромботических осложнений от всех случаев в данной группе составила по 14,93 – 16,42%. Минимальное количество случаев было отмечено в мае – июне (3,00%), с некоторым ростом в июле-месяце до 10,45% и снижение в августе и сентябре до 3,00 – 5,57%.

Для II группы обследованных был установлен всего один пик кривой в октябре-месяце, что составило 21,21% от всех случаев с тромботическими осложнениями в данной группе. Не было отмечено фактов тромботических осложнений в июле, сентябре, ноябре и декабре. Средний уровень частоты встречаемости тромботических осложнений был зафиксирован в январе – феврале и мае – июне, что составило по 15,15% от всех случаев в данных месяцах.

Для III группы был установлен один пик в феврале-месяце, когда было зафиксировано 28,95% от всех исследованных случаев в данной группе. Не было отмечено тромботических осложнений в мае и августе. В октябре и ноябре установлено определенное плато в частоте встречаемости тромботических осложнений, что составило по 10,53% соответственно.

В V группе был отмечен также один пик в июле-месяце, когда количество случаев от общего числа в данной группе составило 35,71%.

3.4. Лабораторные показатели системы гемостаза у лиц с тромботическими осложнениями

Для патогенетической диагностики тромбозов и ТЭЛА важным является исследование функционального состояния системы гемостаза, так как основной причиной тромбоза считается несовершенство механизмов, ограничивающих образование тромба, т.е. наследственная или приобретенная тромбофилия. Поэтому были проанализированы лабораторные показатели системы гемостаза, характеризующие состояние внешнего, внутреннего и общего путей формирования кровяного сгустка (АЧТВ (сек), ПВ (сек), МНО (усл ед.), ТВ (сек), концентрация фибриногена (г/л), РФМК (мг%), ПТИ (%)).

Значения активированного частичного тромбинового времени для анализируемых групп представлены на рисунке 15.

Максимальное значение показателя АЧТВ было отмечено в группе traum, минимальное - в группе traum+thromb, а в группе thromb имело промежуточные значения. По отношению к группе traum показатель АЧТВ был снижен в группе thromb на 15,82%, а в группе traum+thromb - на 30,59% соответственно. Полученные различия носили статистически значимый характер ($p < 0,05$).

АЧТВ (референсное значение 28,6 – 33,6 сек) используется как скрининговый тест для оценки внутреннего и общего путей свертывания плазмы, слежения за антикоагулянтным действием гепаринов. Укорочение АЧТВ наблюдается при активации внутреннего механизма свертывания крови при тромбозах, тромбоемболиях. Это может быть связано с резистентностью фактора

V к активированному протеину С, повышенным уровнем фактора VIII или с активированными факторами свертывания при ДВС-синдроме (гиперкоагуляционная фаза). Наиболее вероятным объяснением снижения показателя АЧТВ является активация факторов свертывания, т.к. в данных двух группах был верифицирован клинически, либо морфологически тромбоз глубоких вен нижней конечности.

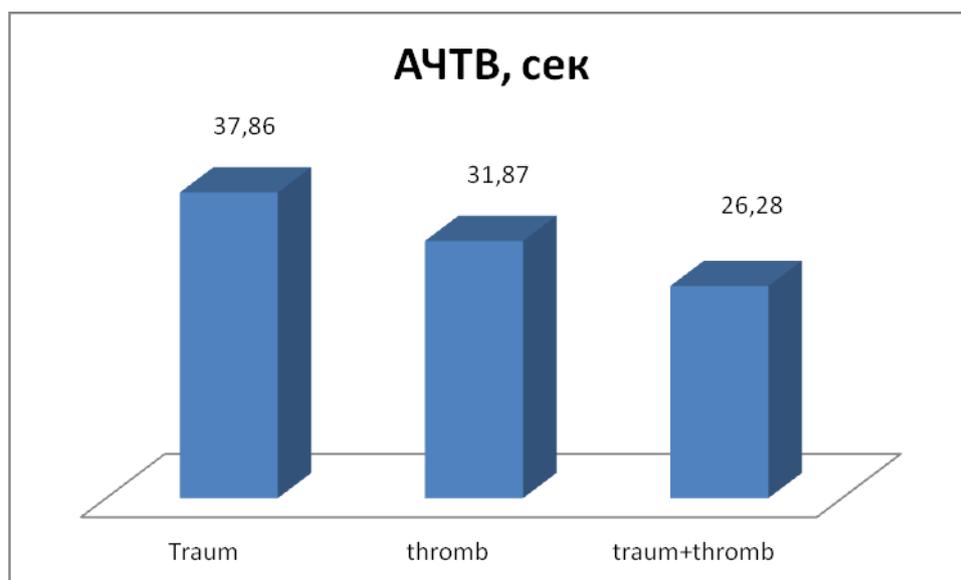


Рис. 15. Значение активированного частичного тромбинового времени (АЧТВ, сек) в анализируемых группах

Показатель протромбинового времени (ПВ) характеризует внешний каскад свертывания крови (референсное значение 9,2 – 12,2 сек).

Результаты по данному показателю представлены на рисунке 16.

Данный показатель также был снижен по отношению к группе сравнения (traum) на 37,81% и 19,28% соответственно в группах thromb и traum+thromb.

ПВ обычно используется для определения активности FVII, контроля над лечением непрямыми антикоагулянтами, при скрининге системы гемостаза, а также для количественного определения фибриногена в автоматических коагулометрах. Укорочение ПВ преимущественно связано с активацией внешнего механизма свертывания крови.

Сравнение только этих двух показателей, характеризующих внешний и внутренний пути свертывания крови, показывает, что для тромбоза глубоких вен

нижних конечностей как нетравматического патологического процесса наиболее выражены нарушения во внешнем пути свертывания, в то время как для тромбоза на фоне причиненных механических повреждений, наоборот, характерны нарушения во внутреннем пути свертывания крови.

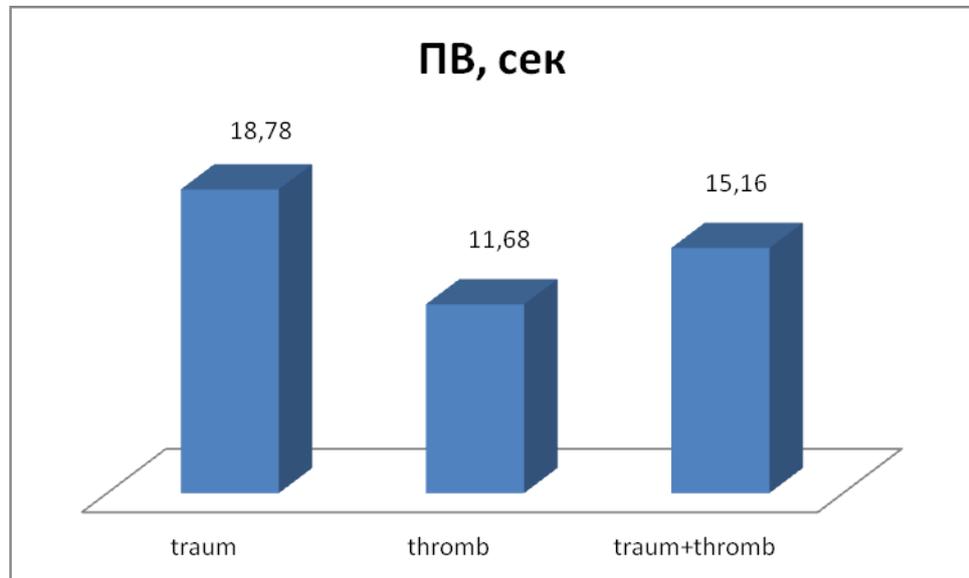


Рис. 16. Значение протромбинового времени (ПВ, сек) в анализируемых группах

МНО (Международное нормализованное отношение), латинская аббревиатура INR (International Normalized Ratio) (референсное значение 0,8 - 1,15 усл. ед.) - дополнительный способ представления результатов протромбинового теста, рекомендованный для контроля терапии непрямыми антикоагулянтами комитетом экспертов ВОЗ, Международным комитетом по изучению тромбозов и гемостаза и Международным комитетом по стандартизации в гематологии. МНО - математическая коррекция, при помощи которой производится стандартизация протромбинового времени, что позволяет сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях. МНО и протромбин по Квику коррелируют отрицательно, снижение протромбина по Квику соответствует повышению МНО.

Результаты по данному показателю представлены на рисунке 17.

Сравнение данного показателя не выявило каких-либо статистически достоверных его различий в анализируемых группах, а его значение было в

пределах референсного интервала. Полученные данные предполагают, что в сравниваемых группах активность белков протромбинового комплекса (FVII, FX, FV, FII) была в пределах нормы.

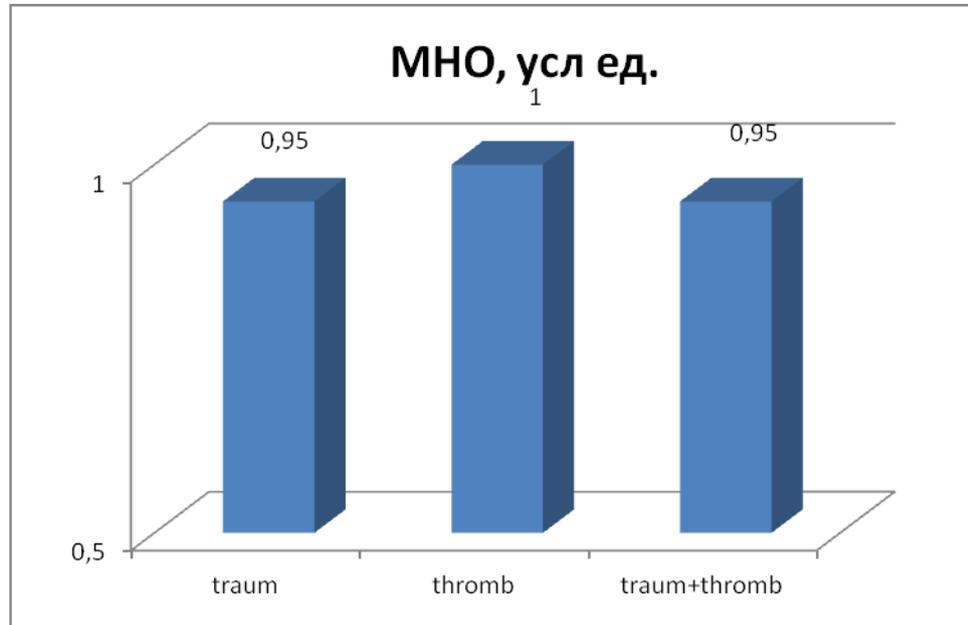


Рис. 17. Значение международного нормализованного отношения (МНО, усл ед.) в анализируемых группах

Тромбиновое время (ТВ, референсное значение 12 - 24 сек). Определение тромбинового времени является третьим по значимости базисным скрининговым тестом. Тест характеризует конечный этап процесса свертывания – превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина, на него влияет концентрация фибриногена в плазме и наличие продуктов деградации фибрина. Укорочение ТВ может быть связано с гиперфибриногенемией (фибриноген 6,0 г/л и выше) либо с начальной (гиперкоагуляционной) фазой острого и хронического ДВС-синдрома. Результаты по данному показателю представлены на рисунке 18.

Обращает на себя внимание тот факт, что показатель тромбинового времени был снижен для групп лиц с травмой опорно-двигательного аппарата, в то время как для лиц с тромбозом глубоких вен нижних конечностей без механических повреждений этот показатель находился в пределах нормы.

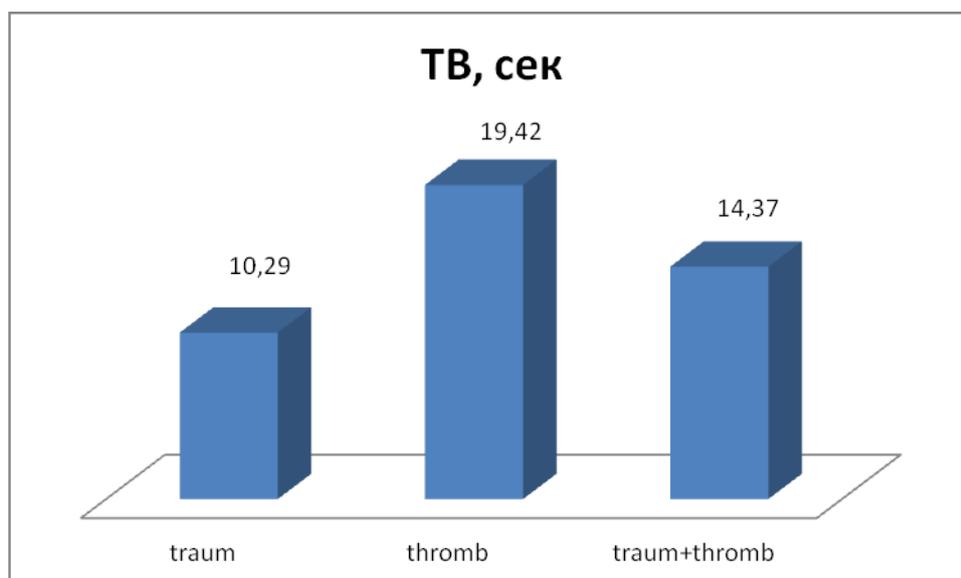


Рис. 18. Значение тромбинового времени (ТВ, сек) в анализируемых группах

Количественное определение фибриногена по методу Клаусса является базисным тестом исследования гемостаза. Образование фибрина и его стабилизация представляют собой финальный этап формирования тромба, при котором растворимый фибриноген превращается в нерастворимый фибрин под действием тромбина и фактора XIII.

Фибриноген – острофазный белок (референсное значение 2,6 – 3,6 г/л). Концентрация его может превышать 10 г/л при тяжелых бактериальных инфекциях, при травме и тромбозе. Повышение уровня фибриногена в острой фазе воспаления, как правило, имеет транзиторный характер. Результаты по данному показателю представлены на рисунке 19.

Хотя различия в концентрации фибриногена между группами traum и thromb и имели место, эти величины находились в пределах погрешности эксперимента. В то же время в группе traum+thromb концентрация фибриногена была увеличена по отношению к группе traum на 48,10% ($p < 0,05$).

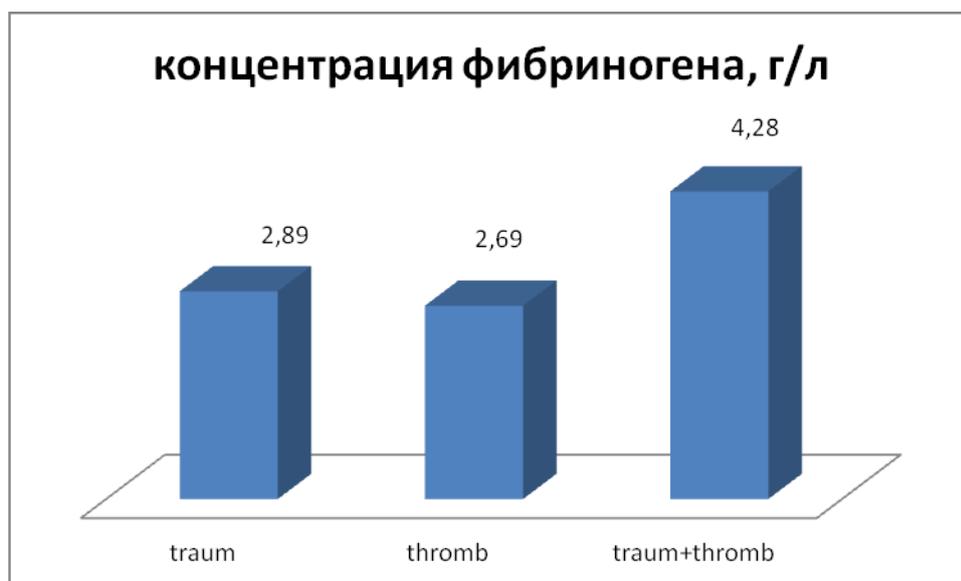


Рис. 19. Концентрация фибриногена (г/л) в анализируемых группах

РФМК – растворимый фибрин-мономерный комплекс (референсное значение до 4,0 мг%). При ряде форм патологии, характеризующихся активацией свертывания крови (ДВС, тромбозы, тромбофилии), происходит расширение пула фибриногена, в результате чего увеличивается количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). Увеличение данного показателя может быть связано с активацией внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром, тромбоз глубоких вен, эмболии легочной артерии); возможно при лечении антикоагулянтами, при физическом и психологическом стрессах. Уровень РФМК в каждой из обследованных групп представлен на рисунке 20.

Значение РФМК было увеличено по отношению к референсным значениям в группах лиц, имевших травму опорно-двигательного аппарата, в то время как в группе с тромбозом глубоких вен нижних конечностей без каких-либо механических повреждений этот показатель не превышал верхнего порога этих значений. По отношению к группе traum показатель в группе traum+thromb был повышен на 76,10% ($p < 0,05$). В то время как в группе с ТГВНК без каких-либо механических повреждений он был ниже на 47,18% ($p < 0,05$).

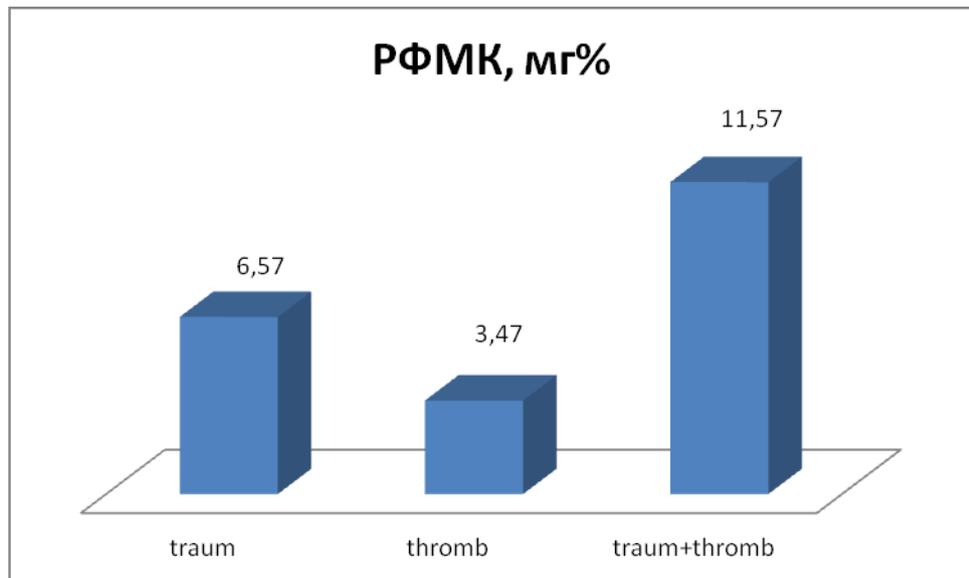


Рис. 20. Значение растворимого фибрин-мономерного комплекса (РФМК, мг%) в анализируемых группах

Протромбиновый индекс (ПТИ) (референсное значение 75-104%) характеризует состояние внешнего пути свертывания крови, активность факторов FII, FV, FVII, FX. Результаты по данному показателю представлены на рисунке 21.

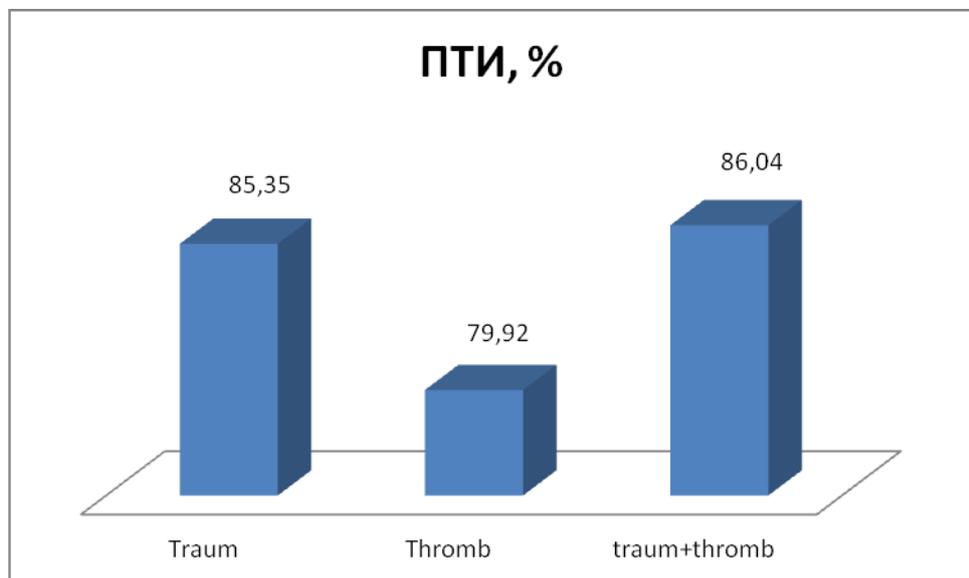


Рис. 21. Значение протромбинового индекса (ПТИ, в %) в анализируемых группах

Значение данного показателя во всех трех анализируемых группах, как и показатель МНО, был в пределах нормы. Однако в группах лиц с механической

травмой его значение было выше, чем в группе лиц с тромбозом глубоких вен нижних конечностей без какого-либо механического воздействия в анамнезе.

Обобщенные сведения о системе гемостаза в обследованных группах приведены в таблице 17.

Таблица 17

Показатели ** системы гемостаза в сравниваемых группах, $M \pm m$

показатель	группа сравнения	Среднее значение	\pm	Ошибка среднего	t-критерий в сравниваемых группах по отношению к группе traum
АЧТВ, сек	traum	37,86	\pm	1,39	
	thromb	31,87*	\pm	0,32	4,20
	traum+thromb	26,28*	\pm	1,23	6,24
ПВ, сек	traum	18,78	\pm	0,32	
	thromb	11,68*	\pm	0,57	10,86
	traum+thromb	15,16*	\pm	0,50	6,10
МНО, усл ед	traum	0,95	\pm	0,04	
	thromb	1	\pm	0,01	1,21
	traum+thromb	0,95	\pm	0,04	0
ПТИ, в %	traum	85,35	\pm	1,55	
	thromb	79,92*	\pm	0,04	3,5
	traum+thromb	86,04	\pm	1,26	0,35
ТВ, сек	traum	10,29	\pm	0,19	
	thromb	19,42*	\pm	0,84	10,60
	traum+thromb	14,37*	\pm	0,22	14,04
фибриноген, г/л	traum	2,89	\pm	0,11	
	thromb	2,69	\pm	0,11	1,29
	traum+thromb	4,28*	\pm	0,40	3,35
РФМК, мг%	traum	6,57	\pm	0,80	
	thromb	3,47*	\pm	0,48	3,32
	traum+thromb	11,57*	\pm	0,36	5,70
* (p<0,05)					
** Значение показателей приведено на момент поступления потерпевшего (пациента) в лечебное учреждение					

3.5. Мутации и полиморфизмы генов-кандидатов наследственной предрасположенности к тромбофилии у потерпевших с тромботическими осложнениями механической травмы

Ретроспективно было выполнено генетическое типирование на предмет наличия полиморфных и мутантных аллелей в генах-кандидатах наследственной предрасположенности к тромбофилии. Все исследованные были подразделены на группы. Первая (IG) группа была представлена лицами в возрасте от 21 до 61 года с верифицированным клинико-морфологическим диагнозом тромбоза глубоких вен нижних конечностей (ТГВНК) и тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА), которые были диагностированы после причинения механической травмы и/или выполненного оперативного вмешательства на сегментах нижней конечности по поводу имевшегося перелома. В эту группу вошло 12 наблюдений (10 мужчин, 2 женщины).

Вторую (II G) группу составили лица в возраст от 18 до 80 лет с верифицированным клинико-морфологическим диагнозом ТГВНК без какой-либо механической травмы или выполненного оперативного вмешательства в анамнезе – 75 человек (45 мужчин, 30 женщин).

Третья (III G) группа была представлена 64 лицами (20 мужчин, 44 женщины) в возрасте от 57 до 81 года с механическими повреждениями, в частности, с переломами сегментов нижней конечности и выполненном в последующем оперативном вмешательстве по поводу травмы ОДА без каких-либо клинических и морфологических проявлений ТГВНК.

Четвертую (IV G) группу составили 100 практически здоровых лиц в возрасте 17 – 40 лет (14 мужчин, 86 женщин). Распределение обследуемых лиц по группам, по полу представлено в таблице 18.

Распределение обследованных лиц по группам (n, %)

Группы сравнения	мужчины	женщины	ВСЕГО
IG	10 (83,33%)	2 (16,67%)	12 (100%)
IIIG	45 (60%)	30 (40%)	75 (100%)
IIIIG	20 (31,25%)	44 (68,75%)	64 (100%)
IVIG	14 (14%)	86 (86%)	100 (100%)

Средний возраст обследованных лиц группы IIIG составил $53,95 \pm 2,29$ года, IG - $38,58 \pm 4,46$ года, IIIIG - $61,11 \pm 1,73$ и IVIG - $25,32 \pm 0,44$ год. Группы IG, IIIIG, IVIG по сравнению с IIIG носили статистически значимые различия среднего значения возраста в совокупности у мужчин и женщин ($p < 0,05$). При сравнении среднего возраста между группами IG и IVIG также были получены статистически значимые различия в значениях.

Средний возраст обследованных лиц в группах указан в таблице 19.

Таблица 19

Средний возраст обследованных лиц, $M \pm m$

группы	мужчины	женщины	ВСЕГО
IG	$34,89 \pm 4,91$	$49,67 \pm 8,11$	$38,58 \pm 4,46$
IIIG	$53,20 \pm 3,50$	$54,53 \pm 3,07$	$53,95 \pm 2,29$
IIIIG	$55,56 \pm 3,59$	$63,74 \pm 1,78$	$61,11 \pm 1,73$
IVIG	$25,21 \pm 1,71$	$25,34 \pm 0,44$	$25,32 \pm 0,44$

У лиц в группах IG и IIIIG в анамнезе имелась механическая травма, в частности и переломы костей нижней конечности. Таким образом, по судебно-медицинскому и клиническому диагнозам сравниваемые группы были практически однородными.

Характеристика травм у лиц группы IIIIG представлена в таблице 20.

Характеристика механической травмы у лиц группы III G, M \pm m

Клинический диагноз	«Смешанная» группа (мужчины и женщины)	Женщины	Мужчины
Черепно-мозговая травма	4,17 \pm 3,4%	6,67 \pm 4,28%	0 \pm 0%
Переломы плечевой кости	8,33 \pm 4,74%	6,67 \pm 4,28%	11,11 \pm 5,39%
Переломы костей предплечья	4,17 \pm 3,43%	6,67 \pm 4,28%	0 \pm 0%
Переломы бедренной кости	29,17 \pm 7,8%	26,67 \pm 7,58%	33,33 \pm 8,08%
Переломы костей голени	29,17 \pm 7,8%	40 \pm 8,40%	11,11 \pm 5,39%
Сочетанная тупая травма	4,17 \pm 3,43%	6,67 \pm 4,28%	0 \pm 0%
Неустановленный вид травмы	8,33 \pm 4,74%	6,67 \pm 4,28%	11,11 \pm 5,39%
Закрытая травма груди	4,17 \pm 3,43%	0 \pm 0%	11,11 \pm 5,39%
Без патологии со стороны опорно-двигательного аппарата	8,33 \pm 4,74%	0 \pm 0%	22,22 \pm 7,13%
ВСЕГО	100 \pm 0%	100 \pm 0%	100 \pm 0%

В практику клиницистов широко внедряются количественные методы оценки риска тромбэмболических осложнений [Ch. Samama, M. Samama, 1999; W. Geerts et al., 2004]. Влияние по отдельности каждого из факторов риска различно по своей «силе» и простое суммирование факторов не дает реальной оценки прогноза. Ключевое место в современной концепции патогенеза тромбоза занимает понятие «фактор риска», обозначающее любое состояние, между наличием которого и повышенной встречаемостью заболевания существует либо предполагается причинно-следственная связь. Группой экспертов на XIX Конгрессе Международного общества по тромбозам и эмболиям [цит. по W. Geerts et al., 2004; В.Л. Баранов с соавт., 2007] была предложена шкала оценки факторов риска с применением коэффициента, что и было использовано для оценки сравниваемых групп лиц с механическими повреждениями и тромботическими осложнениями. Рекомендованная шкала и полученные результаты представлены в таблицах 21 - 22.

Относительный риск возникновения тромбоза глубоких вен нижних конечностей и тромбоэмболии легочной артерии при наличии различных предрасполагающих факторов. Совокупное мнение международной группы экспертов (XIX Конгресс Международного общества по тромбозам и гемостазу, 2003 г.)

Предрасполагающий фактор/ коэффициент	
здоровые женщины до 39 лет включительно	1
мужчины	1,11
возраст 40 - 59 лет	1,67
возраст 60 – 74	2,91
возраст больше 75 лет	4,11
группа крови 0	1,63
ВМІ > 30 кг/м ²	2,17
курение (больше 15 сигарет в сутки)	1,57
оральные контрацептивы, содержащие эстрогены и прогестерон	2,95
недавние хирургические заболевания осложненные	5,1
недавние хирургические заболевания неосложненные	2,95
инфаркт миокарда	3,71
ишемический инсульт	3,69
дегидратация (потеря 10% веса тела)	2,05
гематокрит > 45% для женщин	2,03
гематокрит > 50% для мужчин	2,03
повышенная вязкость крови (> 4 ед)	2,39
длительное путешествие в сидячем положении (> 6 часов)	1,6
злокачественные новообразования локальные	2,61
злокачественные новообразования далеко зашедшие локальные	3,69
метастазы	5,48
особые формы рака - поджелудочной железы, ЖКТ, яичников, простаты, легких, злокачественная шлиома	6,02
радиотерапия	5,05
химиотерапия (кроме гормональных препаратов)	5,6
гормональная терапия	5,88
ХСН I - II ФК по NYHA	1,86
ХСН III - IV ФК по NYHA	5,08
ХОБЛ или эмфизема легких	1,74

В соответствии с рекомендованной шкалой, для групп IG, IIG и IIIG был определен коэффициент риска тромботических осложнений [Ch. Samama,

М. Samama, 1999; W. Geerts et al., 2004; В.Л. Баранов с соавт., 2007], значения которого представлены в таблице 22.

Таблица 22

Коэффициент относительного риска тромботических осложнений у обследованных в группах сравнения, $M \pm m$

группы	IG	IG	III G
Среднее значение коэффициента	6,38±0,66	10,75*±0,67	9,79*±0,54
Значение t-Критерия		4,65	3,65
Статистическая достоверность различий (p)		* (p<0,05)	
% изм.		68,49	53,45

Как видно из таблицы 22, коэффициент относительного риска тромботических осложнений для лиц IG группы составил 6,38±0,66, для IG - 10,75±0,67, для III G – 9,79±0,54. Значения определенного коэффициента носили статистически значимые различия между лицами с ТГВНК в качестве основного диагноза по сравнению с лицами, имевшими механические повреждения. В то же время, в сравниваемых двух группах IG и III G значимых различий не было, следовательно, по значению коэффициента относительного риска тромботических осложнений эти две группы между собой были однородными. Вместе с тем, несмотря на старший возраст, в группе III G в анамнезе тромботические осложнения отсутствовали. Поэтому при генетическом типировании на наличие мутаций и полиморфных аллелей в генах-кандидатах на наследственную предрасположенность к тромбофилии особый акцент был поставлен именно на эти две группы.

При типировании однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *FII* в позиции 20210 относительное количество с гетерозиготным (G/A) носительством составило 0% - 4,0% в зависимости от группы обследованных. В то же время обращает на себя внимание тот факт, что в группах лиц с механическими повреждениями (группы IG и III G) точечных мутаций в позиции 20210 гена *FII* не выявлено.

В случае типирования локуса *1691* гена *FV* в исследуемых группах относительное количество лиц с гетерозиготным носительством (*1691 G/A*) составило 0% - 3,0% в зависимости от группы. При этом в группах IG и IIIG гетерозиготные и гомозиготные носители (*1691 G/A* и *1691 A/A*) отсутствовали.

Количество лиц с генотипом *677 C/C* (ген *MTHFR*) для групп IIIG, IVIG и IIIIG составило 52,0% - 58,0%. В группе IG такой генотип встретился всего лишь в 16,67%, тогда как доля гетерозиготных (*667 C/T*) и гомозиготных (*677 T/T*) составила 66,67% и 16,67%, соответственно.

Распределение количества лиц с генотипом *-455 G/G* (ген *FGB*) по группам составило 57,0% - 91,67%. При этом доля гетерозиготных носителей *-455G/A* была равна 8,33% - 39,06%, а гомозиготных – *455 A/A* – 0% - 4,0%.

Лица с генотипом – *675 5G/5G* (ген *PAI-1*) в IIIIG - IVIG группах составили 27,00% - 34,38%. Для IG - IIIG групп такой генотип имел место в 8,33% и 6,67%, соответственно. В то же время доля гетерозиготных носителей *-675 5G/4G* составила 56,0% - 66,67% для соответствующих групп. Обобщенные результаты по всем группам представлены в таблице 23.

Таблица 23

Виды генотипов пациентов в исследованных группах

Группы	ген	«дикий тип» генотипа (-/-) (в %)	гетерозиготный вариант (+/-) (в %)	гомозиготный вариант по полиморфному аллелю (+/+)(в %)
IG	<i>MTHFR 677 CT</i>	16,67	66,67	16,67
	<i>FII G20210A</i>	100	0	0
	<i>FV G1691A</i>	100	0	0
	<i>PAI-1 -675 5G/4G</i>	8,33	66,67	25
	<i>FGB -455 G/A</i>	91,67	8,33	0
	<i>NOS3 894GT</i>	16,67	83,33	0
IIIG	<i>MTHFR 677 CT</i>	52	38,67	9,33
	<i>FII G20210A</i>	96	4	0
	<i>FV G1691A</i>	97,33	2,67	0
	<i>PAI-1 -675 5G/4G</i>	6,67	56	37,33
	<i>FGB -455 G/A</i>	58,67	37,33	4,0
	<i>NOS3 894GT</i>	50,67	45,33	4,0

Продолжение табл. 23

Группы	ген	«дикий тип» генотипа (-/-) (в %)	гетерозиготный вариант (+/-) (в %)	гомозиготный вариант по полиморфному аллелю (+/+)(в %)
IIIГ	<i>MTHFR 677 CT</i>	53,13	39,06	7,81
	<i>FII G20210A</i>	100	0	0
	<i>FV G1691A</i>	100	0	0
	<i>PAI-1 -675 5G/4G</i>	34,38	45,31	20,31
	<i>FGB -455 G/A</i>	57,81	39,06	3,13
	<i>NOS3 894GT</i>	51,56	39,06	9,38
IVГ	<i>MTHFR 677 CT</i>	58	34	8
	<i>FII G20210A</i>	96	4	0
	<i>FV G1691A</i>	97	3	0
	<i>PAI-1 -675 5G/4G</i>	27	53	20
	<i>FGB -455 G/A</i>	57	39	4
	<i>NOS3 894GT</i>	53	38	9

Сравнительный анализ по группам показал, что из всего набора исследованных мутаций и полиморфизмов генов-кандидатов наследственной предрасположенности к тромбофилии значительные различия в количестве лиц с мутациями и полиморфными аллелями были связаны с генами *MTHFR 677 CT*, *PAI-1 -675 5G/4G*, *NOS3 894GT*. В то же время из трех выделенных генов наиболее часто определяли полиморфные локусы в гене *MTHFR 677 CT*. Гетеро- и гомозиготное носительство в гене *MTHFR 677 C(T)T* предполагает повышенный уровень в крови ГЦ. В свою очередь, ГГЦ считается независимым фактором риска тромботических осложнений, обусловленных изменением структуры и функции эндотелия сосудов как артериального, так и венозного русла. В связи с тем, что при анализе всех отобранных случаев пациентам, находившимся на стационарном лечении (группы IIГ, IG, IIIГ), не выполнялось определение уровня ГЦ (как одна из причин отсутствия результатов исследования в анализируемых медицинских документах – это дороговизна методики для использования в практическом здравоохранении), не было возможности сравнить уровень ГЦ, с одной стороны, с морфологическими особенностями строения сосудистой стенки у обследованных, с другой стороны, для практических целей представляется существенным определение морфологических маркеров ГГЦ. Для решения такой задачи было

выполнено экспериментальное исследование на лабораторных животных с использованием модели умеренной ГГЦ.

Результаты электрофореза продуктов рестрикции ПЦР-амплификаторов в 3%-ом агарозном геле *FII G20210A*, *FV G1691A*, *MTHFR 677 CT*, *MTHFD1 G1958A* показаны на рисунках 22 – 25.

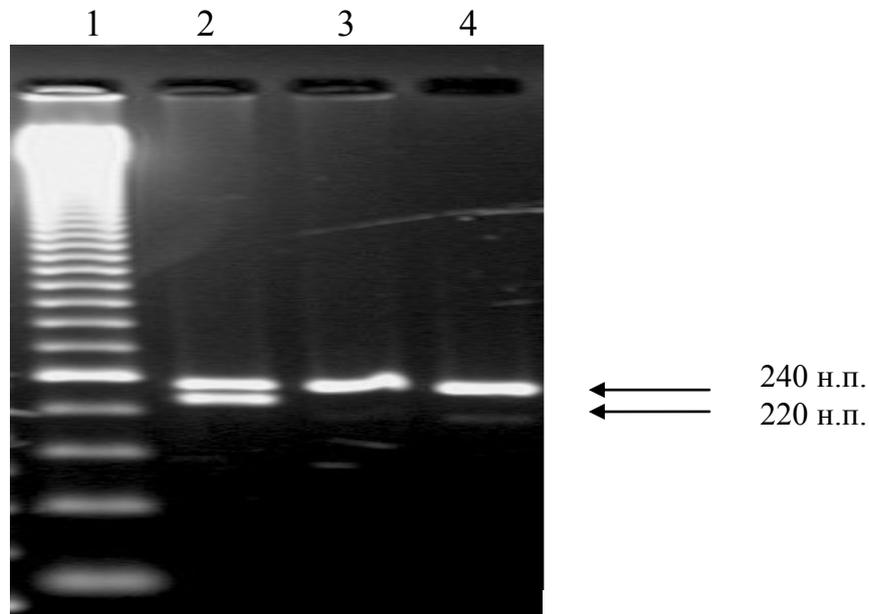


Рис. 22. Результат электрофореза продуктов рестрикции ПЦР-амплификаторов в 3%-ом агарозном геле *FII G20210A* Дорожки: 1. 50 Base-Pair Ladder; 2. положительный контроль (гетерозиготный вариант *FII G20210A*); 3 – 4. результаты генотипирования образцов («дикий тип» генотипа – *FII G20210G*)

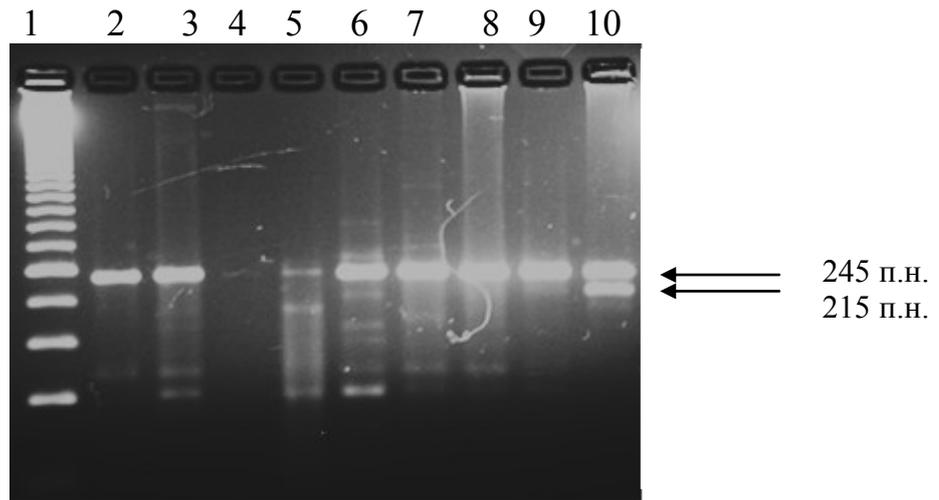


Рис. 23. Результат электрофореза продуктов рестрикции ПЦР-амплификаторов в 3%-ом агарозном геле *FV G1691A*. Дорожки: 1. 50 Base-Pair Ladder; 10. – положительный контроль (гетерозиготный вариант *FV G1691A*); 2, 3, 6-9 «дикий тип» генотипа *FV G1691G*, 5. - концентрация активной ДНК-матрицы недостаточно для категоричного установления генотипа, 4 – отрицательный контроль

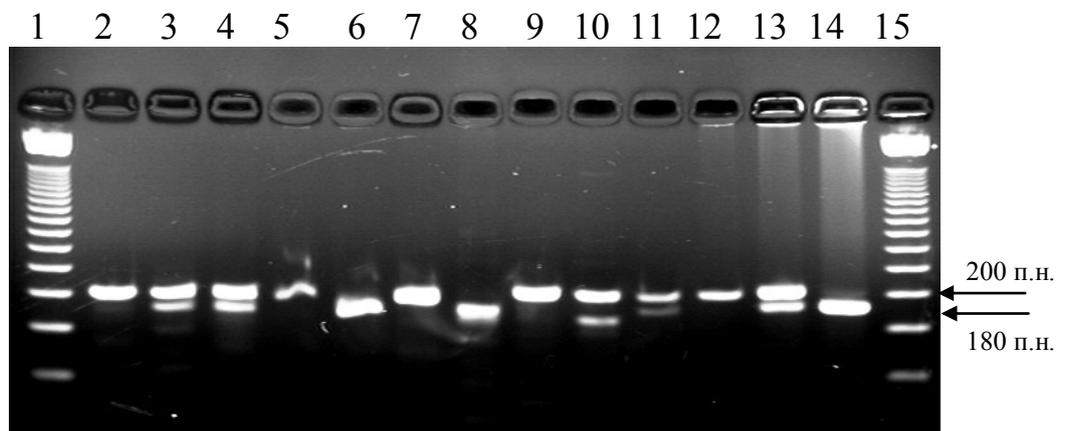


Рис. 24. Результат электрофореза продуктов рестрикции ПЦР-амплификаторов в 3%-ом агарозном геле *MTHFR C677T*. Дорожки: 1, 15. 50 Base-Pair Ladder; 12-14 контрольные образцы; 12 - *MTHFR C677C* («дикий тип» генотипа); 13- *MTHFR C677T* (гетерозиготный вариант); 14 - *MTHFR T677T* (гомозиготный вариант по полиморфному аллелю)

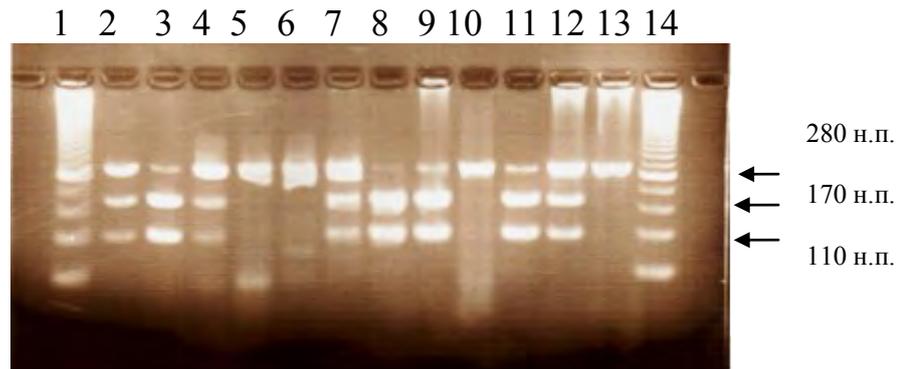


Рис. 25. Результат электрофореза продуктов рестрикции ПЦР-амплификаторов в 3%-ом агарозном геле *MTHFD1 G1958A* Дорожки: 1, 14. 50 Base-Pair Ladder; 13 – контроль, *MTHFD1 A1958A* («гомозиготный вариант по полиморфному аллелю»); 8 – контроль, *MTHFD1 G1958G* («дикий тип» генотипа); 12 - контроль, гетерозиготный вариант *MTHFD1 G1958A*

3.6. Экспериментальная модель умеренной гомоцистеинемии при механической травме опорно-двигательного аппарата

В настоящее время повышенному содержанию гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови отводится большое внимание, так как ГЦ считается независимым фактором риска развития тромбоокклюзивных заболеваний [M. Cattaneo, 2006; M. den Heijer et al., 2007]. В предыдущем разделе (3.5.) были отражены результаты исследования, свидетельствующие, что наиболее часто среди потерпевших с тромботическими осложнениями встречаются полиморфные аллели именно в гене *MTHFR*. По прогнозу, составленному медицинским информационно-аналитическим центром (МИАНЦ) РАМН на ближайшее десятилетие, перспективными научными разработками в разделе «Механизмы развития патологических процессов. Дисрегуляторная патология. Создание экспериментальных моделей и разработка эффективных методов патогенетической диагностики и терапии» планируется спектр исследований по

созданию экспериментальных моделей, в том числе и состояний, связанных с гипергомоцистеинемией [Прогноз развития медицинской науки на период до 2025 года: утвержден президиумом РАМН 31 января 2007 года, протокол №2, §1 / РАМН; НИИ общественного здоровья РАМН; Минздравсоцразвития России по комплексным проблемам медицины].

ГГЦ может быть обусловлена многими причинами, среди которых выделяют генетические, метаболические, алиментарные и прочие факторы. К самым часто встречающимся наследственным причинам относят мутации генов, кодирующих цистатионин-β-синтетазу [O. Nygard et al., 1999], 5-метилтетрагидрофолатредуктазу (MTHFR) [A. Canepa, A. Carrera 2003], метилтетрагидрофолатдегидрогеназу1 (MTHFD1) [P. De Marco et al., 2005]. К алиментарным причинам относят дефицит фолиевой кислоты, витаминов В₁₂ и В₆, поступающих с пищей. Вредные привычки: курение, чрезмерное употребление алкоголя и кофе - также могут стать причиной повышения гомоцистеина в крови как за счет уменьшения содержания витаминов группы В, так и за счет снижения активности печеночных ферментов, участвующих в процессах обмена гомоцистеина [И.Е. Баранова, О.О. Большакова, 2004]. Однако особенности морфологии органов и тканей, в частности, при травматическом воздействии или при развитии травматической болезни в доступной литературе не освещены в полном объеме. Знание же этих особенностей клиницистам позволит предвидеть возможные тромбоокклюзивные осложнения, а морфологам констатировать причину этих осложнений. Таким образом, для изучения закономерностей реакции организма на внешнее травматическое воздействие при ГГЦ требуется экспериментальная модель. Моделирование патологического процесса позволит наиболее полно решить вопрос о механизме тромбообразования. К достоинствам такого метода можно отнести тот факт, что при моделировании имеется возможность изучения явлений, максимально приближенным к практике.

Для изучения влияния ГГЦ на клеточном и тканевом уровнях в зависимости от поставленных задач в научной литературе были найдены экспериментальные модели, обуславливающие ГГЦ за счет специальных диет, способствовавших

увеличению метаболизма путем введения большего количества аминокислоты метионина [M. Angela et al., 2004], ограничение активности цистатион- β -синтетазы для преобразования гомоцистеина в цистатион за счет уменьшения в пище витамина В₆, ограничение активности метионин-синтетазы для реметилирования гомоцистеина с использованием диеты с пониженным содержанием фолиевой кислоты или витамина В₁₂, ограничение активности бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы для реметилирования гомоцистеина путем уменьшения концентрации холина в пище [A.S. Henkel et al., 2009], либо путем добавления гомоцистеина в воду для питья, либо сочетание нескольких диет [M. Angela et al., 2004]. При этом национальный исследовательский совет (США) для содержания лабораторных животных (мышей или крыс) рекомендует пищевой рацион, содержащий 5 г/кг метионина, 0,5 мг/кг фолиевой кислоты, 10 г/кг витамина В₁₂ и 7 мг/кг витамина В₆ [Nutrient Requirements of Laboratory Animals Fourth Revised Edition, 1995], использование нокаутированных лабораторных животных – с мутациями в гене, ответственном за синтез цистатион- β -синтетазы (Cbs $-/-$ mice), связанного с увеличением концентрации ГЦ в крови до 200 мкмоль/л [M. Watanabe et al., 1995]. Мутация в гене *MTHFR* у лабораторных животных (Mthfr $-/+$ mice) приводит к повышению ГЦ до 30 мкмоль/л [Z. Chen et al., 2001].

В настоящем исследовании стояла задача адаптировать известные экспериментальные модели с ГГЦ для изучения особенностей патогенеза тромботических осложнений при травме опорно-двигательного аппарата с целью решения «пограничных» практических задач травматологии и судебной медицины. Для решения поставленной задачи нокаутированные животные не могли соответствовать требованиям эксперимента, так как уровень ГЦ у данных животных был повышен по отношению к обычным животным, имевшим «дикий» генотип уже с рождения. Поэтому наиболее адекватной моделью можно было считать использование диетиндуцированных моделей. К тому же в работе М. Angela и соавторов (2004) в эксперименте на лабораторных животных [M. Angela et al., 2004] было показано, что повышенный уровень гомоцистеина

существенно не отличался у лабораторных животных с различным генотипом $MTHFR+/-$ и $MTHFR +/+$ при использовании одной из диет, индуцирующих гипергомоцистеинемию. При этом генотипы $MTHFR+/-$ и $MTHFR +/+$ у этих лабораторных животных имели сходство с полиморфизмом *MTHFR 677 CT* у человека. Подробная схема эксперимента на лабораторных животных, распределение животных по группам, длительность эксперимента была указана в главе, посвященной описанию материалов и методов исследования.

В течение всего срока эксперимента осуществляли контроль массы тела лабораторных животных во всех группах. Для контрольной группы животных динамика массы тела в течение всего эксперимента представлена в таблице 24 и на рисунке 26.

Таблица 24

Динамика массы тела экспериментальных животных I (контрольной) группы (в г), $M \pm m$

I группа					
Этап эксперимента	Среднее значение массы тела (в г)	±	Ошибка среднего	t-критерий по отношению к первоначальной массе лабораторных животных в контрольной группе	
начало эксперимента	238,00	±	13,96		
1 неделя	255,00	±	14,67	0,84	
2 неделя	269,50	±	15,37	1,52	
3 неделя	287,25	±	15,55	2,36	
4 неделя	310,86*	±	16,32	3,39	($p < 0,05$)
5 неделя	336,67*	±	16,59	4,55	($p < 0,05$)
6 неделя	341,20*	±	17,88	4,55	($p < 0,05$)
7 неделя	351,33*	±	35,14	3,00	($p < 0,05$)
8 неделя	328,00	±	46,00	1,87	

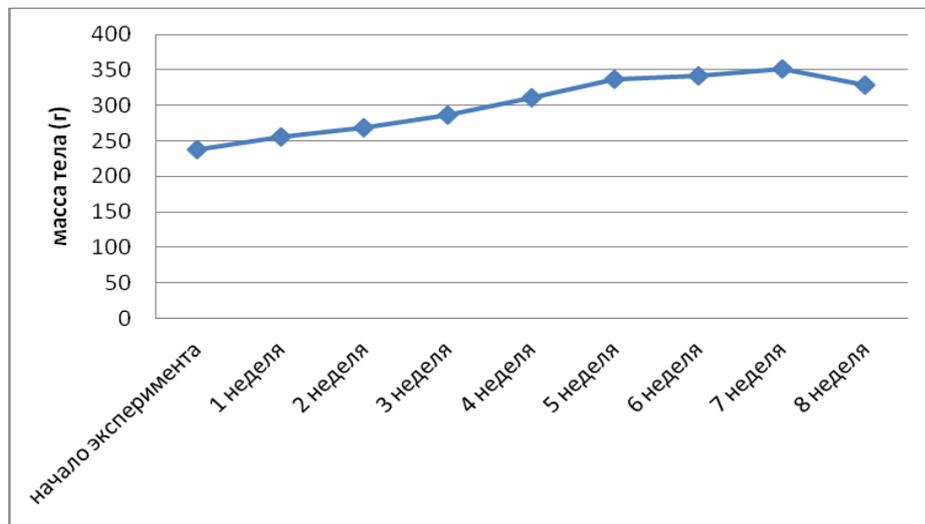


Рис. 26. Динамика массы тела экспериментальных животных I (контрольной) группы (в г)

Из представленных табличных и графических данных видно, что в течение всего срока эксперимента происходит плавное увеличение массы тела контрольной группы животных. Такая динамика сохранялась вплоть до седьмой недели эксперимента, с некоторым незначительным снижением к последней неделе эксперимента. При этом различия в массе животных на седьмой и восьмой неделях между собой не носили статистически значимых различий. Для экспериментальных групп животных, подвергшихся лишь механической травме (II и VI группы), динамика массы тела представлена в таблице 25 и на рисунке 27.

Таблица 25

Динамика массы тела экспериментальных животных с механической травмой (в г), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Этап эксперимента	Среднее значение массы тела (в г)	\pm	Ошибка среднего	t-критерий по отношению к первоначальной массе лабораторных животных в контрольной группе	
II группа	начало эксперимента	254,44	\pm	15,07		
	1 неделя	252,89	\pm	14,79	0,07	($p > 0,05$)
	2 неделя	252,89	\pm	15,56	0,07	($p > 0,05$)
VI группа	начало эксперимента	357	\pm	11,56		
	1 день	339,75	\pm	10,52	1,10	($p > 0,05$)

Как видно из приведенных значений, какой-либо статистически выраженной динамики массы тела в группе с механической травмой выявлено не было.

Для групп экспериментальных животных, получавших метионин в течение 29 суток (VII группа) и 6 недель (III группа), динамика массы тела отражена в таблице 26 и на рисунке 28.

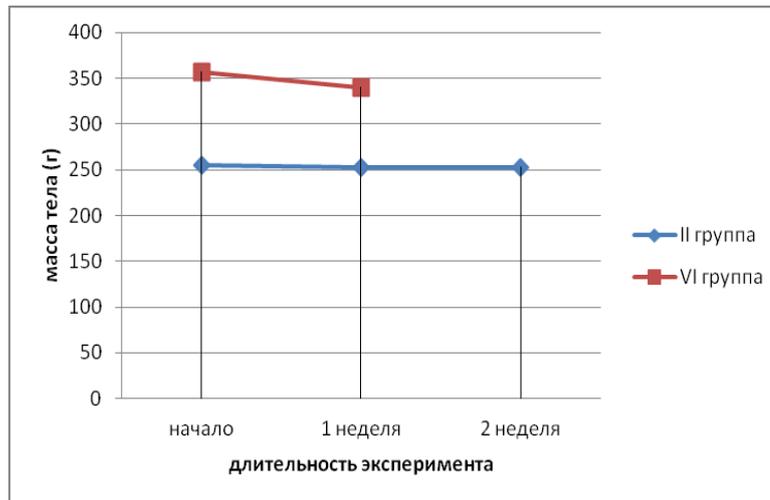


Рис. 27. Динамика массы тела экспериментальных животных с механической травмой (в г)

Таблица 26

Динамика массы тела экспериментальных животных, которым ежедневно внутрижелудочно вводили метионин (в г), $M \pm m$

Этап эксперимента	III группа				VII группа**			
	Среднее значение массы тела (в г)	±	Ошибка среднего	t-критерий по отношению к первоначальной массе лабораторных животных в экспериментальной группе	Среднее значение массы тела (в г)	±	Ошибка среднего	t-критерий по отношению к первоначальной массе лабораторных животных в экспериментальной группе
начало эксперимента	227,25	±	12,57		239,5	±	10,29	
1 неделя	237	±	11,33	0,58 (p>0,05)	239	±	9,15	0,04 (p>0,05)
2 неделя	239,25	±	12,19	0,69 (p>0,05)	247,25	±	9,11	0,56 (p>0,05)
3 неделя	257,25	±	13,08	1,65 (p>0,05)	264	±	9,81	1,72 (p>0,05)
4 неделя	244,75	±	12,53	0,99 (p>0,05)	269	±	11,08	1,95 (p>0,05)
5 неделя	268,25	±	13,66	2,21 (p>0,05)	258,5	±	11,12	1,25 (p>0,05)
6 неделя	260,75	±	13,47	1,82 (p>0,05)				

** для VII группы строка 5 неделя соответствует 29 дню эксперимента

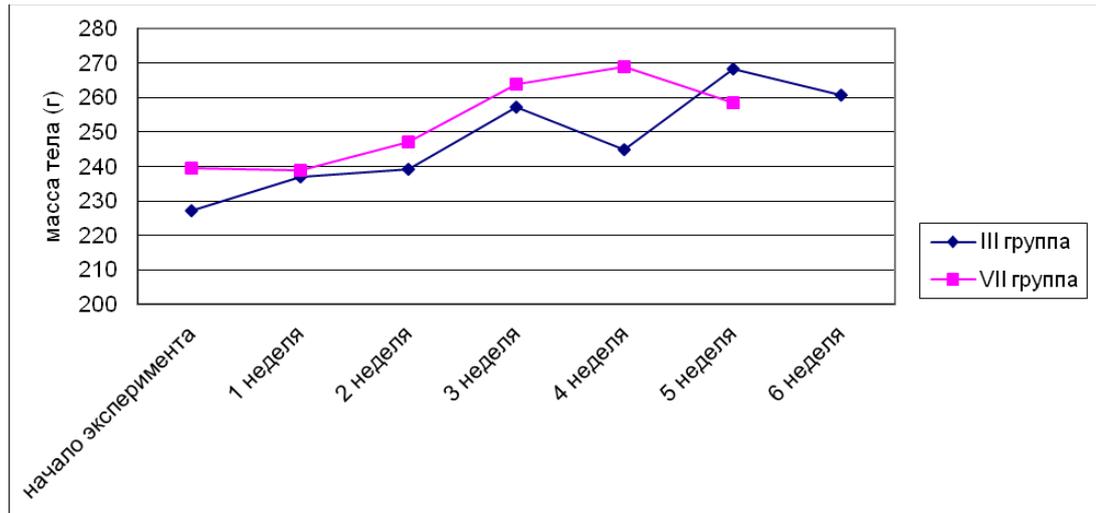


Рис. 28. Динамика массы тела экспериментальных животных, которым ежедневно внутрижелудочно вводили метионин (в г)

В целом, за весь срок эксперимента установлено увеличение массы тела экспериментальных животных. Каких-либо статистически значимых различий в этих двух группах между собой отмечено не было.

Для «смешанных» экспериментальных групп (IV, V, VIII) динамика массы тела представлена в таблице 27 и на рисунке 29.

Таблица 27

Динамика массы тела экспериментальных животных, которым ежедневно внутрижелудочно вводили метионин и в различные сроки эксперимента был сформирован перелом костей голени (в г), $M \pm m$

IV группа				
Этап эксперимента	Среднее значение массы тела (в г)	±	Ошибка среднего	t-критерий по отношению к первоначальной массе лабораторных животных в экспериментальной группе
начало эксперимента	204,89	±	4,99	
1 неделя	205,78	±	5,93	0,11 (p>0,05)
2 неделя	215,56	±	7,61	1,17 (p>0,05)
3 неделя	226,22	±	9,78	1,94 (p>0,05)

Продолжение табл. 27

Этап эксперимента	Среднее значение массы тела (в г) ± Ошибка среднего	t-критерий по отношению к первоначальной массе лабораторных животных в экспериментальной группе
4 неделя	251,00* ± 11,05	3,8 (p<0,05)
5 неделя	243,25* ± 9,08	3,7 (p<0,05)
6 неделя	233,50* ± 9,35	2,7 (p<0,05)
V группа		
начало эксперимента	260,44 ± 17,71	
1 неделя	260,67 ± 18,28	0,01 (p>0,05)
2 неделя	277,78 ± 18,34	0,68 (p>0,05)
3 неделя	272,44 ± 19,10	0,46 (p>0,05)
4 неделя	262,89 ± 18,89	0,09 (p>0,05)
VIII группа		
начало эксперимента	283,25 ± 13,98	
1 неделя	286,00 ± 16,16	0,13 (p>0,05)
2 неделя	291,50 ± 14,00	0,42 (p>0,05)
3 неделя	298,75 ± 14,86	0,76 (p>0,05)
4 неделя	310,00 ± 14,46	1,33 (p>0,05)
29 день эксперимента	291,50 ± 14,31	0,41 (p>0,05)

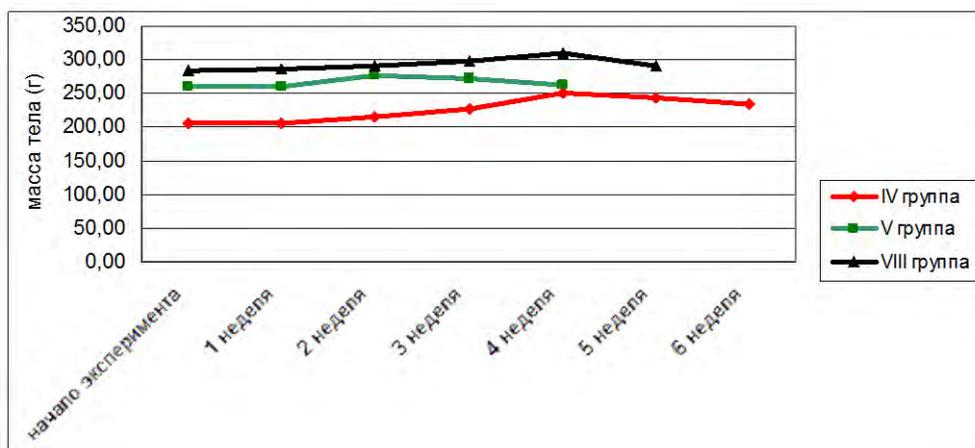


Рис. 29. Динамика массы тела экспериментальных животных, которым ежедневно внутрижелудочно вводили метионин и в различные сроки эксперимента был сформирован перелом костей голени (в г)

Анализ динамики массы тела для «смешанных» групп, также не выявил каких-либо статистически значимых различий между группами, несмотря на различные сроки эксперимента.

В рамках проведенного исследования были определены показатели общего анализа крови у лабораторных животных. Значения общего анализа крови в различных экспериментальных группах представлены в таблице 28. На первые сутки после сформированного перелома костей голени количество тромбоцитов по отношению к контрольным значениям было увеличено на 3,01% (VI группа), однако это различие не носило статистически значимого значения. При увеличении срока эксперимента до двух недель (II группа) количество тромбоцитов уже было увеличено на 15,88% ($p > 0,05$).

В группах экспериментальных животных, которым в различные сроки эксперимента внутривенно вводили метионин (VII и III группы), количество тромбоцитов, напротив, было снижено соответственно на 18,54% и 27,90%. При этом изменения в количестве тромбоцитов в периферической крови по отношению к контрольной группе животных носили статистически значимые различия.

В смешанных группах VIII, V, IV количество тромбоцитов в периферической крови было снижено соответственно на 10,13%, 29,59%, 55,85%. При этом, в V и IV группах различия были статистически значимыми по отношению к контрольным цифрам.

В отношении количества в периферической крови экспериментальных животных палочкоядерных нейтрофилов каких-либо статистически значимых различий выявлено не было, а сами количественные показатели носили в экспериментальных группах разнонаправленный характер.

Значения общего анализа крови в экспериментальных группах животных, $M \pm m$

Номер группы	Эозинофилы (в %)	Палочкоядерные нейтрофилы (в %)	Сегментоядерные нейтрофилы (в %)	Лимфоциты (в %)	Моноциты (в %)	Тромбоциты (в 1 мкл)
I	1,14±0,31	2,79±0,83	13,07±2,51	78,85±2,51	3,42±0,62	71,98±5,76
II	4,81*±0,93	3,15±0,56	28,50*±4,37	56,89*±4,50	6,87*±0,96	82,25±26,69
III	2,98±0,80	3,26±0,99	18,08±4,14	69,09±4,91	6,52*±1,16	51,18*±6,90
IV	1,98±0,80	1,25±0,40	18,63±6,66	69,52±5,14	8,68*±1,77	31,34*±3,45
V	0,41±0,15	2,98±1,97	19,84±2,34	69,13±5,58	6,90±2,44	49,98*±7,28
VI	2,81*±0,15	2,84±0,33	19,55±3,05	80,44±3,81	4,02±0,95	73,12±5,08
VII	0,60±0,26	3,10±0,52	20,04±4,37	68,91±5,24	7,11*±1,48	57,82±4,71
VIII	0,86±0,32	3,49±0,88	19,09±2,94	72,26±6,68	7,41±2,91	63,79±3,60
* (p<0,05)						

Что касается количества сегментоядерных нейтрофилов, то значимые различия были отмечены лишь для группы со сформированным переломом костей голени на второй недели эксперимента (II группа), где их количество было увеличено по отношению к контрольным значениям почти в два раза (увеличено на 118,06%).

При адаптации экспериментальной модели с метиониновой нагрузкой к условиям эксперимента предполагали, что при длительных сроках наблюдения будет увеличиваться концентрация ГЦ в плазме крови лабораторных животных. Результаты эксперимента, отражающие концентрацию ГЦ в плазме крови лабораторных животных, представлены в таблице 29 и на рисунке 30.

Концентрация гомоцистеина в плазме крови экспериментальных животных,
M±m

Экспериментальная группа	I	II	III	IV
концентрация гомоцистеина (мкмоль/л)	8,27±1,18	9,21±0,7	12,14*±0,92	23,53*±1,89
Экспериментальная группа	V	VI	VII	VIII
концентрация гомоцистеина (мкмоль/л)	9,63*±1,57	8,90±1,11	11,97*±0,85	10,03±0,83
* (p<0,05)				

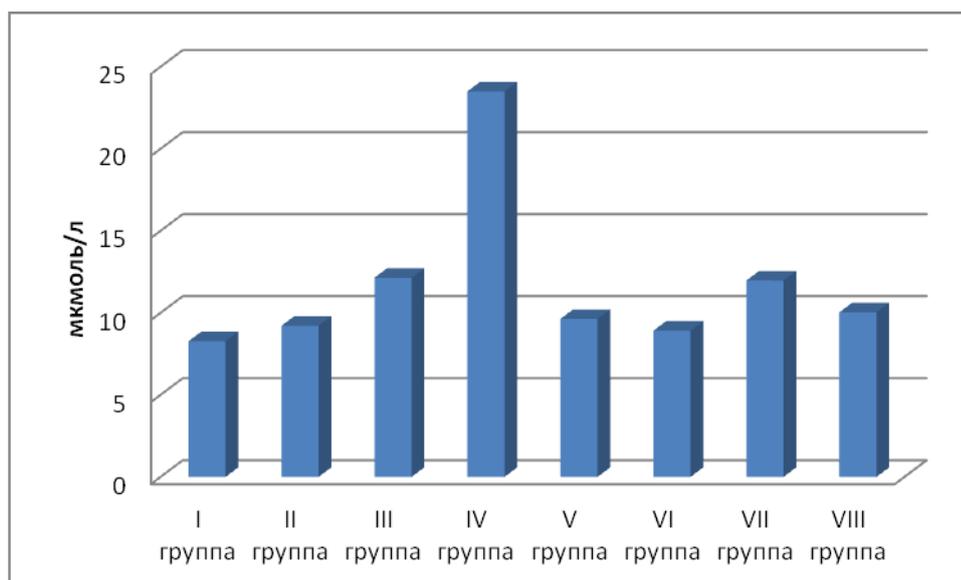


Рис. 30. Концентрация гомоцистеина в плазме крови экспериментальных животных (мкмоль/л)

Стоит отметить, что в группах экспериментальных животных, которым внутривенно вводили метионин, концентрация гомоцистеина была повышена по отношению к контрольным значениям на 46,8% и 44,74% (III и VII группы соответственно), при этом различия носили статистически значимый характер (p<0,05).

В группах с механической травмой уровень гомоцистеина был также увеличен по отношению к контролю на 7,62% и 11,37% (VI и II группы соответственно), но эти различия не были статистически значимыми.

В то же время в смешанных группах отмечено увеличение уровня гомоцистеина в плазме крови на 16,44-184,65% в зависимости от срока эксперимента. При этом максимальные различия были зафиксированы в группе IV, где животным в течение шести недель внутрижелудочно вводили метионин и на четвертой неделе введения препарата был сформирован перелом костей голени ($p < 0,05$).

3.7. Морфологическое состояние сосудов в зоне травмирования при воздействии твердого тупого предмета в условиях умеренной гомоцистеинемии на примере экспериментальной модели

Перечень исследованных морфометрических показателей сосудов в зоне травмирования подробно указан в разделе материалы и методы. Здесь же приводятся качественная описательная характеристика гистокартинки тканей и результаты выполненного морфометрического исследования.

Для контрольной группы было выявлено обычное строение артериол. Стенку меди артерий мелкого калибра можно охарактеризовать как с признаками незначительной гипертрофии. В сосудах микроциркуляторного русла стаз, местами наблюдали пролиферацию клеток эндотелия, миоцитов, неравномерное сужение просвета сосудов. На некоторых срезах препаратов межмышечно наблюдали скопление лейкоцитов (лейкоцитоз). Единично в препаратах периваскулярно диффузно-очаговая лейкоцитарная инфильтрация, очаги некроза миоцитов. Стоит отметить, что в одном из препаратов в артериолах мелкого калибра был обнаружен фибриновый тромб в сочетании с гипертрофией мышечного слоя сосуда. Для артерий крупного калибра интима была толстой, без каких-либо дефектов эндотелия и каких-либо воспалительных клеточных реакций. Гистологическая картина мягких тканей, сосудов задней конечности интактного животного представлена на рисунках 31-32.

В группе экспериментальных животных с переломом задней конечности в мышцах была выявлена фиброзная ткань (незрелая фиброзно-мышечная ткань, состоящая из гигантских миелопролиферативных симпластов, миобластов) с диффузной лимфо-плазматической инфильтрацией, гемосидерозом, склерозом стенок мелких артерий и артериол. Местами отмечали вновь образованные сосуды, очаговый ангиоматоз стромы, очаговый продуктивный миозит. На контралатеральной конечности, т.е. на интактной конечности, отмечали гипертрофию меди, отек стромы, полнокровие сосудов.

Для группы экспериментальных животных, находившихся на метиониновой диете, были выражены пролиферативные процессы в виде пролиферации клеток эндотелия и миоцитов. В ряде случаев имел место фиброз стенок артерий мелкого калибра, дистрофия миоцитов. В части препаратов отмечена резкая пролиферация эндотелия мелких артерий и артериол.

Что касается смешанной группы экспериментальных животных, т.е. там, где животные находились на метиониновой диете и им был сформирован перелом задней конечности, отмечали среди мышц незрелую фиброзно-мышечную ткань, состоящую из незрелых фибробластов, лимфоцитов, гемосидерофагов, встречались и атипичные миоциты. Как и в группе животных, которые только находились на метиониновой диете, установлена резкая пролиферация эндотелия сосудов. В одном из препаратов была выявлена кавернозная гемангиома (рисунки 33–39).

Тромботические массы в просвете сосудов микроциркуляторного русла при изучении гистопрепаратов были выявлены в I группе в 5,88%, в VI и II группах на стороне травмирования – 47,06% - 26,67%, в III и VII группах – 16,67% - 10,53%, в «смешанных» группах IV, V, VIII на стороне травмирования – 25,0%, 47,6%, 60,0% соответственно.

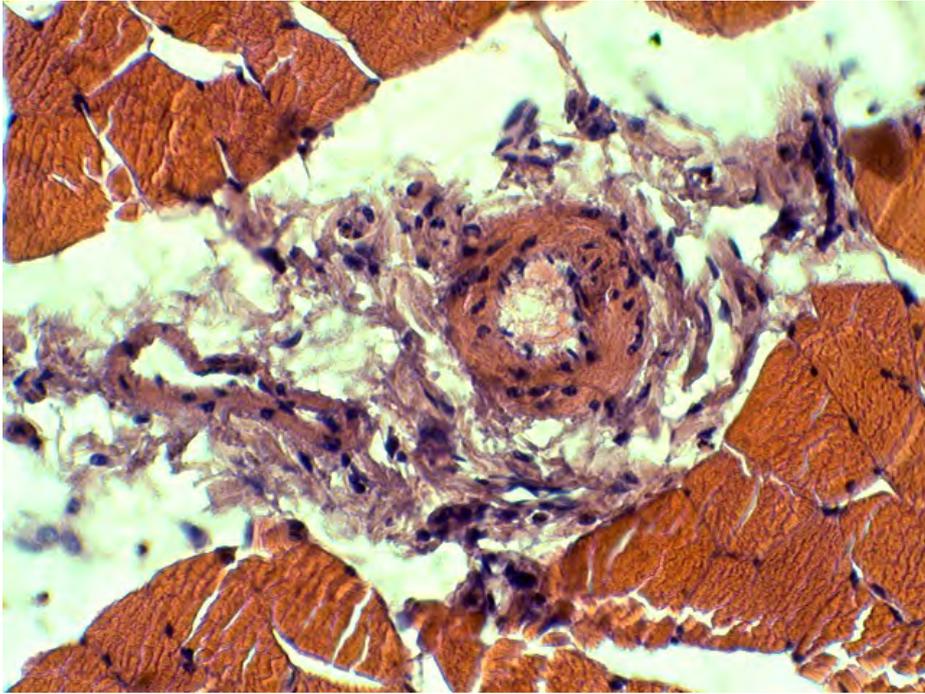


Рис. 31. I экспериментальная группа: строение артерии мышечного типа и артериолы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х

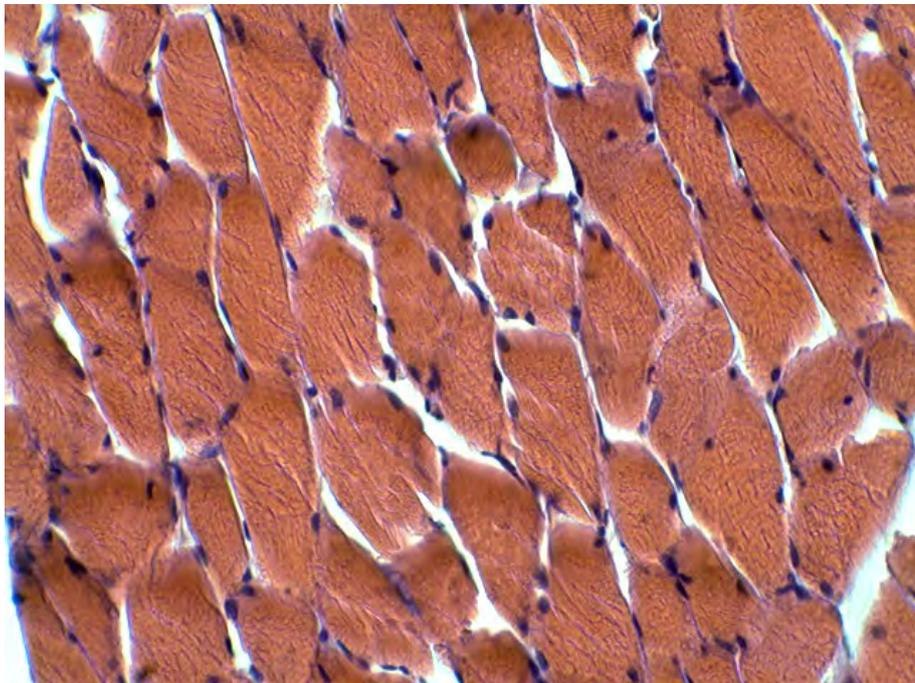


Рис. 32. I экспериментальная группа: гистологическое строение поперечнополосатой мускулатуры задней конечности. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 1000х

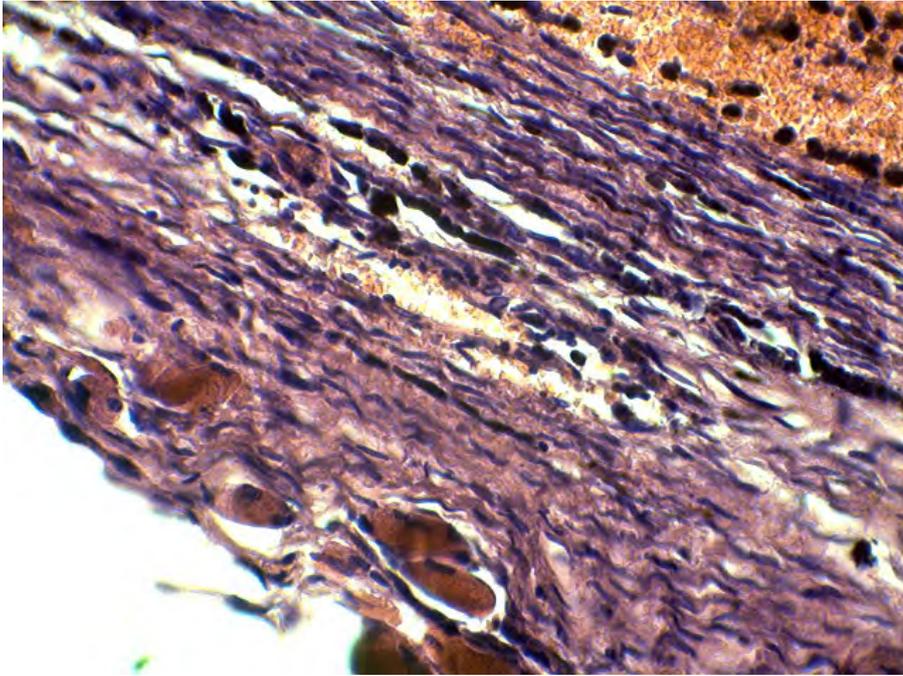


Рис. 33. II экспериментальная группа, незрелая фиброзно-мышечная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х

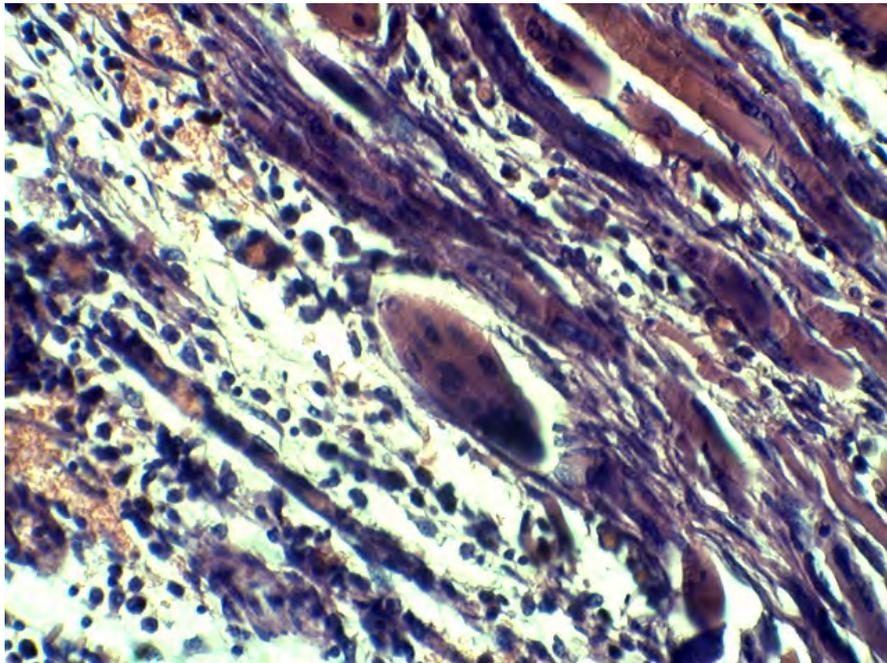


Рис. 34. II экспериментальная группа: наличие незрелой фиброзно-мышечной ткани, среди мышечных клеток встречаются крупные многоядерные миобласты и новообразованные сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х

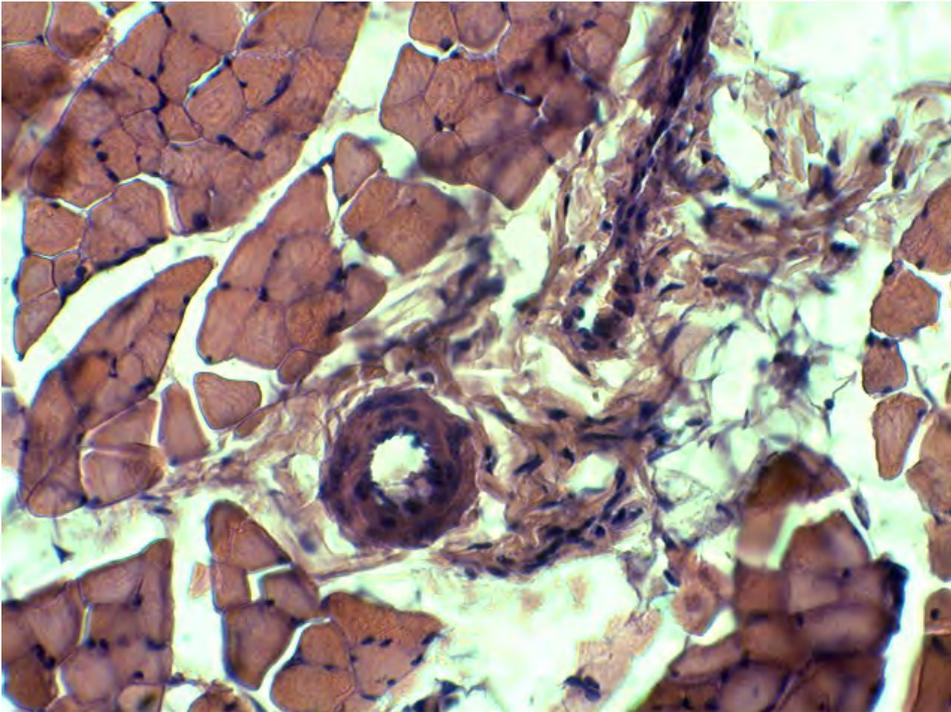


Рис. 35. III экспериментальная группа: стеноз артерии среднего калибра. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400x

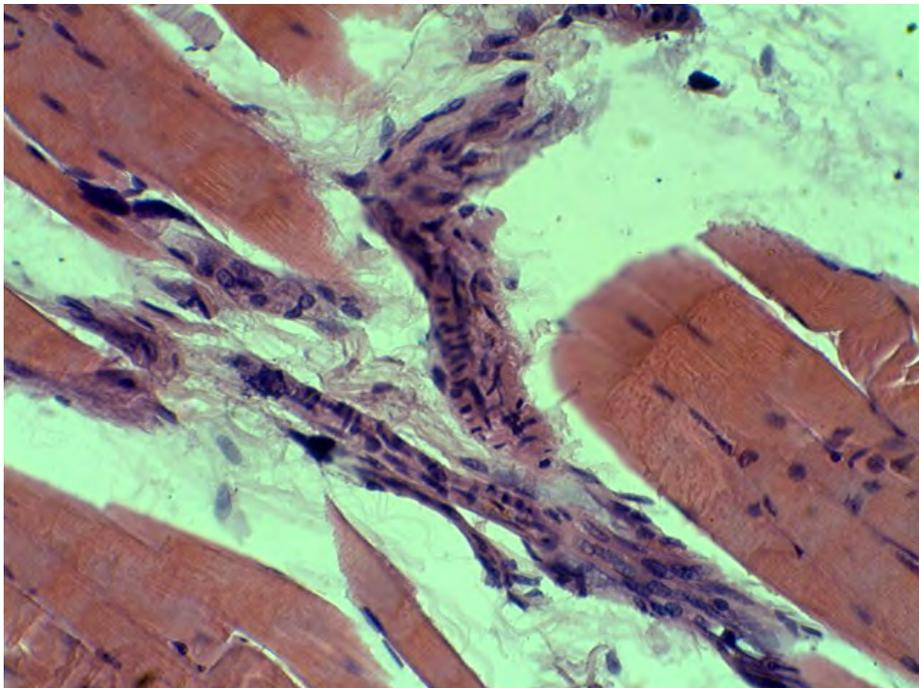


Рис. 36. III экспериментальная группа: выраженная пролиферация эндотелиальных клеток, стеноз артерий среднего калибра. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 1000x

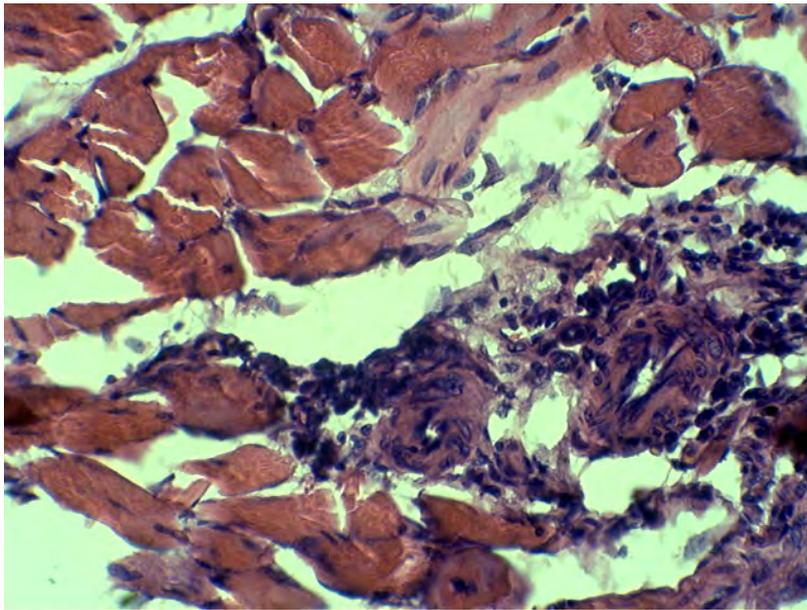


Рис. 37. IV экспериментальная группа: пролиферация клеток эндотелия, сужение диаметра сосудов, встречаются единичные атипичные миобласты, лимфоцитарная инфильтрация вокруг сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х

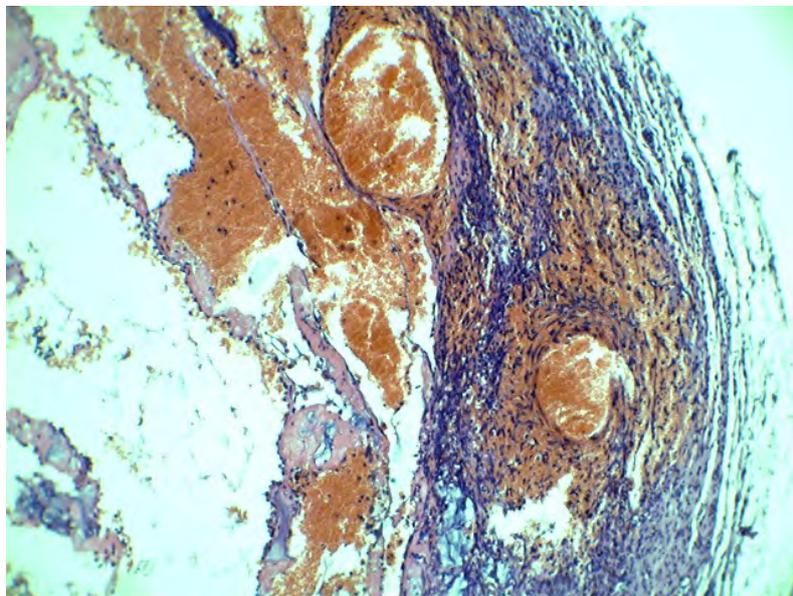


Рис. 38. IV экспериментальная группа: кавернозная гемангиома. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100х

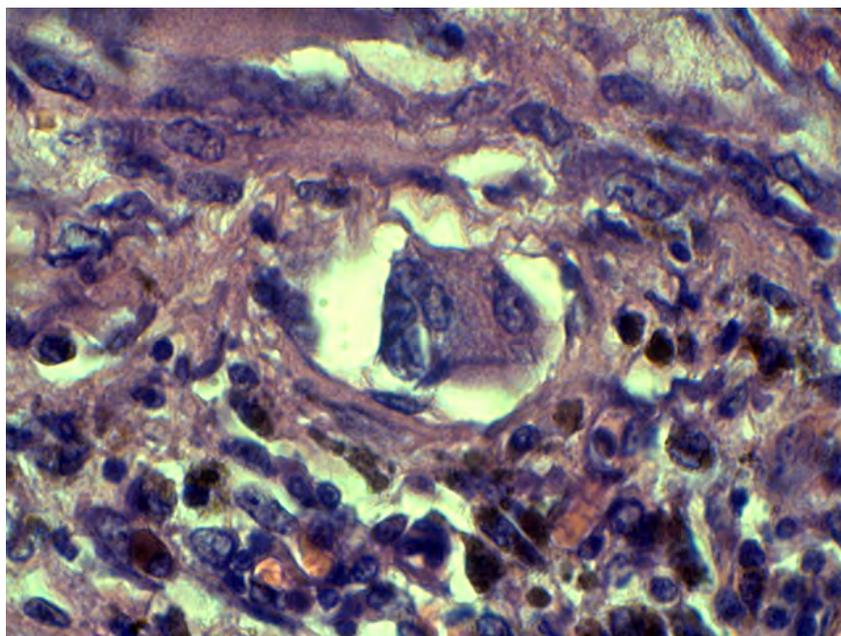


Рис. 39. IV группа: незрелая фиброзно-мышечная ткань, состоящая из миобластов, фибробластов и мезенхимальных клеток, гемосидероз. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х

Ниже приводятся результаты морфометрического исследования. Цифровые значения диаметра (мин) мышечного волокна в экспериментальных группах указаны в таблице 30.

Таблица 30

Диаметр (мин) мышечного волокна задней конечности у животных экспериментальных групп, $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	\pm	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	19,01	\pm	0,25			
II FRACT**	18,39	\pm	0,26		1,72	-3,26
II INTACT***	19,09	\pm	0,22		0,24	0,42
III	20,27	\pm	0,66		1,74	6,63
IV FRACT	20,30*	\pm	0,46	($p < 0,05$)	2,49	6,79
IV INTACT	21,89*	\pm	0,75	($p < 0,05$)	3,84	15,15
V FRACT	20,17*	\pm	0,35	($p < 0,05$)	2,69	6,01

Продолжение табл. 30

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
V INTACT	22,01*	±	0,47	(p<0,05)	5,64	15,78
VI FRACT	20,16*	±	0,35	(p<0,05)	2,67	6,05
VI INTACT	22,01*	±	0,47	(p<0,05)	5,64	15,78
VII	20,34*	±	0,47	(p<0,05)	2,50	7,00
VIII FRACT'	19,93	±	0,50		1,65	4,84
VIII INTACT	22,03*	±	0,66	(p<0,05)	4,28	15,84
* (p<0,05); ** FRACT – на стороне перелома; *** INTACT – на интактной стороне						

Из приведенной таблицы 30 видно, что в большинстве экспериментальных групп, этот морфометрический показатель имел статистически значимые отличия от контрольных значений. При этом размеры мышечного волокна были больше по отношению к контрольной группе, кроме мышечных волокон на травмированной конечности во II экспериментальной группе, где этот показатель был меньше на 3,26%. Максимальное увеличение диаметра мышечного волокна поперечнополосатой мускулатуры было отмечено в группах, где животным внутрижелудочно вводили метионин. Соответственно в III и VII экспериментальных группах этот показатель был больше по отношению к контролю на 6,63% и 7% соответственно. Интересно отметить, что в группах, где формировали перелом и одновременно вводили внутрижелудочно метионин, диаметр мышечного волокна значительно превышал контрольные значения на неповрежденной конечности. Так, в IV и V группах диаметр мышечного волокна на интактной конечности был увеличен по отношению к контролю на 15,15% и 15,78% соответственно. Очевидно, само введение метионина способствует гипертрофии мышечных волокон. А более значимые изменения на интактных конечностях в группах животных, получавших метионин на фоне имевшего места перелома, может быть объяснено тем, что на интактную конечность возлагалась

большая физическая нагрузка в период консолидации перелома голени у травмированного животного. Для наглядности выявленные морфометрические изменения приведены в графическом виде на рисунке 40.

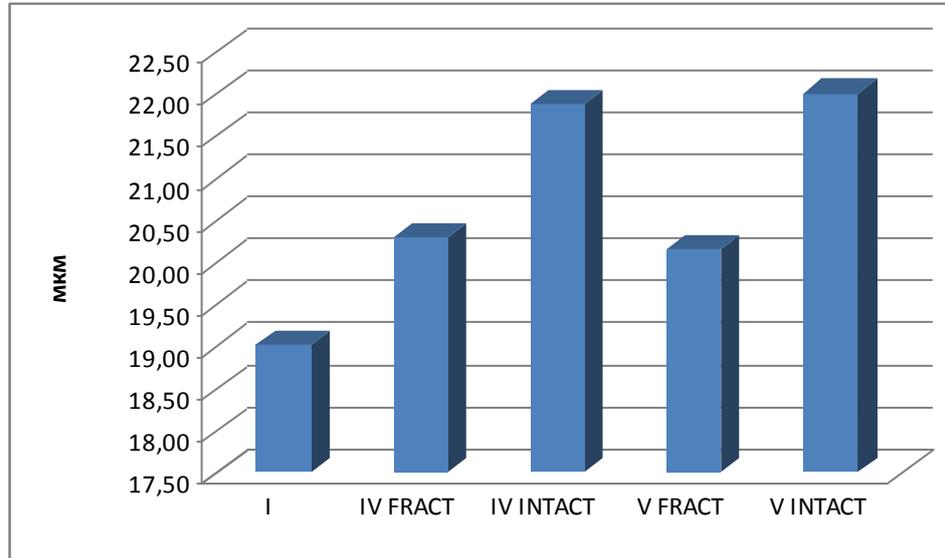


Рис. 40. Минимальный диаметр мышечного волокна задней конечности экспериментальных животных I, IV и V групп (в мкм)

Коэффициент корреляции между парными конечностями в IV и V группах составил соответственно 0,55 и 0,24. Однако объяснение гипертрофии мышечного волокна лишь за счет увеличения физической нагрузки вряд ли может считаться полным. Как контраргумент, в VIII группе, где животным в течение 1 месяца вводили метионин, а затем формировали перелом и через сутки после формирования перелома выводили из эксперимента, так же зафиксировано увеличение размеров мышечного волокна (мин диаметр). Этот показатель на травмированной конечности был увеличен по отношению к контролю на 4,84%, а на интактной конечности на 15,89%. В то же время отсутствие каких-либо значимых изменений данного показателя во II группе может быть объяснено тем фактом, что острый период травматической болезни в данном эксперименте был уже завершен.

Что же касается максимального диаметра мышечного волокна в экспериментальных группах, то этот показатель превышал контрольные значения

во всех экспериментальных группах с достоверными статистическими различиями во II, IV, V, VI, VIII экспериментальных группах (таблица 31, рисунок 41).

Таблица 31

Морфометрические значения максимального диаметра мышечного волокна в экспериментальных группах (в мкм), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	34,35	±	0,45			
II FRACT	38,83*	±	0,78	(p<0,05)	4,98	13,04
II INTACT	34,71	±	0,44		0,57	1,05
III	34,88	±	0,51		0,78	1,54
IV FRACT	37,19	±	1,57		1,74	8,27
IV INTACT	36,9*	±	1,18	(p<0,05)	2,02	7,42
V FRACT	36,24*	±	0,79	(p<0,05)	2,08	5,50
V INTACT	36,63*	±	0,74	(p<0,05)	2,63	6,64
VI FRACT	36,24*	±	0,79	(p<0,05)	2,08	5,50
VI INTACT	36,63*	±	0,74	(p<0,05)	2,63	6,64
VII	35,48	±	0,49		1,70	3,29
VIII FRACT'	36,29	±	1,02		1,74	5,65
VIII INTACT	37,36*	±	0,54	(p<0,05)	4,28	8,76

Необходимо отметить, что наибольший диаметр (макс) мышечного волокна был во II экспериментальной группе на травмированной стороне и по отношению к значениям контрольной группы показатель увеличен на 13,04% (p<0,05). Стоит обратить внимание на тот факт, что максимальный размер мышечного волокна был больше на интактной конечности по сравнению с травмированной для животных, которым вводили метионин. Таким образом, отмечено увеличение как минимального, так и максимального диаметров мышечного волокна при введении метионина экспериментальным животным.

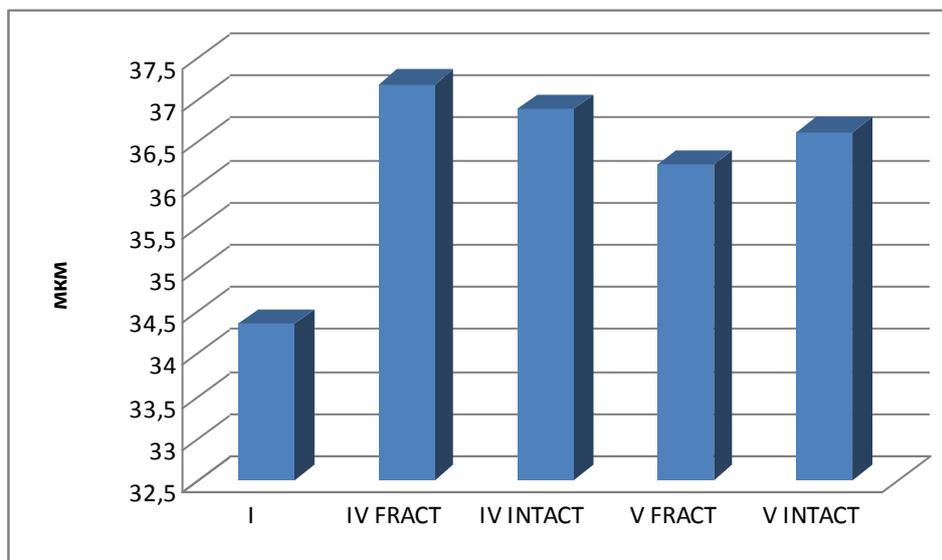


Рис. 41. Максимальный диаметр мышечного волокна задней конечности экспериментальных животных I, IV и V групп (в мкм)

Надо полагать, что гипертрофия мышечного волокна может быть связана с гипертрофией самого ядра клетки миоцита. Поэтому был измерен и сам диаметр ядра. Во всех экспериментальных группах происходило увеличение диаметра ядра миоцита, что представлено в таблице 32.

Таблица 32

Морфометрические показатели диаметра ядра миоцита в экспериментальных группах, $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	4,05	±	0,04			
II FRACT	4,40*	±	0,11	(p<0,05)	2,99	8,64
II INTACT	4,15	±	0,04		1,77	2,47
III	4,53*	±	0,10	(p<0,05)	4,46	11,85
IV FRACT	4,92*	±	0,06	(p<0,05)	12,06	21,48
IV INTACT	4,86*	±	0,15	(p<0,05)	5,22	20,00
V FRACT	4,91*	±	0,05	(p<0,05)	13,43	21,23

Продолжение табл. 32

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
				(p<0,05)		
V INTACT	4,75*	±	0,09	(p<0,05)	7,11	17,28
VI FRACT	4,91*	±	0,05	(p<0,05)	13,43	21,23
VI INTACT	4,75*	±	0,09	(p<0,05)	7,11	17,28
VII	4,51*	±	0,07	(p<0,05)	5,71	11,36
VIII FRACT	4,96*	±	0,07	(p<0,05)	11,29	22,47
VIII INTACT	4,90*	±	0,08	(p<0,05)	9,50	20,99

Максимальное увеличение диаметра ядра миоцита установлено в IV, V и VIII группах на травмированной конечности, где его значение по отношению к контролю было увеличено на 21,48%, 21,23% и 22,47% соответственно. Стоит отметить, что размеры ядра миоцита на травмированной конечности в этих группах были больше, по сравнению с интактной, что представлено на рисунке 42.

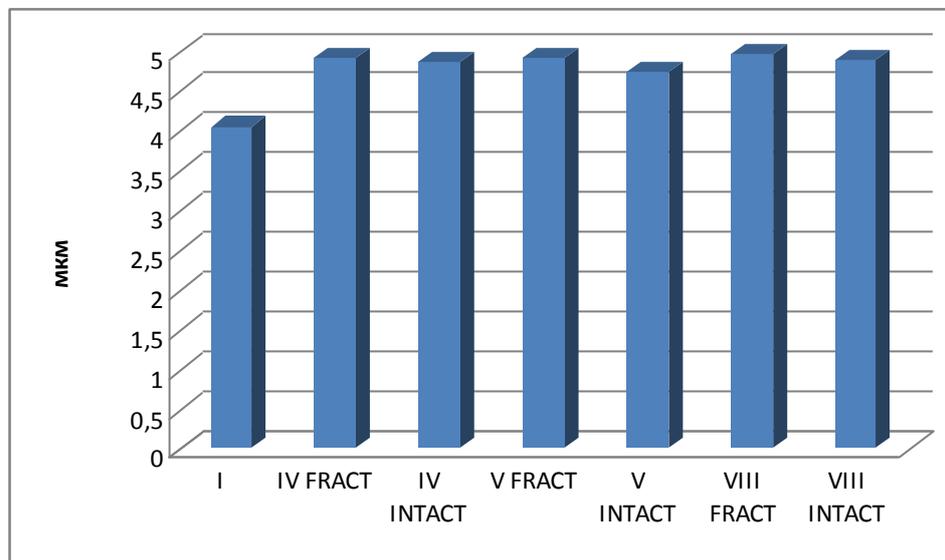


Рис. 42. Диаметр ядра миоцита в экспериментальных группах I, IV, V, VIII (в МКМ)

Анализируя полученные данные в отношении максимального и минимального диаметров мышечного волокна и диаметра ядра миоцита, был

введен интегративный коэффициент – отношение диаметра мышечного волокна к диаметру миоцита. Полученные значения отображены в таблице 33.

Таблица 33

Значение интегративного показателя – отношение диаметра мышечного волокна к диаметру миоцита (усл ед.), $M \pm m$

ДМВ мин/ДЯМ					
Экспериментальная группа	Среднее значение	Ошибка среднего	t-критерий	Изменение коэффициента в % по отношению к контрольной группе (I)	
I	4,71	± 0,08			
II FRACT	4,21*	± 0,10	3,90 (p<0,05)		-10,62
II INTACT	4,61	± 0,08	0,88		-2,12
III	4,49	± 0,14	1,36		-4,67
IV FRACT	4,13*	± 0,09	4,82 (p<0,05)		-12,31
IV INTACT	4,52	± 0,14	1,18		-4,03
V FRACT	4,11*	± 0,07	5,64 (p<0,05)		-12,74
V INTACT	4,66	± 0,12	0,35		-1,06
VI FRACT	4,11*	± 0,07	5,64 (p<0,05)		-12,74
VI INTACT	4,66	± 0,12	0,35		-1,06
VII	4,52	± 0,10	1,48		-4,03
VIII FRACT	4,03*	± 0,11	5,00 (p<0,05)		-14,44
VIII INTACT	4,50	± 0,13	1,38		-4,46
ДМВ макс/ДЯМ					
I	8,50	± 0,14			
II FRACT	8,87	± 0,20	1,52		4,35
II INTACT	8,37	± 0,14	0,66		-1,53
III	7,74*	± 0,16	3,57 (p<0,05)		-8,94
IV FRACT	7,54*	± 0,26	3,25 (p<0,05)		-11,29
IV INTACT	7,64*	± 0,22	3,30 (p<0,05)		-10,12
V FRACT	7,39*	± 0,15	5,41 (p<0,05)		-13,06
V INTACT	7,75*	± 0,19	3,18 (p<0,05)		-8,82
VI FRACT	7,38*	± 0,14	5,66 (p<0,05)		-13,18
VI INTACT	7,75*	± 0,19	3,18 (p<0,05)		-8,82
VII	7,89*	± 0,11	3,43 (p<0,05)		-7,18
VIII FRACT	7,31*	± 0,17	5,40 (p<0,05)		-14,00
VIII INTACT	7,64*	± 0,11	4,83 (p<0,05)		-10,12

Во всех экспериментальных группах установлено снижение этого интегративного показателя по отношению к контрольным значениям за исключением коэффициента соотношения максимального диаметра миоцита к ядру миоцита во II экспериментальной группе на травмированной конечности.

Цифровые значения диаметра капилляра в экспериментальных группах представлены в таблице 34.

Таблица 34

Диаметр капилляров в экспериментальных группах (в мкм), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	10,01	±	0,16			
II FRACT	14,41*	±	0,42	(p<0,05)	9,79	43,95
II INTACT	11,00*	±	0,16	(p<0,05)	4,38	9,89
III	8,61*	±	0,46	(p<0,05)	2,87	-13,98
IV FRACT	10,77	±	0,52		1,40	7,59
IV INTACT	8,26*	±	0,38	(p<0,05)	4,24	-17,48
V FRACT	10,15	±	0,37		0,35	1,40
V INTACT	8,54*	±	0,28	(p<0,05)	4,56	-14,68
VI FRACT	10,15	±	0,37		0,35	1,40
VI INTACT	8,54*	±	0,28	(p<0,05)	4,56	-14,69
VII	9,05*	±	0,19	(p<0,05)	3,86	-9,59
VIII FRACT	9,05*	±	0,19	(p<0,05)	3,86	-9,59
VIII INTACT	11,90*	±	0,27	(p<0,05)	6,02	18,18

Наибольшее увеличение диаметра капилляров установлено в зоне травмирования во II экспериментальной группе спустя две недели после сформированного перелома, где значение этого показателя было больше по отношению к контролю на 43,95% (p<0,05). В то время как спустя сутки после формирования перелома диаметр капилляров был также увеличен по отношению к контрольной группе всего лишь на 1,40%, и это увеличение не носило статистически значимое различие. При содержании животных на метиониновой

диете, способствующей увеличению концентрации гомоцистеина в плазме крови, к концу 4-й недели эксперимента диаметр капилляров был уменьшен на 9,59% ($p < 0,05$) по отношению к контролю. Тем не менее, при увеличении срока эксперимента до 6-ти недель, диаметр капилляра был сужен уже на 13,98% ($p < 0,05$). В условиях метиониновой диеты (4 недели) при формировании перелома, на травмированной конечности установлено увеличение диаметра капилляров на 1,4%, а на интактной конечности, напротив, уменьшение диаметра на 14,68% ($p < 0,05$). В IV группе при увеличении сроков введения метионина и давности формирования перелома отмечена та же динамика: на травмированной конечности диаметр капилляра был увеличен на 7,59%, а на интактной конечности наоборот снижен на 17,48%. Различия в диаметрах капилляров экспериментальных групп представлены на рисунке 43.

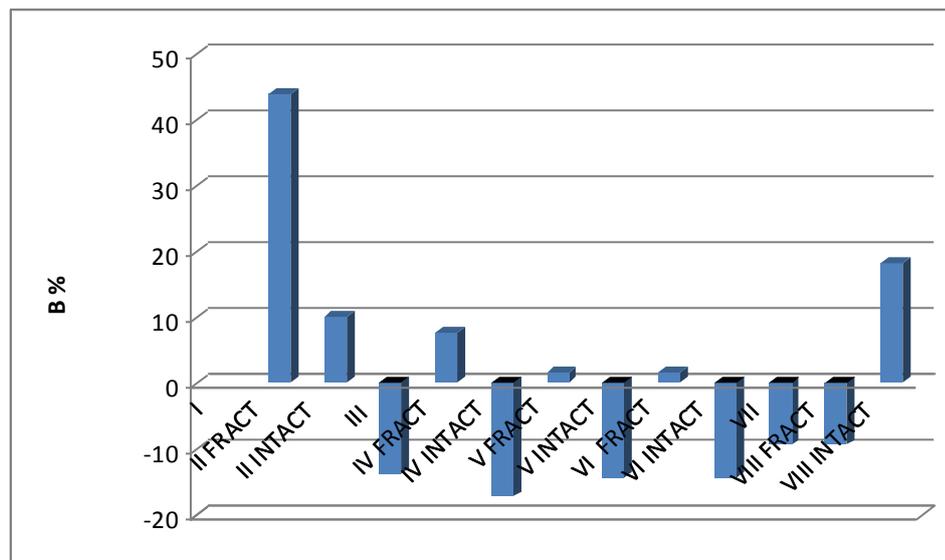


Рис. 43. Изменение диаметра капилляров конечностей в экспериментальных группах II-VIII по отношению к контрольной группе животных (в %)

В то же время в IV, V, VIII группах отмечена однотипная картина, несмотря на различную длительность эксперимента: на травмированной конечности происходит увеличение диаметра капилляра, а на интактной - уменьшение, точно так же как и в группах, где лишь вводили метионин – III и VII. Данная закономерность не исключает предположения, что введение метионина способствует уменьшению диаметра капилляра, а механическое воздействие

приводит к его увеличению. При травмировании конечности в условиях метиониновой диеты в зоне травмы установлено увеличение диаметра капилляров, а на противоположной интактной конечности, наоборот, - их сужение.

Результаты морфометрического исследования толщины стенки капилляров представлены в следующей таблице 35.

Таблица 35

Морфометрические показатели толщины стенки капилляров (в мкм), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	3,17	±	0,06			
II FRACT	3,10	±	0,04		0,97	-2,21
II INTACT	3,41*	±	0,06	(p<0,05)	2,83	7,57
III	3,42*	±	0,07	(p<0,05)	2,71	7,89
IV FRACT	3,49*	±	0,12	(p<0,05)	2,39	10,09
IV INTACT	3,17	±	0,11		0,00	0,00
V FRACT	3,45*	±	0,10	(p<0,05)	2,40	8,83
V INTACT	3,19	±	0,06		0,24	0,63
VI FRACT	3,45*	±	0,10	(p<0,05)	2,40	8,83
VI INTACT	3,19	±	0,06		0,24	0,63
VII	3,32*	±	0,04	(p<0,05)	2,08	4,73
VIII FRACT	3,19	±	0,05		0,26	0,63
VIII INTACT	2,95*	±	0,06	(p<0,05)	2,59	-6,94

Спустя сутки после формирования перелома (VI группа) отмечается утолщение стенки капилляра на 8,83% (p<0,05), ко второй неделе с момента сформированного перелома (группа II) толщина стенки, наоборот, была меньше по отношению к контролю на 2,21%, хотя стоит отметить, что это изменение не носило статистически значимого различия. В условиях метиониновой диеты (III и VII группы) происходит утолщение стенки капилляра на 7,89% и 4,73% соответственно. В группах же IV, V, VIII на травмированной конечности происходит увеличение толщины стенки капилляра на 10,09%, 8,83% и 0,63%

соответственно, в то время как на интактной конечности (по всей видимости, из-за различных сроков эксперимента) выявлена разнонаправленная картина. Именно спустя сутки после травмы (VIII группа) на интактной конечности толщина стенки капилляров была меньше на 6,94% ($p < 0,05$) по отношению к контролю, в то время как в IV и V группах значения практически не отличались от контрольных цифр.

Характеризуя толщину эндотелиальных клеток капилляров, надо отметить, что спустя сутки после формирования перелома толщина эндотелия была уменьшена на 6,7%, в то время как на интактной конечности каких-либо значимых изменений по отношению к контролю не отмечено. При увеличении срока эксперимента до 2-х недель установлено увеличение размеров эндотелиальных клеток на 12,05% ($p < 0,05$), и по-прежнему на интактной конечности каких-либо значимых различий не выявлено. В экспериментальных группах, где подопытным животным вводили метионин (III и VII группы) в течение 4-х и 6-ти недель, толщина эндотелия была сопоставима с контрольными значениями. При формировании перелома в группах животных, находившихся на метиониновой диете, спустя сутки после травмы толщина эндотелия статистически достоверна была больше по отношению к контрольной группе в области травмированной конечности на 4,02% ($p < 0,05$) и на 3,57% в зоне интактной конечности ($p < 0,05$). При увеличении длительности эксперимента (IV группа) с момента формирования перелома установлена противоположная закономерность – снижение показателя толщины эндотелия капилляров на 8,93% ($p < 0,05$) по отношению к контролю в области травмированной конечности и практически отсутствие различий в зоне интактной конечности. Морфометрические значения толщины эндотелия капилляров указаны в таблице 36.

Морфометрические показатели толщины эндотелия капилляров (в мкм),

M±m

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	2,24	±	0,02			
II FRACT	2,51*	±	0,03	(p<0,05)	7,49	12,05
II INTACT	2,29	±	0,03		1,39	2,23
III	2,23	±	0,02		0,35	-0,45
IV FRACT	2,04*	±	0,05	(p<0,05)	3,71	-8,93
IV INTACT	2,22	±	0,05		0,37	-0,89
V FRACT	2,09*	±	0,03	(p<0,05)	4,16	-6,7
V INTACT	2,22	±	0,03		0,55	-0,89
VI FRACT	2,09*	±	0,03	(p<0,05)	4,16	-6,7
VI INTACT	2,22	±	0,03		0,55	-0,89
VII	2,23	±	0,01		0,45	-0,45
VIII FRACT	2,33*	±	0,03	(p<0,05)	2,50	4,02
VIII INTACT	2,32*	±	0,03	(p<0,05)	2,22	3,57

В полученных морфометрических данных толщины эндотелия капилляров не найдено какой-либо закономерности при воздействии механической травмы либо увеличенного уровня гомоцистеина, либо в сочетании причиненного повреждения и повышенного уровня гомоцистеина. Данный факт позволяет говорить о том, что изолированно этот морфометрический показатель не может быть использован в качестве морфологического маркера.

При анализе размеров диаметра вен задней конечности экспериментальных животных было установлено, что при формировании перелома спустя сутки после травмы происходит увеличение диаметра на 15,15% (p<0,05) по отношению к контролю, в то время как на противоположной интактной конечности диаметр вены сопоставим с контрольными значениями. Ко второй неделе эксперимента

диаметр вены был еще увеличен по сравнению с контролем на 3,87%, однако это увеличение не было статистически значимым. На интактной конечности диаметр вены не отличался от контрольных цифр. В группах животных с повышенным содержанием в плазме крови гомоцистеина диаметр вены был больше на 10,01% и 10,20% соответственно ($p<0,05$) в III и VII экспериментальных группах. В «смешанных группах» на первые сутки после формирования перелома установлено увеличение диаметра вены в области травмированной конечности на 19,76% и в зоне интактной конечности на 16,21% ($p<0,05$) (VIII группа). Такая же закономерность отмечена и при увеличении срока эксперимента до двух недель со дня формирования перелома. Исключение составила V группа, где в области интактной конечности диаметр вен был такой же, как и в контроле. Результаты морфометрии диаметра вен задней конечности в экспериментальных группах представлены в таблице 37.

Таблица 37

Морфометрические показатели диаметра вен в экспериментальных группах (мкм), $M\pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	31,28	±	0,36			
II FRACT	32,49	±	0,58		1,77	3,87
II INTACT	31,05	±	0,38		0,44	-0,74
III	34,41*	±	0,81	($p<0,05$)	3,53	10,01
IV FRACT	34,85*	±	1,21	($p<0,05$)	2,83	11,41
IV INTACT	35,11*	±	1,95	($p<0,05$)	1,93	12,24
V FRACT	36,02*	±	0,84	($p<0,05$)	5,19	15,15
V INTACT	31,39	±	0,58		0,16	0,35
VI FRACT	36,02*	±	0,84	($p<0,05$)	5,19	15,15
VI INTACT	31,39	±	0,58		0,16	0,35
VII	34,47*	±	0,72	($p<0,05$)	3,96	10,20
VIII FRACT	37,46*	±	0,78	($p<0,05$)	7,19	19,76
VIII INTACT	36,35*	±	0,68	($p<0,05$)	6,59	16,21

В группах экспериментальных животных, где был сформирован перелом костей голени (VI и II группы) отмечено утолщение стенки вен как на поврежденной, так и на неповрежденной конечности. У животных, которые находились на метиониновой диете, также установлено утолщение стенки вены. Подобную закономерность наблюдали и в смешанных группах. Все полученные результаты носили статистически значимые различия по отношению к контрольной группе. Результаты морфометрии толщины стенки вен представлены в таблице 38.

Таблица 38

Морфометрические показатели толщины стенки вены в
экспериментальных группах (в мкм), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	4,19	±	0,04			
II FRACT	7,49*	±	0,06	(p<0,05)	45,76	78,76
II INTACT	5,67*	±	0,13	(p<0,05)	10,88	35,32
III	6,33*	±	0,14	(p<0,05)	14,70	51,07
IV FRACT	6,71*	±	0,31	(p<0,05)	8,06	60,14
IV INTACT	5,85*	±	0,33	(p<0,05)	4,99	39,62
V FRACT	6,58*	±	0,25	(p<0,05)	9,44	57,04
V INTACT	6,07*	±	0,17	(p<0,05)	10,76	44,87
VI FRACT	6,58*	±	0,25	(p<0,05)	9,44	57,04
VI INTACT	6,07*	±	0,17	(p<0,05)	10,76	44,87
VII	6,08*	±	0,08	(p<0,05)	21,13	45,11
VIII FRACT	7,21*	±	0,11	(p<0,05)	25,80	72,08
VIII INTACT	6,16*	±	0,11	(p<0,05)	16,83	47,02

При оценке толщины эндотелия вен в группах, подвергшихся однократному механическому воздействию, установлено, что на первые сутки после травмы толщина эндотелия превышала значения в контрольной группе на 63,09% (p<0,05), а на интактной конечности в этой же группе толщина эндотелия была больше

контрольных значений на 29,61% ($p<0,05$). При увеличении срока эксперимента до двух недель (II группа) было отмечено увеличение толщины эндотелия в области травмированной конечности на 75,54% ($p<0,05$), в то время как в зоне интактной конечности каких-либо различий выявлено не было. В тоже время, при введении животным метионина установлено увеличение толщины эндотелия в экспериментальных группах на 48,50-59,23%. В «смешанных» группах при формировании перелома на фоне уже имеющейся гипергомоцистеинемии показатель толщины эндотелия также был повышен по отношению к контрольной группе животных, при этом в области травмирования толщина эндотелия была больше, чем в зоне интактной конечности. Результаты морфометрического исследования толщины эндотелия вен в экспериментальных группах представлены в таблице 39.

Таблица 39

Морфометрические показатели толщины эндотелия вен в экспериментальных группах (в мкм), $M\pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	2,33	±	0,02			
II FRACT	4,09*	±	0,05	($p<0,05$)	32,68	75,54
II INTACT	2,35	±	0,02		0,71	0,86
III	3,71*	±	0,12	($p<0,05$)	11,34	59,23
IV FRACT	3,40*	±	0,18	($p<0,05$)	5,91	45,92
IV INTACT	3,45*	±	0,29	($p<0,05$)	3,85	48,07
V FRACT	3,80*	±	0,09	($p<0,05$)	15,94	63,09
V INTACT	3,02*	±	0,08	($p<0,05$)	8,37	29,61
VI FRACT	3,80*	±	0,09	($p<0,05$)	15,94	63,09
VI INTACT	3,02*	±	0,08	($p<0,05$)	8,37	29,61
VII	3,46*	±	0,09	($p<0,05$)	12,26	48,50
VIII FRACT	3,82*	±	0,06	($p<0,05$)	23,56	63,95
VIII INTACT	3,17*	±	0,08	($p<0,05$)	10,19	36,05

При измерении диаметра артерий было установлено, что на первые сутки после сформированного перелома в эксперименте отмечали сужение артерии в области травмирования на 2,25%, однако эти различия не носили статистически значимых различий по отношению к контролю. При увеличении срока эксперимента до двух недель в области травмирования диаметр артерии уже практически не отличался от диаметра в контрольной группе животных, по крайней мере, различия были в пределах погрешности эксперимента. При введении метионина животным установлено сужение просвета артерий конечности на 14,99-17,25% ($p < 0,05$). При формировании перелома на фоне гипергомоцистеинемии в первые сутки после травмы отмечается увеличение диаметра артерий на 10,84% ($p < 0,05$), притом, что при нормальном уровне гомоцистеина установлено сужение диаметра сосуда. При увеличении срока эксперимента до двух недель после сформированного перелома на фоне гипергомоцистеинемии в области травмирования каких-либо статистически значимых изменений со стороны диаметра артерий отмечено не было. Тем не менее, на интактной конечности диаметр сосудов был меньше по отношению к контрольному значению на 14,64-18,6% ($p < 0,05$) соответственно в IV и V группах. Результаты морфометрического исследования диаметра артерий в экспериментальных группах представлены в таблице 40.

Таблица 40

Морфометрические показатели диаметра артерий в экспериментальных группах (в мкм), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	25,28	±	0,21			
II FRACT	25,55	±	0,33		0,69	1,07
II INTACT	25,54	±	0,16		0,98	1,03
III	20,93*	±	0,46	($p < 0,05$)	8,60	-17,25

Продолжение табл. 40

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
IV FRACT	26,01	±	0,98		0,73	2,89
IV INTACT	20,58*	±	1,07	(p<0,05)	4,31	-18,60
V FRACT	24,71	±	0,56		0,95	-2,25
V INTACT	21,58*	±	0,33	(p<0,05)	9,46	-14,64
VI FRACT	24,71	±	0,56		0,95	-2,25
VI INTACT	21,58*	±	0,33	(p<0,05)	9,46	-14,64
VII	21,49*	±	0,33	(p<0,05)	9,69	-14,99
VIII FRACT	28,02*	±	0,61	(p<0,05)	4,25	10,84
VIII INTACT	21,20*	±	0,26	(p<0,05)	12,21	-16,14

Толщина стенки артерии при сформированном переломе к концу первых суток эксперимента (VI группа) в области травмирования уменьшилась на 29,17% (p<0,05) по отношению к контрольным значениям. При увеличении срока эксперимента до двух недель с момента сформированного перелома в области механического повреждения каких-либо различий обнаружено не было. При введении метионина происходит уменьшение толщины стенки артерии на 32,91% и 31,51% соответственно в группах VII и III. Для «смешанных» групп установлено в основном уменьшение толщины стенки артерии. Причем на интактной стороне эти изменения по отношению к контролю были выражены в большей степени. Результаты морфометрического исследования толщины стенки артерии в экспериментальных группах представлены в таблице 41.

При оценке количественного показателя толщины эндотелия артерий было установлено, что спустя сутки после сформированного перелома костей голени, в VI группе отмечено увеличение толщины эндотелия на 13,11% (p<0,05) в области травмированной конечности и на 7,96% в зоне интактной конечности (p<0,05). При увеличении срока эксперимента до двух недель с момента сформированного перелома толщина эндотелия в области травмированной конечности превышала

значения контрольной группы животных на 42,91% ($p<0,05$). В то время как на интактной конечности этот показатель был сравним с контрольными цифрами. В группе животных, получавших метионин в различные сроки от четырех до шести недель, толщина эндотелия, наоборот, была меньше по отношению к контролю на 5,19% и 3,46% соответственно в VII и III группах.

Таблица 41

Морфометрические показатели толщины стенки артерии в экспериментальных группах (в мкм), $M\pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	8,57	±	0,05			
II FRACT	8,50	±	0,04		1,09	-0,82
II INTACT	5,94*	±	0,07	($p<0,05$)	30,57	-30,69
III	5,87*	±	0,07	($p<0,05$)	31,39	-31,51
IV FRACT	8,28	±	0,41		0,70	-3,38
IV INTACT	6,17*	±	0,20	($p<0,05$)	11,64	-28,00
V FRACT	6,07*	±	0,15	($p<0,05$)	15,81	-29,17
V INTACT	6,09*	±	0,16	($p<0,05$)	14,79	-28,84
VI FRACT	6,07*	±	0,15	($p<0,05$)	15,81	-29,17
VI INTACT	6,09*	±	0,16	($p<0,05$)	14,79	-28,94
VII	5,75*	±	0,04	($p<0,05$)	44,04	-32,91
VIII FRACT	8,70	±	0,29		0,44	1,52
VIII INTACT	6,38*	±	0,11	($p<0,05$)	18,12	-25,55

Тем не менее, стоит обратить внимание, что эти различия по отношению к контрольным значениям не носили статистически значимого характера. В «смешанных» группах на травмированных конечностях было отмечено увеличение толщины эндотелия, в том числе и на интактной конечности в большинстве случаев. Значения толщины эндотелия артерий в экспериментальных группах представлены в таблице 42.

Морфометрические показатели толщины эндотелия артерий в экспериментальных группах (в мкм), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Среднее значение	±	Ошибка среднего	t-критерий		Изменения в % по отношению к контрольной группе (I)
I	2,89	±	0,04			
II FRACT	4,13*	±	0,11	(p<0,05)	10,59	42,91
II INTACT	2,89	±	0,03		0,00	0,00
III	2,79	±	0,05		1,56	-3,46
IV FRACT	3,25	±	0,20		1,77	12,46
IV INTACT	2,82	±	0,11		0,60	-2,42
V FRACT	3,26*	±	0,16	(p<0,05)	2,24	12,80
V INTACT	3,12*	±	0,05	(p<0,05)	3,59	7,96
VI FRACT	3,269*	±	0,16	(p<0,05)	2,30	13,11
VI INTACT	3,12*	±	0,05	(p<0,05)	3,59	7,96
VII	2,74*	±	0,05	(p<0,05)	2,34	-5,19
VIII FRACT	3,46*	±	0,14	(p<0,05)	3,91	19,72
VIII INTACT	3,09*	±	0,03	(p<0,05)	4,00	6,92

Таким образом, анализ качественных и количественных показателей морфологического исследования как в области травмирования, так и на интактной стороне свидетельствует о наличии существенных различий по отношению к контрольной группе как при изолированном механическом воздействии, так и при механическом воздействии в условиях умеренной гомоцистеинемии.

Надо полагать, что морфологические изменения связаны с нарушением окислительных процессов, что предполагает оценку системы перекисного окисления липидов в экспериментальных группах животных.

3.8. Состояние системы ПОЛ-антиоксиданты в экспериментальных группах животных

Кислородный метаболизм напрямую связан с адаптационной реакцией организма, ограничение или, наоборот, чрезмерный стресс-ответ, которой вызывает дисфункцию многих систем организма. При этом причина, вызвавшая данные изменения (механическая травма, выполненная операция и пр.), отступает на второй план. Поддержание адекватного системного и регионарного транспорта кислорода при патологических процессах является важной задачей самого организма. Поэтому при проведении экспериментальной части работы важным являлась оценка состояние системы ПОЛ при изолированном механическом воздействии в область конечности, при повышенном уровне гомоцистеина и в их сочетании.

При оценке уровня диеновых конъюгатов (ДК) (нмоль/мг липида) нами были получены следующие значения - в контрольной группе показатель ДК в плазме крови (ПК) был в пределах $4,3 \pm 0,45$ нмоль/мг липида. В группах, где было исключительно травматическое воздействие с формированием перелома костей голени, через один день после травмы уровень ДК в плазме крови составил $22,87 \pm 4,22$ нмоль/мг липида, а через две недели после сформированного перелома $3,03 \pm 0,19$ нмоль/мг липида. Таким образом, в первые сутки после нанесения травматического воздействия наблюдали увеличение содержания ДК в ПК с последующим снижением к 14 суткам эксперимента. Полученные различия в контрольной группе по сравнению с экспериментальными группами носили статистически значимые различия ($p < 0,05$).

В группах, где животные находились в условиях метиониновой диеты, к четвертой неделе эксперимента отмечена концентрация ДК в ПК $2,51 \pm 0,23$ нмоль/мг липида. К шестой неделе эксперимента данный показатель соответствовал $4,64 \pm 0,17$ нмоль/мг липида. Т.е. по сравнению с группой с травматическим воздействием наблюдали противоположную динамику: вначале снижение концентрации по отношению к контрольным значениям с

последующим повышением. Однако стоит отметить, что статистически значимые различия были лишь в группе с четырехнедельным экспериментом, продолжение эксперимента нивелировало данные статистические различия по сравнению с контрольными значениями.

В то же время в «смешанной» группе, где на фоне введения метионина экспериментальным животным был сформирован перелом костей голени, содержание ДК в ПК составила $1,78 \pm 0,13$ нмоль/мг липида после одних суток от сформированного перелома (VIII группа). Ко второй неделе после сформированного перелома содержание ДК в ПК составило $3,36 \pm 0,48$ нмоль/мг липида в V группе и - $3,41 \pm 0,44$ нмоль/мг липида в IV группе. Динамика изменений показателей в экспериментальных группах и группе контроля представлена на рисунке 44.

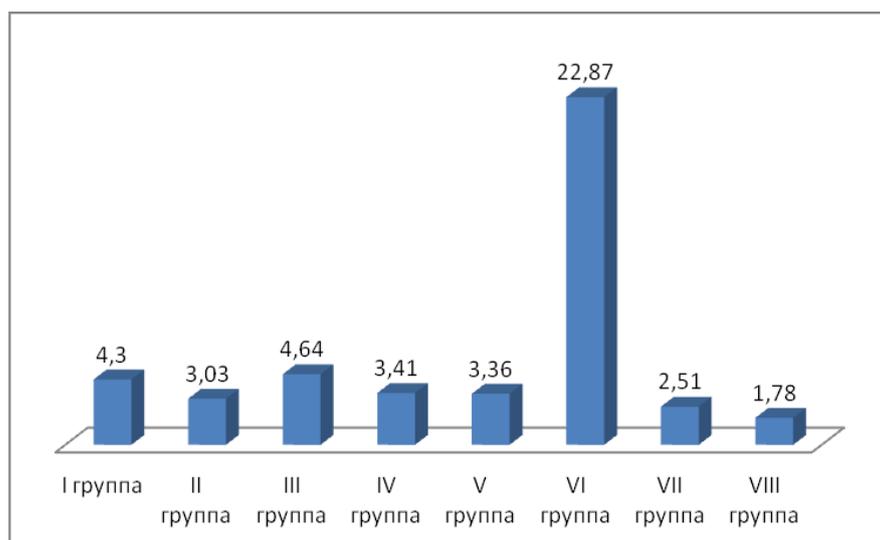


Рис. 44. Уровень содержания диеновых конъюгатов в плазме крови экспериментальных групп животных (нмоль/мг липида)

Для концентрации ДК в гемолизате (ГЕМ) были получены следующие значения: в I группе – $8,53 \pm 1,1$ нмоль/мг липида; во II группе – $8,8 \pm 1,14$ нмоль/мг липида; в III группе – $5,56 \pm 0,49$ нмоль/мг липида; в IV группе – $3,6 \pm 0,68$ нмоль/мг липида; в V группе – $6,08 \pm 1,16$ нмоль/мг липида; в VI группе – $16,11 \pm 4,28$ нмоль/мг липида; в VII группе – $3,56 \pm 0,42$ нмоль/мг липида; в VIII группе – $1,57 \pm 0,15$ нмоль/мг липида. Статистически значимые различия установлены в III,

IV, VI, VII, VIII группах ($p < 0,05$). В графическом изображении полученные результаты представлены на рисунке 45.

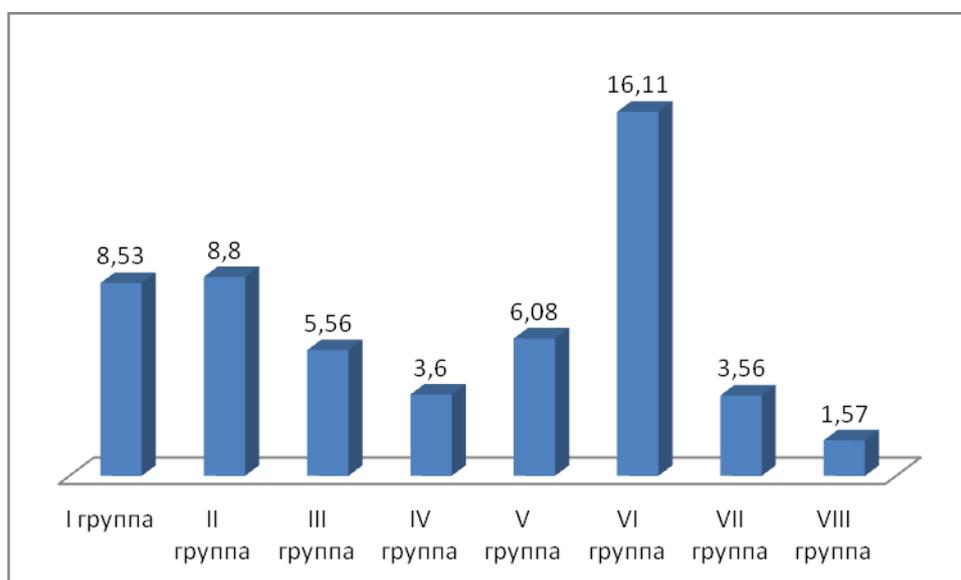


Рис. 45. Уровень содержания диеновых конъюгатов в гемолизате экспериментальных групп животных (нмоль/мг липида)

В отношении активности каталазы были получены следующие результаты: в плазме крови экспериментальных животных групп со сформированным переломом к первым суткам отмечали увеличение ее показателя относительно к контрольным значениям, что составило $5,95 \pm 0,25$ нмоль/мин*мг белка (VI группа) и $3,65 \pm 0,74$ нмоль/мин*мг белка (I группа) соответственно. Полученные значения носили статистически значимые различия ($p < 0,05$). Ко второй неделе эксперимента после причиненной механической травмы активность каталазы соответствовала $3,33 \pm 0,45$ нмоль/мин*мг белка. В группе животных, которые получали метионин в течение четырех и шести недель, значения активности каталазы составили соответственно $5,97 \pm 1,3$ нмоль/мин*мг белка и $5,66 \pm 0,32$ нмоль/мин*мг белка соответственно, однако статистически значимых различий между значениями по сравнению с контрольной группой получено не было. В экспериментальной группе животных, которым вводили метионин в течение четырех недель и был сформирован перелом костей голени, через сутки после

причинения механического повреждения активность каталазы практически не отличалась от контрольных значений и составила $3,77 \pm 0,25$ нмоль/мин*мг белка. В IV и V группах также не установлено статистически значимых различий, и активность каталазы соответствовала $2,5 \pm 0,39$ нмоль/мин*мг белка и $3,97 \pm 0,48$ нмоль/мин*мг белка.

В гемолизате эритроцитов активность каталазы также была статистически различима лишь в группе экспериментальных животных с механической травмой на первые сутки после ее причинения, где активность каталазы соответствовала $139,71 \pm 4,72$ нмоль/мин*мг гемоглобина против $94,22 \pm 6,08$ нмоль/мин*мг гемоглобина в контрольной группе животных. Во всех остальных экспериментальных группах, где животные получали только метионин, либо метионин, с последующим причинением механической травмы, данный показатель не имел статистически значимых различий по отношению к контролю. В графическом изображении полученные данные для активности каталазы представлены на рисунках 46, 47.

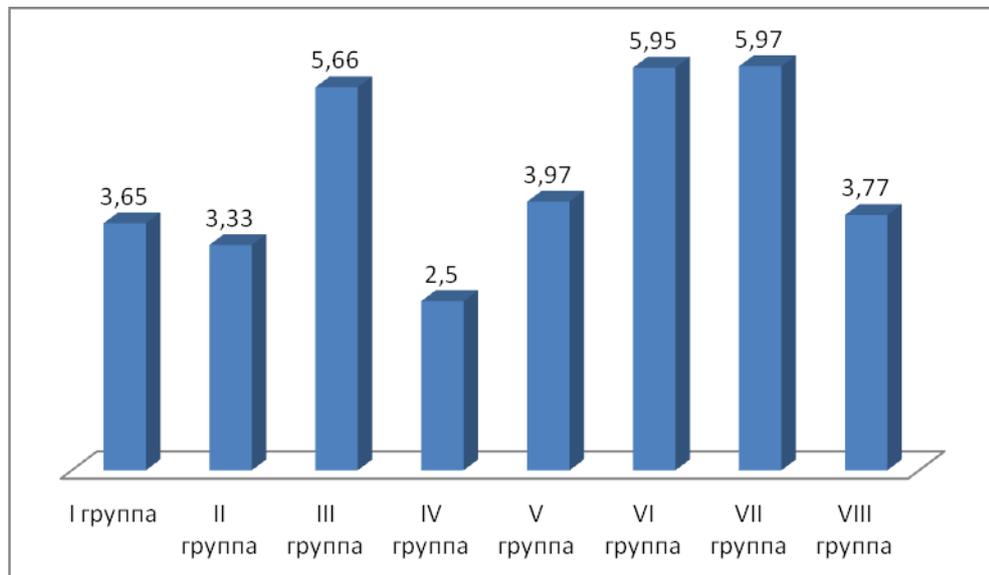


Рис. 46. Активность каталазы в плазме крови экспериментальных групп животных (нмоль/мин*мг белка)

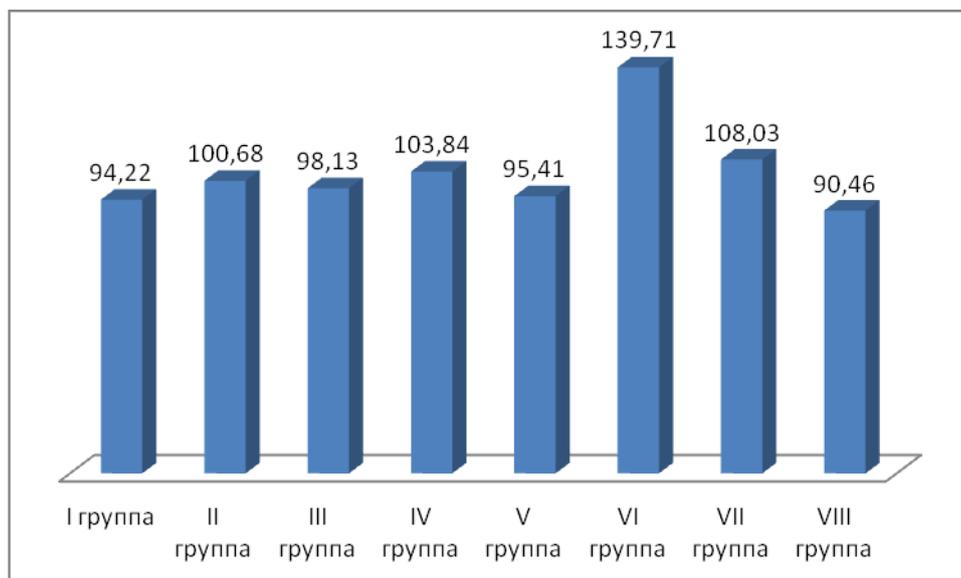


Рис. 47. Активность каталазы в гемолизате экспериментальных групп животных (нмоль/мин*мг гемоглобина)

Содержание МДА в плазме крови было статистически различимо по сравнению с контролем в группе животных, получавших метионин в течение четырех недель (VII группа), и значение составило $0,23 \pm 0,04$ нмоль/мг белка по сравнению со значением в контрольной группе животных $0,13 \pm 0,02$ нмоль/мг белка. Во всех остальных группах, несмотря на то, что разница в значении содержания МДА и имела место, но находилась в пределах погрешности эксперимента.

С другой стороны, в гемолизате эритроцитов экспериментальных животных содержание МДА было статистически значимо по отношению к контрольным значениям в III, IV, VI, VII группах, где значение МДА составило соответственно $0,5 \pm 0,02$ нмоль/мг гемоглобина, $1,0 \pm 0,06$ нмоль/мг гемоглобина, $0,51 \pm 0,02$ нмоль/мг гемоглобина и $1,05 \pm 0,12$ нмоль/мг гемоглобина. Полученные результаты для МДА представлены на рисунках 48 - 49.

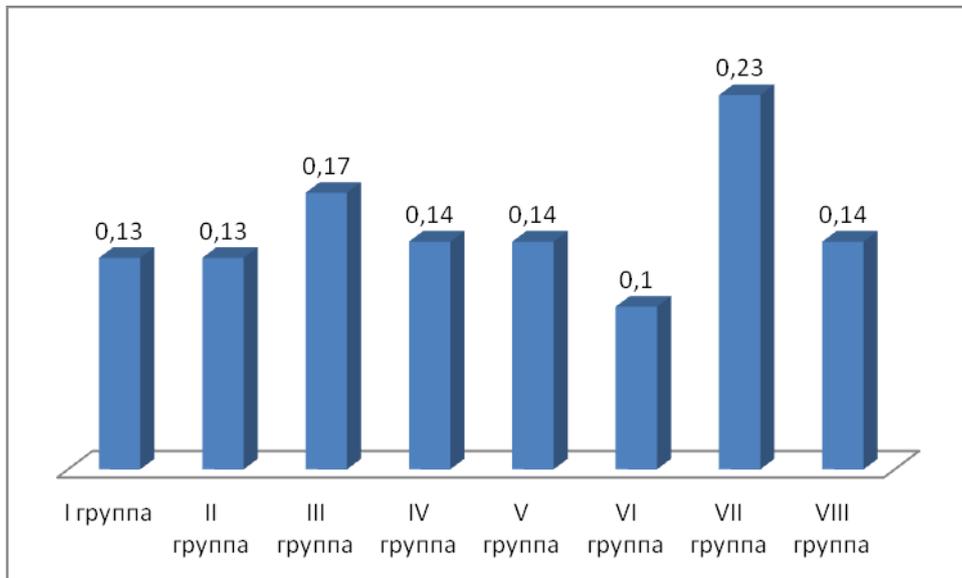


Рис. 48. Содержание малонового диальдегида в плазме крови экспериментальных групп животных (нмоль/мг белка)

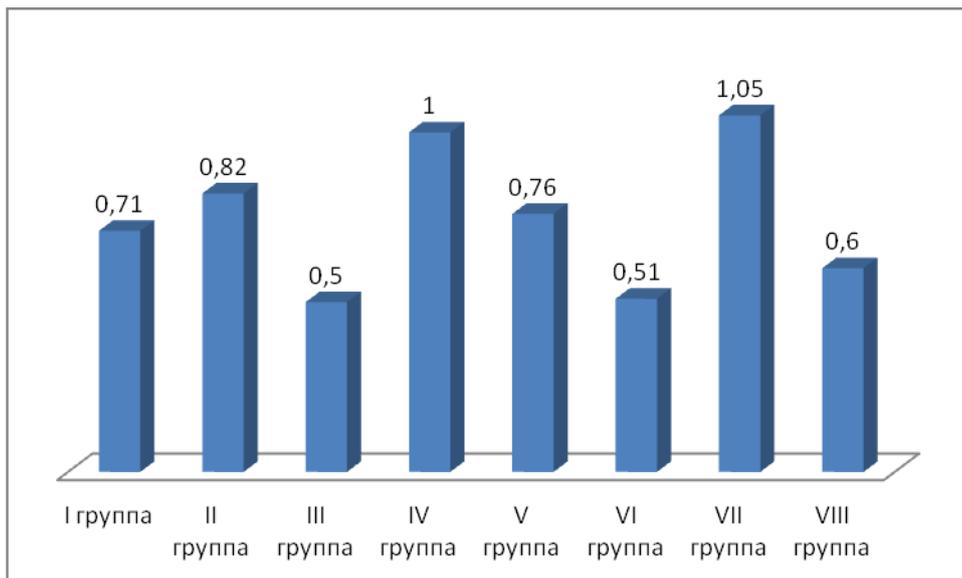


Рис. 49. Содержание малонового диальдегида в гемолизате экспериментальных групп животных (нмоль/мг гемоглобина)

Для шиффовых оснований (ШО) в плазме крови экспериментальных животных статистически значимые различия по отношению к контрольной группе были получены лишь в VI группе (первые сутки после сформированного перелома), где концентрация ШО составила $28,16 \pm 4,09$ о.е.фл./мг липида и по

отношению к контрольной группе была повышена в 6,85 раз. Во всех остальных экспериментальных группах концентрация ШО в плазме крови была примерно такая же, как и в контрольной группе и составляла значения в пределах $3,19 \pm 0,37$ о.е.фл./мг липида (II группа) – $6,85 \pm 0,23$ о.е.фл./мг липида (IV группа). Таким образом, введение в организм экспериментальных животных метионина и создание умеренно повышенной концентрации ГЦ не отражалось на данном биохимическом показателе. Тем не менее, в острый период травмы отмечено значительное увеличение концентрации ШО по отношению к интактным животным.

Определение концентрации ШО в гемолизате эритроцитов экспериментальных животных позволило получить следующие результаты: в VI группе, т.е. в острый период травмы содержание ШО было увеличено по отношению к контролю в 3,74 раза, и составило $72,11 \pm 20,39$ о.е.фл./мг липида ($p < 0,05$). Увеличение срока эксперимента до двух недель приводило к снижению уровня ШО в гемолизате до значений $14,13 \pm 2,15$ о.е.фл./мг липида и было в пределах погрешности эксперимента (концентрация ШО в контрольной группе – $19,29 \pm 4,78$ у о.е.фл./мг липида). Введение метионина в течение четырех недель привело к снижению содержания ШО в гемолизате до значений $4,88 \pm 0,59$ о.е./мг липида ($p < 0,05$). Увеличение срока введения метионина до шести недель способствовало повышению концентрации ШО до $5,33 \pm 0,43$ о.е.фл./мг липида. В «смешанных» экспериментальных группах, где животным вводили метионин и в дальнейшем был сформирован перелом костей голени, на первые сутки после травмы отмечено статистически значимое снижение содержания ШО до значений $2,53 \pm 0,11$ о.е.фл./мг липида. Увеличение срока эксперимента после механического воздействия до двух недель (V группа) привело к тому, что показатель соответствовал значению $8,33 \pm 1,67$ о.е.фл./мг липида и все же был ниже, чем в контрольной группе животных. В IV группе показатель был равен $5,92 \pm 0,49$ о.е.фл./мг липида ($p < 0,05$). Таким образом, в острый период травмы при нормальных уровнях гомоцистеина в плазме крови отмечено почти четырехкратное увеличение содержания ШО в гемолизате. Напротив, длительное

введение метионина и, как следствие, увеличение уровня гомоцистеина в плазме крови приводит к уменьшению концентрации ШО.

В «смешанных» экспериментальных группах на фоне увеличенной концентрации гомоцистеина при механическом воздействии отмечается уменьшение содержания ШО в гемолизате непосредственно после травмы с последующим медленным увеличением значения показателя в зависимости от срока сформированного перелома. При этом различия по отношению к контрольной группе были статистически значимыми ($p < 0,05$).

Для уровня СУА в плазме крови были отмечены статистически значимые различия в первые сутки после травматического воздействия (VI группа). Значения показателя были увеличены по отношению к контрольным цифрам в 2 раза и составили $0,46 \pm 0,03$ усл.ед./мин•мг белка, в то время как в I группе (контроль) уровень СУА составил $0,22 \pm 0,05$ усл.ед./мин•мг белка.

При введении метионина в течение шести недель (III группа) так же установлено увеличение СУА до значений $0,75 \pm 0,06$ усл.ед./мин•мг белка ($p < 0,05$). Во всех остальных экспериментальных группах статистически значимых различий в отношении уровня СУА в плазме крови животных выявлено не было.

В гемолизате эритроцитов уровень активности СОД на шестой неделе введения метионина был наоборот снижен по отношению к контрольным цифрам до значения $0,47 \pm 0,07$ усл.ед./мин•мг гемоглобина ($p < 0,05$). Однако в группе экспериментальных животных, где при той же длительности срока эксперимента вводили метионин и в последующем формировали перелом костей голени, было отмечено наоборот увеличение уровня СОД до $1,69 \pm 0,15$ усл.ед./мин•мг гемоглобина ($p < 0,05$). При сроке эксперимента в один день после травмирования конечности при введении метионина также установлено снижение активности СОД до уровня $0,48 \pm 0,09$ усл.ед./мин•мг гемоглобина ($p < 0,05$). Таким образом, острая фаза травмы достоверно не влияет на уровень СОД, в то время как длительное введение метионина способствует его снижению.

Анализ уровня GSH в гемолизате показал, что в острой фазе травмы отмечается увеличение содержания GSH по отношению к контролю. В VI группе

концентрация GSH составила $0,008 \pm 0,0004$ мкмоль/мг гемоглобина ($p < 0,05$). При увеличении срока эксперимента до двух недель содержание GSH составило уже $0,007 \pm 0,0004$ мкмоль/мг гемоглобина и практически соответствовало контрольным значениям.

Введение метионина в течение четырех и шести недель приводило к увеличению уровня GSH (значения составили $0,01 \pm 0,0007$ мкмоль/мг гемоглобина и $0,009 \pm 0,0003$ мкмоль/мг гемоглобина соответственно).

Наличие механического воздействия со сроком эксперимента в четыре недели и введением метионина в течение 6 недель (IV группа) так же привело к увеличению GSH до значений $0,012 \pm 0,0003$ мкмоль/мг гемоглобина. Полученные значения для GSH свидетельствуют о том, что как в острой фазе травмы, так и при хроническом эксперименте происходит увеличение его содержания.

Для внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) в плазме крови контрольной группы животных значения соответствовали $1,99 \pm 0,35$ мг/мл плазмы. Введение метионина в течение четырех недель приводило к снижению концентрации ВЭГ до $0,8 \pm 0,11$ мг/мл плазмы ($p < 0,05$). Еще меньшее значение установлено при том же сроке введения метионина на первые сутки после формирования перелома костей голени ($0,44 \pm 0,02$ мг/мл плазмы ($p < 0,05$)). В тоже время в VI группе (первые сутки после механической травмы) концентрация ВЭГ была равна $2,25 \pm 0,09$ мг/мл плазмы, что практически соответствовало контрольным значениям.

Таким образом, острый период самой травмы не влиял на изменение уровня внеэритроцитарного гемоглобина, в то время как на фоне умеренного повышения концентрации гомоцистеина происходило его снижение.

Динамика изменения концентрации СПА в плазме крови экспериментальных животных носила разнонаправленный характер в зависимости от срока и групп экспериментальных животных, которым вводили метионин. На четвертой неделе эксперимента концентрация СПА была снижена по сравнению с контролем и составила $3,42 \pm 0,34$ е.о.п./объем плазмы (VII группа, $p < 0,05$), в то время, как контрольные значения составили $5,41 \pm 0,85$ е.о.п./объем

плазмы. Увеличение длительности введения до шести недель (III группа), наоборот, приводило к увеличению концентрации СПА по отношению к контролю и соответствовала значениям $10,29 \pm 2,1$ е.о.п./объем плазмы ($p < 0,05$). Однако необходимо отметить, что введение метионина в течение шести недель со сформированным переломом за две недели до выведения животных из эксперимента (IV группа) дало примерно такие же значения, как и в VII группе – $3,42 \pm 0,34$ е.о.п./объем плазмы.

Для ГПО установлены статистически значимые различия в V и VII группах экспериментальных животных, где его уровень составил $2,62 \pm 0,19$ МЕ/мг гемоглобина и $2,24 \pm 0,39$ МЕ/мг гемоглобина соответственно, против контрольных значений – $1,72 \pm 0,24$ МЕ/мг гемоглобина.

Данные по всем анализируемым показателям системы ПОЛ-антиоксиданты представлены в сводной таблице 43.

Таблица 43

Значения показателей системы ПОЛ-антиоксиданты в экспериментальных группах животных, $M \pm m$

	I группа	II группа	III группа	IV группа
ДК в ПК (нмоль/мг липида)	4,3 ± 0,45	3,03* ± 0,19	4,64 ± 0,17	3,41 ± 0,44
ДК в ГЕМ (нмоль/мг липида)	8,53 ± 1,1	8,8 ± 1,14	5,56* ± 0,49	3,6* ± 0,68
Активность каталазы в ПК (нмоль /мин*мг белка)	3,65 ± 0,74	3,33 ± 0,45	5,66* ± 0,32	2,5 ± 0,39
Активность каталазы в ГЕМ (нмоль/мин*мг гемоглобина)	94,22 ± 6,08	100,68 ± 2,34	98,13 ± 5,65	103,84 ± 2,6
МДА в ПК (нмоль/мг белка)	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,006	0,14 ± 0,02
МДА в ГЕМ (нмоль/мг гемоглобина)	0,71 ± 0,05	0,82 ± 0,05	0,5* ± 0,02	1* ± 0,06
ШО в ПК (о.е.фл./мг липида)	4,11 ± 0,53	3,19 ± 0,37	4,56 ± 0,23	6,85 ± 1,45
ШО в ГЕМ (о.е.фл./мг липида)	19,29 ± 4,78	14,13 ± 2,15	5,33* ± 0,43	5,92* ± 0,49
СУА в ПК (у.е/мин*мг белка)	0,22 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,75* ± 0,06	0,28 ± 0,037
СОД в ГЕМ (у.е/мин*мг гемоглобина)	1,16 ± 0,16	1,51 ± 0,25	0,47* ± 0,07	1,69* ± 0,15
GSH в ГЕМ (мкмоль/мг гемоглобина)	0,006 ± 0,0006	0,007 ± 0,0004	0,009* ± 0,0003	0,01* ± 0,0005
СПА в ПК (е.о.п./объем плазмы)	5,41 ± 0,85	9,71 ± 2,73	10,29 ± 2,1	2,91* ± 0,49
ВЭГ в ПК (мг/мл плазмы)	1,99 ± 0,35	1,86 ± 0,22	3,03 ± 0,34	0,8* ± 0,11
ГПО в ГЕМ (МЕ/мг гемоглобина)	1,72 ± 0,24	1,87 ± 0,18	2,18 ± 0,06	1,78 ± 0,16
* p<0,05				

Продолжение табл. 43

	V группа	VI группа	VII группа	VIII группа
ДК в ПК (нмоль/мг липида)	3,36 ± 0,48	22,87* ± 4,22	2,51* ± 0,23	1,78* ± 0,13
ДК в ГЕМ (нмоль/мг липида)	6,08 ± 1,16	16,11* ± 4,28	3,56* ± 0,42	1,57* ± 0,15
Активность каталазы в ПК (нмоль /мин*мг белка)	3,97 ± 0,48	5,95* ± 0,25	5,97 ± 1,3	3,77 ± 0,25
Активность каталазы в ГЕМ (нмоль/мин*мг гемоглобина)	95,41 ± 6,06	139,71* ± 4,72	108,03* ± 3,03	90,46 ± 1,35
МДА в ПК (нмоль/мг белка)	0,14 ± 0,02	0,1 ± 0,005	0,23* ± 0,04	0,14 ± 0,005
МДА в ГЕМ (нмоль/мг гемоглобина)	0,76 ± 0,05	0,51* ± 0,02	1,05* ± 0,12	0,6 ± 0,03
ШО в ПК (о.е.фл./мг липида)	2,84 ± 0,34	28,16* ± 4,09	3,76 ± 0,17	4,2 ± 0,27
ШО в ГЕМ (о.е.фл./мг липида)	8,33 ± 1,67	72,11* ± 20,39	4,88* ± 0,59	2,53* ± 0,1
СУА в ПК (у.е/мин*мг белка)	0,15 ± 0,02	0,46* ± 0,03	0,28 ± 0,06	0,17 ± 0,009
СОД в ГЕМ (у.е/мин*мг гемоглобина)	0,93 ± 0,07	1,46 ± 0,21	1,42 ± 0,16	0,48* ± 0,09
GSH в ГЕМ (мкмоль/мг гемоглобина)	0,008 ± 0,0008	0,008* ± 0,0004	0,012* ± 0,0007	0,007 ± 0,0003
СПА в ПК (е.о.п./объем плазмы)	4,95 ± 0,64	7,81 ± 0,87	3,42* ± 0,34	6,51 ± 0,46
ВЭГ в ПК (мг/мл плазмы)	1,31 ± 0,26	2,25 ± 0,09	0,8* ± 0,11	0,44* ± 0,02
ГПО в ГЕМ (МЕ/мг гемоглобина)	2,62* ± 0,19	2,14 ± 0,34	2,24* ± 0,39	1,6 ± 0,04
* p<0,05				

3.9. Уровень экспрессии генов *NOS* (*NO*-синтаз) в экспериментальных группах животных

Результаты экспериментального исследования, изложенные в разделах посвященных морфологическим особенностям и состоянию системы перекисного окисления липидов на модели умеренной гомоцистеинемии, показали статистически значимые различия по сравнению с группой контроля. В частности, установлено изменение толщины эндотелия сосудов венозного и артериального русла, наличие антиоксидантного стресса в группах экспериментальных животных как с одной механической травмой, так и с механической травмой на фоне повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови. Таким образом, полученные экспериментальные данные не исключают наличие эндотелиальной дисфункции (ЭД).

Термин ЭД предполагает нарушение равновесия между веществами, синтезируемыми клетками эндотелия. При физиологической функции эндотелия химические реакции внутри эндотелиальных клеток сдвинуты в сторону обеспечения вазодилатации, антиоксидантного и антитромботического эффектов [J.V. Meigs, N. Rifai, 2004]. Во многом ЭД обусловлена нарушением экспрессии *NO*-синтаз. Поэтому экспериментальная часть работы включала себя и определение уровня экспрессии изоформ данного фермента.

Первоначально была исследована экспрессия всех трех типов *NO*-синтаз (*NOS1*, *NOS2*, *NOS3*).

Во всех экспериментальных группах экспрессия гена нейрональной *NO*-синтазы (*NOS1*) в большинстве проб была крайне низкой, а у части животных она вообще отсутствовала. Возможно, причина данных результатов обусловлена следовой экспрессией эндотелиоцитов, нейронов, которые могли попасть в кровь при декапитации экспериментальных животных.

Экспрессия гена эндотелиальной *NO*-синтазы (*NOS3*) в крови также установлена только у немногих опытных и контрольных животных.

Что же касается экспрессии гена индуцибельной *NO*-синтазы (*NOS2*), то в крови практически всех групп экспериментальных животных наблюдали

экспрессию этого гена, т.е. как в группах животных, подвергшихся механической травме, так и у животных, которым вводили внутривенно метионин.

В таблице 44 приведены результаты расчетов отношения числа копий референсной РНК гена *BACT* к числу копий мРНК (лейкоцитов крови) гена *NOS2*. Чем выше это соотношение, тем более низкий уровень экспрессии исследуемого гена (*NOS2*), и, соответственно, чем ниже числовое значение, приведенное в таблице, тем выше активность гена.

Таблица 44

Отношение числа копий мРНК (лейкоцитов крови) референсной РНК гена *BACT* к числу копий гена *NOS2* в контрольной и экспериментальных группах,

$M \pm m$

группа	M	±	m	изменения в %
I группа	334,29	±	43,93	
II группа	797,00*	±	165,46	138,42
III группа	631,50	±	207,28	88,91
IV группа	744,50*	±	143,58	122,71
V группа	1253,00*	±	232,34	274,83
VI группа	327,33	±	67,43	-2,08
VII группа	1012,46*	±	215,93	202,87
VIII группа	555,69	±	86,16	66,23
* (p<0,05)				

В группах с механической травмой (II и VI) достоверные отличия в уровне экспрессии гена *NOS2* были установлены лишь для II группы, где с момента причинения повреждения прошло две недели. В этой группе отмечали уменьшение уровня экспрессии гена *NOS2* примерно в 2,4 раза.

В экспериментальных группах животных, которым вводили внутривенно метионин, различия в экспрессии были достоверны лишь для срока эксперимента в четыре недели, где установлено уменьшение экспрессии гена *NOS2* по отношению к контролю на 202,87% (p<0,05).

В «смешанных» экспериментальных группах животных максимальные статистически достоверные изменения соответствовали сроку эксперимента в четыре недели с момента введения метионина и две недели от момента сформированного перелома костей голени подопытному животному.

Графическое выражение динамики уровня экспрессии гена в зависимости от экспериментальной группы представлено на рисунках 50 - 52.

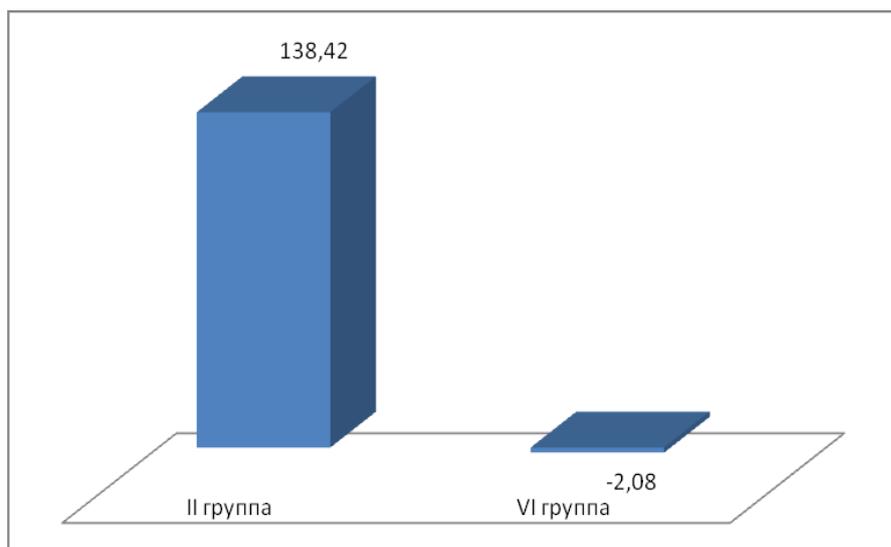


Рис. 50. Динамика экспрессии гена *NOS2* в экспериментальных группах животных. Изменение уровня экспрессии гена *NOS2* в экспериментальных группах животных с механической травмой

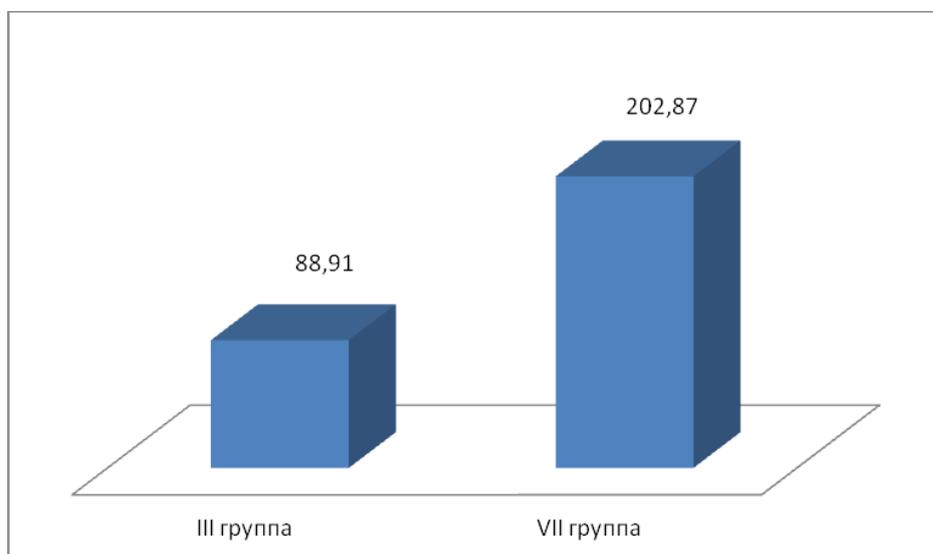


Рис. 51. Динамика экспрессии гена *NOS2* в экспериментальных группах животных. Изменение уровня экспрессии гена *NOS2* в экспериментальных группах животных, которым вводили метионин

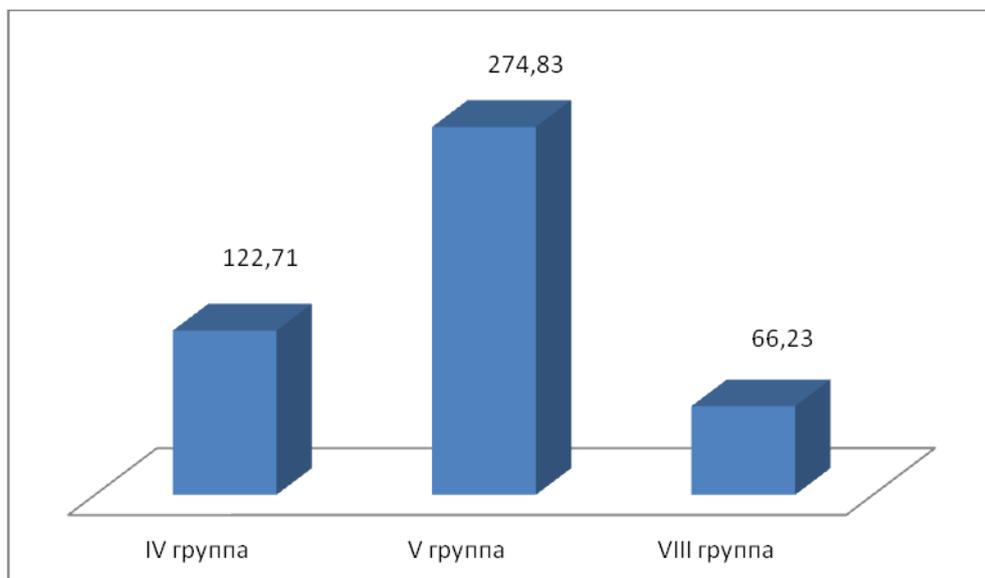


Рис. 52. Динамика экспрессии гена *NOS2* в экспериментальных группах животных. Изменение уровня экспрессии гена *NOS2* в экспериментальных группах животных с механической травмой на фоне введения метионина

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что уровни экспрессии генов *NOS1* и *NOS3* не носили в заданном эксперименте статистически значимые различия, и как следствие определения уровня экспрессии данных генов для оценки механического воздействия и повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови не информативны. В то же время были выявлены статистически значимые различия для уровня экспрессии гена *NOS2* при механической травме на фоне повышенного уровня гомоцистеина.

3.10. Анализ связи тромботических осложнений у потерпевших с механическими повреждениями и/или выполненным оперативным вмешательством

В предыдущих разделах работы была дана общая характеристика тромботическим осложнениям, встречающимся в практике судебно-медицинского эксперта. Было установлено, что одним из важных приобретенных факторов риска тромботических осложнений у потерпевших является его длительное

вынужденное положение. Проведенное генетическое типирование на предмет наличия мутаций и полиморфных аллелей в генах-кандидатах наследственной предрасположенности к тромбофилии выявило частую встречаемость полиморфизма в гене, ответственном за синтез ключевого фермента фолатного цикла – метилентетрагидрофолатредуктазы. Наличие полиморфного аллеля *677CT* в гене *MTHFR* способствует увеличению концентрации гомоцистеина в плазме крови у таких носителей. В свою очередь, сам гомоцистеин считается независимым фактором риска тромботических осложнений. Выполненное экспериментальное исследование позволило утверждать о наличии морфологических изменений в стенке сосуда, обусловленных не только причиненным ранее механическим повреждением, но и повышенным уровнем ГЦ. При этом морфология стенки сосуда носила качественно новые признаки при сочетании механической травмы и ГЦ. Все вышесказанное в совокупности свидетельствует о многофакторности тромбогенеза. Как следствие данного суждения, именно невозможность, а порой и нежелание судебно-медицинского эксперта учитывать многофакторный характер тромбогенеза при наличии механической травмы и/или выполненного оперативного вмешательства приводит к формированию экспертных выводов, не соответствующих требованиям полноты, всесторонности и обоснованности, а сами они (выводы) носят спорный и неубедительный характер. Поэтому в данном разделе приводятся экспертные наблюдения, анализирующие цепь последовательных событий: травма опорно-двигательного аппарата → оперативное вмешательство → развитие ТГВНК → фатальное осложнение в виде ТЭЛА.

Наблюдение № 1. Из материалов гражданского дела следовало, что представитель потерпевшего обратился в суд с иском к организации о признании несчастного случая связанным с производством, взыскании материального ущерба, страховых выплат, денежной компенсации морального вреда. Представители ответчика исковые требования не признали и потребовали проведение судебно-медицинской экспертизы для установления причинно-следственных взаимоотношений между полученной травмой и наступившей

смертью потерпевшего. По обстоятельствам травмы при выполнении разгрузочных работ потерпевший оступился, подвернул ногу и упал на пол участка, получив повреждения в виде закрытого оскольчатого перелома нижней трети правой большеберцовой кости со смещением костных отломков, закрытого перелома правой малоберцовой кости в верхней трети. Возраст потерпевшего – 35 лет, повышенного питания, массой 100 кг, рост 176 см. В анамнезе у него отмечалась «артериальная гипертензия 2 стадии, 2 степени, группа риска 2. ХСН 0». Через 45 минут после травмы он был доставлен в лечебное учреждение города и госпитализирован в хирургическое отделение, где в течение первых часов было выполнено оперативное вмешательство – наложение скелетного вытяжения за правую пяточную кость. Через сутки скелетное вытяжение было демонтировано, потерпевшему наложена задняя гипсовая повязка на правую нижнюю конечность до уровня верхней трети бедра, и он был переведен в областную клиническую больницу в травматологическое отделение без обоснования причины перевода. Условия транспортировки в областное учреждение в предоставленной копии экспертного документа отражены не были. В стационаре потерпевшему вновь было наложено скелетное вытяжение за правую пяточную кость и конечность уложена на шину Белера. Смещение костных отломков по оси было устранено в течение первых четырех суток с момента повторного наложения скелетного вытяжения. Консилиумом врачей было принято решение о ведении потерпевшего консервативным путем на скелетном вытяжении с его согласия, с последующим переводом в гипсовую повязку. На 13-е сутки пребывания в данном лечебном учреждении и соответственно на 15-е сутки после полученной травмы в 01:15 зафиксировано внезапное прекращение сердечной деятельности, реанимационные мероприятия безрезультатны, и была констатирована смерть потерпевшего в 02:00. Заключительный клинический диагноз: «закрытый оскольчатый перелом костей правой голени: большеберцовой в нижней трети, малоберцовой в верхней трети со смещением отломков. ТЭЛА. ОССН. Кардиогенный шок. Разрыв аневризмы сосуда головного мозга? АГ 2 ст, 2 ст, риск 2 (ожирение 2 – 3 ст). ХСН 0».

Данный случай обсуждался на комиссии по изучению летальных исходов (КИЛИ). Результаты работы КИЛИ в полном объеме были отражены в анализируемой комиссионной экспертизе. По этим результатам были сформулированы выводы по данному конкретному случаю. Комиссия отметила: 1) не был проведен контроль свертывающей системы крови и МНО, 2) была назначена неадекватная доза прямых антикоагулянтов с учетом веса потерпевшего. В то же время, комиссия не пришла к единому мнению по вопросу: почему, с учетом молодого возраста потерпевшего, не была предпринята попытка оперативного лечения перелома. Как следствие, сокращение сроков нахождения больного на постельном режиме, 3) не выполнено ультразвуковое исследование глубоких вен нижних конечностей («технически неосуществимо»).

Остается необъясненным тот факт, что было выполнено патологоанатомическое, а не судебно-медицинское исследование трупа потерпевшего. Патологоанатомический диагноз – «закрытый оскольчатый перелом костей правой голени: большеберцовой в нижней трети, малоберцовой в верхней трети со смещением отломков. Кровоизлияние в мягкие ткани правой голени, тромбоз межмышечных синусов. Флеботромбоз глубоких вен правой голени. Тромбоэмболия ствола легочной артерии. Отек легких. Отек головного мозга. Аденома передней доли гипофиза – кортикотропинома: артериальная гипертензия, аденокортикальная гиперплазия. Ожирение. Стрии. Хронический пиелонефрит».

Таким образом, эндокринопатия у потерпевшего была диагностирована уже посмертно. Как дефект исследования можно расценить тот факт, что патологоанатомом не изучались сосуды нетравмированной конечности, а при внутреннем исследовании отмечено: «в просвете ствола легочной артерии темно-красный обтурирующий тромб с признаками организации». Необходимо отметить, что на внутренней поверхности стенки артерий сосудов основания головного мозга были обнаружены «цилиндрические и сегментарные атеросклеротические бляшки». При гистологическом исследовании указано: «в одной из вен организовавшийся тромб с канализацией и васкуляризацией; в другой - с

признаками начальной организации. В межмышечных синусах тромботические массы с признаками организации». Данная морфологическая картина свидетельствует о том, что процесс тромбообразования в сосудах начался не одновременно. В то же время, решить какова давность образования тромба конкретно по этому описанию невозможно. Вывод патологоанатома: «непосредственная причина смерти – тромбоэмболия ствола легочной артерии, явившаяся осложнением флеботромбоза глубоких вен голени, развившегося в свою очередь на фоне (!!!) перелома костей голени». Эту фразу представители ответчика интерпретировали как отсутствие прямой причинной связи между производственной травмой и наступившей смертью.

При проведении комиссионной экспертизы экспертной комиссией были еще раз изучены гистопрепараты. При повторном обращении ответчиков по вопросу, «на основании каких признаков были сформулированы выводы о давности образования тромба», был получен ответ: «каких-либо специальных окрасок для определения давности формирования тромбов в венах в судебной гистологии не имеется» (?!). Хотя, если обратиться к действовавшему на тот момент приказу № 161 МЗ РФ от 2003 года [Приказ Минздрава РФ от 24.04.2003 № 161 «Об утверждении инструкции по организации и производству экспертных исследований Бюро судебно-медицинской экспертизы»], то, помимо окраски гематоксилин-эозином, еще используются и окраски на фибрин, по цветовой гамме позволяющие определить «возраст» тромба. С другой стороны, стоит обратить внимание на данные зарубежных ученых, предлагающих говорить более точно о времени его формирования по соотношению клеточных элементов в зоне формирующегося тромба [V. Fineschi et al., 2009; M. Nosaka et al., 2009].

Экспертная комиссия пришла к выводам: «смерть потерпевшего наступила в результате закрытого оскольчатого перелома костей правой голени, осложнившегося развитием тромбоэмболии легочной артерии». Таким образом, между суждением патологоанатома и комиссии экспертов имеется противоречие. Повторимся, в первом случае подразумевается отсутствие прямой причинной связи, а во втором случае наоборот – утверждается, что эта связь закономерна.

Особо стоит отметить, что в состав данной экспертной комиссии вошли исключительно судебно-медицинские эксперты и не были включены специалисты клинического профиля.

Анализ данной комиссионной экспертизы не может в полной мере выявить проблемы проведения судебно-медицинской экспертизы по обозначенной теме. С другой стороны, обсуждение одного лишь этого случая может дать надежные результаты.

Суждение экспертной комиссии было основано на анализе двух медицинских карт стационарного больного, результатов патологоанатомического исследования, повторного исследования гистопрепаратов. При формулировании выводов комиссии прослеживается логическая цепочка: наличие травмы → формирование тромбоза → ТЭЛА → смерть.

Утверждение экспертной комиссии, что между травмой и наступившей смертью через развитие фатального тромботического осложнения имеется прямая причинная связь, предполагает, что после причиненного повреждения в виде перелома костей голени обязательно наступает смерть, что, конечно, не соответствует действительности. На сегодняшний день утвердилось мнение: процесс тромбообразования – это многофакторный процесс, и в каждом конкретном случае порой не так уж легко судить, какой именно фактор сыграл ведущую роль. Повышенному тромбообразованию в анализируемом случае также могло способствовать значительное количество факторов как приобретенных, так, возможно, и наследственных.

В отношении наследственных факторов: экспертной комиссией не была предпринята попытка даже сбора семейного анамнеза на предмет предрасположенности к повышенному тромбообразованию, не говоря уже о том, чтобы провести генетическое типирование на предмет наличия мутаций или полиморфизмов в генах-кандидатах наследственной предрасположенности к тромбофилии – *FII G20210A, FV G1691A, MTHFR 677 CT, MTHFD1 G1958A, PAI-1 -675 5G/4G* и пр. Вызывают лишь удивление строки официального ответа на запрос ответчика – «... наличие наследственной предрасположенности ... не

могло учитываться экспертной комиссией, поскольку данные геномного исследования указанных генов ближайших родственников М. на экспертизу предоставлены не были ...». Автоматически напрашивается вопрос, насколько в данном случае выводы экспертной комиссии согласуются с принципами оценки экспертных заключений – *относимости, допустимости, достоверности*? В совокупности являются ли достаточными для формирования экспертного суждения все собранные сведения? Уместно вспомнить что хоть и не часто, но все же в практике врачей хирургического профиля бывают случаи, когда при технически правильном выполненном оперативном вмешательстве в отдаленном периоде могут возникнуть тромботические осложнения вследствие наличия наследственной предрасположенности [И.А. Савин с соавт., 2011].

Посмертно выявленная эндокринопатия также может быть причиной повышенного тромбообразования, но в выводах экспертной комиссии этот вопрос даже не обсуждался. Исследование патологоанатомом сосудов лишь травмированной конечности не может считаться достоверно установленным источником тромбоэмболии с учетом имевшей место у потерпевшего сопутствующей эндокринопатии. В дополнение, стоит отметить, что относительный риск возникновения тромбоза у лиц с повышенной массой при выполнении оперативного вмешательства составляет около 50% [И.Н. Бокарев с соавт., 2011].

Что касается самой травмы, как фактора, способствующего образованию тромба, то по данным литературы, такое осложнение при травме голени встречается в 77% случаев [С.С. Копенкин, 2005]. Не применительно к анализу данной комиссионной экспертизы, все же важно отметить, что с каждым часом увеличения продолжительности проведения оперативного вмешательства, при использовании эндотрахеального наркоза риск тромбообразования возрастает в два раза [А.А. Баешко, 1999]. Более точно: при проведении оперативного вмешательства с использованием эндотрахеального наркоза продолжительностью до 60 минут частота тромбоза составляет 13,5%, в промежутке от 60 до 120 минут уже 27,5%, и в промежутке 120 – 180 уже 68,8%. [А.А. Баешко, 1999].

Очевидно, что отсутствие в экспертной комиссии клинического врача, имеющего опыт лечения данной патологии и отдаленных тромботических осложнений, надо отнести к дефекту экспертной продукции. В частности, не дана оценка выбранной тактики ведения больного – оперативной или консервативной. Оставлены без комментариев отсутствие биохимических показателей системы гемостаза и адекватности применяемой антикоагулянтной терапии, в то время как по литературным данным частота тромбоза у лиц общехирургической практики достигает 33,6%, если не были использованы профилактические мероприятия [А.А. Баяшко, 1999]. Не лишним будет обращение и к диссертационной работе на соискание ученой степени доктора медицинских наук Е.И. Бялика, утверждающего на основании большого клинического опыта, что при использовании фраксипарина при лечении больных с переломами конечностей не наблюдалось осложнений в виде ТЭЛА [цит. Е.И. Бялик с соавт., 2002,]. С этих позиций вряд ли можно считать объективным ответ на запрос ответчика экспертного учреждения: *«... достоверно высказаться о показателях системы гемостаза М. не представляется возможным, поскольку в настоящее время для дачи пояснения по заключению № N медицинские документы потерпевшего экспертной комиссии не предоставлены».*

Не стремясь опровергнуть выводы экспертной комиссии, тем более, что среди клиницистов имеется высоко обоснованное суждение – «с практической точки зрения целесообразно считать, что без профилактики развития ТГВНК при повреждениях и оперативном лечении, сочетанной травме и постельном режиме - тромбоз является закономерностью» [С.С. Копенкин, 2005], проведенный анализ комиссионной судебно-медицинской экспертизы позволяет утверждать следующее: для того, чтобы выводы судебно-медицинской экспертизы соответствовали существующим требованиям, предъявляемым к экспертному документу правоохранительными органами, целесообразно придерживаться определенного алгоритма оценки патогенеза тромботических осложнений.

Наблюдение № 2. В данном наблюдении приводится практически полный текст заключения специалистов с ответами на поставленные вопросы. Из

светокопии заключения эксперта № ххх, от 27.01. – 11.04.2012 года, выполненного ХХХХ трупа Б-ва А-я С-а, 1984 г.р., следует, «... Обстоятельства дела. Из постановления известно, что «... 11 декабря 2011 года примерно в 06:50 водитель М-в И.Н., управляя автомашиной ГАЗ ... и двигаясь в западном направлении по ул. Ленина ... в районе дома № ххх допустил наезд на пешехода Б-ва А.С., находившегося на проезжей части указанной улицы. В результате ДТП Б-в А.С. с телесными повреждениями был доставлен в лечебное учреждение, где 15 декабря 2011 г. от полученных телесных повреждений скончался. Согласно акту судебно-медицинского исследования трупа № ххх от 10 января 2012 г. смерть Б-ва А.С., 1984 г.р. наступила 15 декабря 2011 г. в 11 часов 40 мин. от тупой сочетанной травмы левой нижней конечности, сопровождавшейся оскольчатый переломом левой бедренной кости, осложнившейся развитием тромбоэмболии легочного ствола и легочных артерий, что привело к развитию острой легочно-сердечной недостаточности. 20 января 2012 г. у потерпевшего Б-ва С.Э. была изъята одежда скончавшегося Б-ва А.С., в которой последний был на момент ДТП, а именно: куртка с капюшоном черного цвета фирмы “Adidas”, джинсы темно-синего цвета фирмы «GAS» размером L 34 с ремнем черного цвета. 24 января 2012 г. от К-ва И.С., защитника подозреваемого М-ва И.Н., поступило ходатайство, которое было частично удовлетворено, а именно в части постановки следующих вопросов при назначении судебно-медицинской экспертизы: 1. Не наступила ли смерть потерпевшего в результате допущенного нарушения правил оказания медицинской помощи? 2. Какова непосредственная причина наступления неблагоприятного исхода оказанной потерпевшему медицинской помощи? 3. Можно ли было не допустить наступления неблагоприятного исхода медицинской помощи? 4. Какие и почему были допущены нарушения правил оказания медицинской помощи, их влияние на возникновение эффекта, на наступление неблагоприятного исхода? 5. Имелись ли реальные условия оказания адекватной медицинской помощи потерпевшему, если нет, то что этому препятствовало, какие меры предпринимались для улучшения ситуации, как это отражено в истории болезни, в других медицинских документах? Вопросы,

указанные в постановлении: 1. Имеются ли на трупe Б-ва А.С. телесные повреждения? Каковы их давность и механизм образования? 2. Какова причина и давность наступления смерти Б-ва А.С.? 3. Имеется ли причинно-следственная связь между полученными повреждениями и смертью Б-ва А.С.? 4. Имеет ли место переезд автомашиной через тело Б-ва А.С.? 5. Употреблял ли Б-в А.С. незадолго до смерти спиртное? Если да, то в каком количестве? Вопросы стороны защиты: 1. Не наступила ли смерть потерпевшего в результате допущенного нарушения правил оказания медицинской помощи? 2. Какова непосредственная причина наступления неблагоприятного исхода оказанной потерпевшему медицинской помощи? 3. Можно ли было не допустить наступления неблагоприятного исхода медицинской помощи? 4. Какие и почему были допущены нарушения правил оказания медицинской помощи, их влияние на возникновение эффекта, на наступление неблагоприятного исхода? 5. Имелись ли реальные условия оказания адекватной медицинской помощи потерпевшему, если нет, то что этому препятствовало, какие меры предпринимались для улучшения ситуации, как это отражено в истории болезни, в других медицинских документах? Представленная документация. Копия настоящего постановления от 25.01.12 г. Акт № xxx судебно-медицинского исследования трупа. Копия протокола осмотра места происшествия. Следователю П.А. У-ву сделан запрос на предоставление мед. карты стационарного больного № xxx/xxx на имя Б-ва А.С. из лечебного учреждения, а также заявлено ходатайство на разрешение о привлечении к производству экспертизы врача-хирурга, не являющегося сотрудником конкретного экспертного учреждения. 02.02.12 г. предоставлена запрошенная мед. карта и получено разрешение на привлечение необходимых специалистов. Исследовательская часть. **Данные акта судебно-медицинского исследования трупа № xxx от 15.12.2011 г. – 10.01.2012 г. (суд. мед. эксперт Д-ко Г.А.).** «... Из медицинской карты стационарного больного известно, что больной Б-в А.С. поступил в лечебное учреждение 11.12.11 г. в 06:50. При поступлении жалобы на боли в области левого бедра (далее нечитабельно). Со слов работников скорой помощи: был наезд на дороге в районе Военкомата.

Потерпевший доставлен в травмпункт клинической больницы, где произведено клинико-рентгенологическое обследование, наложение скелетного вытяжения и госпитализация в травматологическое отделение Р-ой больницы. Общее состояние средней степени тяжести. В сознании, несколько заторможен ...

Обстоятельства травмы не помнит. При осмотре: патологическая подвижность и деформация левого бедра на уровне средней трети. Выраженный болевой синдром. Обнаружены ссадины лица, ушибы, кровоподтеки лица. Диагноз: **Закрытый перелом левого бедра в средней трети со смещением. Обширные ссадины лица. Ушибы верхних и нижних конечностей.** Температурный лист: температура тела 11.12.11 г. – 37,5 °С, 12.12.11 г. – 37,2 °С, ... 14.12.11 г. – 37,4 °С. 11.12.11 г. Дежурный невропатолог. Жалобы на момент осмотра на головные боли, боли в пояснично-крестцовом отделе позвоночника, боли в левой нижней конечности, боли в местах ушибов. Со слов момент травмы и после не помнит ...

Неврологически: сознание ясное, речь не нарушена, менингознаки - ригидности мышц нет, с. Кернига справа отрицательный, слева нижняя конечность на скелетном вытяжении. Черепно-мозговые нервы – зрачки D=S, круглые. Рефлексы живые, симметричные, глазодвижение в полном объеме, нистагма нет. Лицо с легкой асимметрией носогубных складок. Язык слегка девирует вправо. Мышечный тонус и сила в конечностях не изменена. Сухожильные рефлексы D=S, средней живости. Патологических стопных знаков нет ...

Заключение: закрытая черепно-мозговая травма, сотрясение головного мозга. Ушибы мягких тканей лица, перелом левой бедренной кости. На рентгенограммах костей черепа в 2-х проекциях № xxx от 11.12.11 г. Костно-травматических повреждений не выявлено. На рентгенограмме левой бедренной кости в одной нестандартной проекции № xxx определяется оскольчатый перелом средней трети бедренной кости со смещением и захождением костных отломков. 15.12.11 г. с 09:55 часов до 11:40.

Операция: Открытая репозиция, металлоостеосинтез левой бедренной кости ...

последовательно вскрыты мягкие ткани, выделены костные отломки, костные отломки зачищены, сопоставлены, отломок фиксирован винтом (далее нечитаabelно) ...

операция остановлена в связи с резким ухудшением состояния больного ...

Протокол анестезии: ... 10:55 – у больного беспокойство, жалобы на боль в области сердца, чувство нехватки воздуха с последующей потерей сознания и периодизацией дыхания. АД снизилось до критических цифр – 40/0-50/0 мм рт.ст., пульс нитевидный. Акроцианоз, цианоз шеи, верхней половины грудной клетки. Начаты реанимационные мероприятия. Несмотря на проведенные мероприятия, произошла остановка кровообращения и дыхания ... В 11:40 часов констатирована смерть ... НАРУЖНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ: В морг доставлен труп без одежды из Р-ой больницы. Труп молодого мужчины правильного телосложения, удовлетворительного питания с длиной тела 188 см. Труп на ощупь прохладный, трупное окоченение слабо выражено во всех группах исследуемых мышц (Время определения ранних трупных явлений в заключении не указано (*прим. специалистов*)). Трупные пятна багрово-синюшные, располагаются по заднебоковой поверхности туловища, конечностей, при надавливании исчезают и восстанавливают свой цвет через 1 минуту. Голова округлой формы, волосы на голове короткие, темные. Кости свода черепа на ощупь целы. Кожа лица и шеи багрово-синюшного цвета. Глаза закрыты, роговицы прозрачные, зрачки диаметром 0,5 см, слизистые век с расширенными сосудами. Кости и хрящи носа на ощупь целы, носовые ходы чистые. Рот закрыт, переходная кайма губ мертвенно-синюшная. Видимые зубы целы. Слизистая преддверия рта розовато-синюшная. Язык за линией зубов. Над верхней губой и на подбородке щетина. Ушные раковины сформированы правильно, слуховые ходы чистые. Шея пропорциональная туловищу. Грудная клетка цилиндрической формы, ребра на ощупь упругие. В правой подключичной области имеется полихлорвиниловый катетер, прикрепленный к коже лейкопластырем. Живот расположен на уровне груди. Наружные половые органы сформированы правильно, оволосение на лобке по мужскому типу, слева сбрито. Задний проход сомкнут, кожа вокруг чистая. Ногтевые ложа и кончики пальцев синюшные. На правом бедре лейкопластырная наклейка, на которой имеется надпись: Б-в А.С., 27 лет. № xxx. 11:45 смерть. Диагноз: Закрытый перелом левого бедра со смещением. На левом бедре имеется марлевая повязка, по снятию которой обнаружено, что на наружной поверхности

левого бедра имеется послеоперационная рана, имеющая вертикальное расположение и длину 25 см, ушитая узловыми швами. Кожа вокруг раны в помарках крови и обработана раствором йода. На передней поверхности грудной клетки слева, в области соска, имеются точечные ранки (следы от инъекций). На передненаружной поверхности правого бедра в верхнем отделе имеются множественные точечные ранки, обработанные раствором йода. На трупе обнаружены следующие повреждения: на лбу имеются сливающиеся между собой ссадины на участке 13х3 см, частично покрытые возвышающейся легко отслаивающейся корочкой. Участки с отслоенной корочкой розового цвета, блестящие. Аналогичные ссадины имеются на спинке носа, с захватом кончика носа, под левым глазом 4х1,5 см. Над верхней губой справа имеется ссадина размером 1х0,5 см, покрытая возвышающейся светло-коричневого цвета корочкой. Аналогичные ссадины имеются у левого угла рта размером 1х1 см, под нижней губой справа 1,5х0,5 см. В левой теменной области волосистой части головы имеется ссадина с легко отслаивающейся коричневатой корочкой размером 1х1 см, вокруг нее имеется плотная припухлость мягких тканей размером 2,5х2,5 см. У верхнего наружного края послеоперационной раны имеется кровоподтек темно-фиолетового цвета размером 5х3 см, расположенный на 81 см выше уровня подошвенной поверхности стоп. На передневнутренней поверхности левой голени в нижнем отделе имеется ссадина, покрытая плотной корочкой, обработанная бриллиантовой зеленью. На тыльной поверхности левой кисти имеются две ссадины, покрытые плотной возвышающейся корочкой размерами 1х1 см и 1,5х1 см. На тыльной поверхности 3-го пальца левой кисти имеется аналогичная ссадина размером 3х1 см. На передненаружной поверхности левого бедра, на 67 см выше уровня подошвенной поверхности стоп, имеется слабозаметный кровоподтек серовато-зеленого цвета размером 2,5х1,5 см. На 9 см выше него имеется аналогичный кровоподтек размером 2,5х2 см ...

ВНУТРЕННЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ: Полукружным разрезом рассечены мягкие ткани головы, которые с внутренней поверхности имеют равномерную розовато-желтоватую окраску. В левой теменно-височной области имеется серовато-бурого

цвета кровоизлияние размером 6х5 см. Височная мышца слева с аналогичным кровоизлиянием по периферии. Височная мышца справа не изменена. Кости свода черепа целы. Толщина костей черепа на распиле – лобной 0,6 см, теменных по бокам 0,8 см, сзади до 1 см. Твердая мозговая оболочка цела, перламутрового вида, сосуды и синусы ее полнокровны. Мягкая мозговая оболочка влажная, сосуды ее расширены, извилины мозга уплощены, борозды сглажены. Вещество головного мозга на разрезе влажное, блестящее, липнет к ножу. Граница «серого» и «белого» вещества различима. В боковых желудочках небольшое количество прозрачной жидкости. Сосудистые сплетения рыхлые, пушистые. Сосуды основания мозга белесоватые, извитые, плотные. В базальном отделе и стволовой части мозга без видимых патологических изменений. Мозжечок на разрезе сохраняет свою «древовидную» структуру. Кости основания черепа целы. Продольным разрезом от подбородка до лобка рассечены мягкие ткани и вскрыты грудная и брюшная полости. ОРГАНЫ ПОЛОСТИ РТА И ШЕИ расположены правильно. В мягких тканях шеи кровоизлияний не обнаружено. Язык обычной формы, сосочки его выражены у корня. На разрезе мышца языка без кровоизлияний. Щитовидная железа обычных размеров, на разрезе ткань светло-коричневого цвета, мелкозернистая. Подъязычная кость и хрящи гортани целы. В пищеводе в нижних отделах пристеночно сероватого цвета жидкость, слизистая его серо-синюшная, продольно-складчатая. В просвете трахеи и бронхов, пристеночно, кровянистое содержимое. Слизистая верхних дыхательных путей серо-синюшная, блестящая. ОРГАНЫ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ расположены правильно. В плевральных полостях посторонней жидкости нет. Легкие свободно лежат в плевральных полостях, с поверхности розовато-синюшного цвета с серо-черным пятнистым и сетчатым рисунком. На задней поверхности верхней доли правого легкого имеются два участка темно-вишневого цвета размером 12х4 см и 4,5х2 см, несколько западающих по отношению к окружающей ткани. Аналогичный участок имеется на задней поверхности нижней доли левого легкого, поверхность его шероховатая с темно-красного цвета кровоизлияниями. На разрезе данные участки имеют вид треугольников с основанием, обращенным

к плевре, верхушкой к корню легкого. На разрезе данные участки несколько плотноватые, темно-вишневого цвета. Легкие на ощупь воздушные, ткань на разрезе темно-красная, с плоскости разреза стекает темная кровь. Из единичных перерезанных сосудов выступают мелкие тонкие свертки крови в виде «червячков». В просвете обеих легочных артерий имеются плотные серовато-вишневого цвета свертки крови, полностью закрывающие их просвет. Сердечная сорочка цела, в ней небольшое количество прозрачной желтоватой жидкости. Сердце размером 12x10x6 см, в камерах сердца жидкая темная кровь. Из легочного ствола извлечен тромб красного цвета с сероватыми прослойками, тусклый. Сосочковые мышцы несколько утолщены. Эндокард гладкий, блестящий. Толщина мышцы левого желудочка 1,6 – 1,8 см, правого 0,2 см. Сердечная мышца на разрезе розовато-коричневая неравномерного кровенаполнения. Венечные сосуды эластичные, проходимые. Клапаны сердца и крупных сосудов гладкие, эластичные. Внутренняя стенка аорты гладкая, эластичная. Грудина, ребра, позвоночник целы. ОРГАНЫ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ расположены правильно. В брюшной полости свободной жидкости нет. Надпочечники листовидной формы с четкой границей слоев на разрезе. Почки размером по 10x6x5 см. Фиброзная капсула снимается легко, обнажая гладкую темно-вишневого цвета поверхность, ткань почек на разрезе красно-синюшная, граница слоев различима. Просвет лоханок свободен, слизистая их серого цвета. Мочеточники проходимы. Селезенка размером 8x6x3 см, капсула серо-синюшная, слегка морщинистая, ткань на разрезе темно-вишневая без тканевого соскоба пульпы. Печень размером 25x18x11x8 см. Передний край острый, поверхность гладкая, красно-коричневого цвета. На разрезе ткань печени коричневого цвета, из перерезанных сосудов вытекает жидкая темная кровь. В нижней полой вене, в воротной вене жидкая кровь. Желчный пузырь цел, в нем около 20,0 мл темно-оливковой желчи, слизистая бархатистая, зеленоватого цвета. Желчевыводящие пути проходимы. Поджелудочная железа эластичная, дольчатая, желтовато-розового цвета. В желудке небольшое количество мутной жидкости, слизистая с расширенными сосудами и множественными точечными

кровоизлияниями, складчатость выражена хорошо, в складках пристеночно густая слизь. Кишечник с поверхности серо-розовый, умеренно вздут, содержимое в кишечнике соответствует отделам, слизистая тонкого кишечника с кровоизлияниями. В мочевом пузыре небольшое количество мочи, слизистая его серо-розовая, складчатая. Экспертом были распущены узловы швы послеоперационной раны, мягкие ткани бедра пропитаны кровью. По передней поверхности левого бедра экспертом был произведен вертикальный разрез мягких тканей, обнажена кость. Обнаружено, что в средней трети бедренной кости имеется полный оскольчатый перелом. Горизонтальная линия перелома расположена на внутренней поверхности, на расстоянии 71 см от подошвенной плоскости, одиночная, с ровными хорошо сопоставленными краями, без повреждений прилежащего компактного вещества, стенки перелома в этом месте гладкие и отвесные (признаки растяжения). Оба конца этой поперечной линии раздваиваются примерно симметрично на верхние и нижние ветви, которые переходят на переднюю и заднюю поверхность кости и на наружной поверхности кости попарно соединяются, образуя отломок с основанием неправильной ромбовидной формы размером 3x2,5 см, длинник которого ориентирован вертикально. Края вышеописанных ветвей крупнозубчатые, со сколами и отщеплениями прилежащего компактного вещества (признаки сжатия). Образовавшийся отломок имеет клиновидную форму и обращен основанием кнаружи при условно вертикальном положении кости. На наружной поверхности кости фрагменты костных отломков фиксированы металлической пластиной и шурупами. На судебно-химическое исследование взята кровь. На судебно-гистологическое исследование взяты кусочки внутренних органов (в архив). На судебно-биологическое исследование взят образец сухой и жидкой крови. В архив танатологического отделения взят фрагмент левой бедренной кости. ДАННЫЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ: При судебно-химическом исследовании крови от трупа гр. Б-ва С.А., 1984 г.р., этиловый алкоголь не обнаружен (выписка из акта № xxx от 19.12.11 г. СМЭ-химик А-в Н.В.). СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКИЙ ДИАГНОЗ: Основной: Автотравма. Тупая травма левой нижней конечности:

кровоподтеки на левом бедре, закрытый оскольчатый перелом левой бедренной кости. Осложнения: Тромбоэмболия легочного ствола и легочных артерий (закрытие просвета тромбом): множественные геморрагические инфаркты обоих легких. Острая легочно-сердечная недостаточность. Сопутствующие: ссадины на лице, волосистой части головы, кровоизлияния в мягких тканях волосистой части головы, сотрясение головного мозга (по клиническим данным), ссадины на левой голени, левой кисти. Операция от 11.12.11 г. Скелетное вытяжение левого бедра. Операция от 15.12.11 г. Открытая репозиция. Металлоостеосинтез левой бедренной кости. При проведении экспертизы использовались следующие методы: аналитический, описательный, диагностический. Список законов, справочно-нормативных, методических материалов и литературных источников, используемых при производстве данной экспертизы: УПК; ФЗ № 73 «О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации» от 31.05.2001 г. Постановление правительства РФ от 17.08.08 г. № 522 «Об утверждении правил определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека». Приказ министерства здравоохранения и социального развития № 194н от 16.09.08 г. «Об утверждении медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека». Приказ министерства здравоохранения и социального развития РФ № 346н от 12.05.2010 г. «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-медицинских учреждениях Российской Федерации». «Судебно-медицинская экспертиза в случаях автомобильной травмы А.А. Солохин, «Медицина», Москва, 1968 г. «Полный справочник травматолога», под редакцией Елисеева Ю.Ю.; «Эксмо», г. Москва, 2006 г. В.В.Хохлов, Л.Е.Кузнецов «Судебная медицина: Руководство», г. Смоленск, 1998 год. Струков А.И., Серов В.В. «Патологическая анатомия»: учебник. М.: Медицина, 1995 год. ЗАКЛЮЧЕНИЕ: 1. Смерть гр-на Б-ва А.С., 1984 г.р., наступила 15.12.11 г. в 11:40 (по данным медицинской документации) от тупой травмы левой нижней конечности, сопровождавшейся оскольчатым переломом левой бедренной кости, осложнившейся развитием тромбоэмболии легочного ствола и легочных артерий,

что привело к развитию острой легочно-сердечной недостаточности. 2. При исследовании трупа гр. Б-ва А.С. обнаружены следующие повреждения: А) кровоподтеки на левом бедре, закрытый оскольчатый перелом левой бедренной кости. Б) ссадины на лице, волосистой части головы, кровоизлияния в мягких тканях волосистой части головы, сотрясение головного мозга (по клиническим данным). В) ссадины на левой голени, левой кисти. Повреждения пункта А) образовались одновременно от воздействия твердого тупого предмета со значительной силой незадолго до поступления в Р-ую больницу. Перелом бедренной кости образовался в результате деформации изгиба выпуклостью кнутри, о чем свидетельствуют признаки растяжения в краях перелома на внутренней поверхности и сжатия на наружной. Данные повреждения привели к опасному для жизни состоянию – тромбоэмболии легочного ствола и легочных артерий и смерти, и расцениваются как тяжкий вред здоровью, опасный для жизни человека, создающий угрожающее жизни состояние. Между данными повреждениями и смертью гр. Б-ва имеется прямая причинная связь. Повреждения пункта Б) образовались от воздействия твердого тупого предмета(тов) незадолго до поступления в Р-ую больницу и, применительно к живым лицам расцениваются как легкий вред, причиненный здоровью человека. Повреждения пункта В) образовались от воздействия твердого тупого предмета(тов) незадолго до поступления в Р-ую больницу и применительно к живым лицам расцениваются как повреждения, не причинившие вред здоровью человека. Между повреждениями пунктов Б), В) и смертью гр. Б-ва А.С. причинная связь отсутствует. 3. Повреждений, характерных для переезда автомобилем, на теле трупа гр. Б-ва А.С. не обнаружено. 4. При судебно-химическом исследовании крови от трупа гр. Б-ва А.С. 1984 г.р. этиловый алкоголь не обнаружен. *Из акта судебно-гистологического исследования № xxx ... от 26.01.12 г. – 01.02.12 г. архивного материала от трупа Б-ва А.С., 1984 г.р. (судмедэксперт У-на И.И.).* Головной мозг (6 кусочков; 6 препаратов) – сосуды полнокровны, мягкая мозговая оболочка отечна, местами периваскулярный диапедез эритроцитов, расширение периваскулярных пространств, клетки

нейроглии в состоянии «острого набухания», очаги сгущения клеток нейроглии. Сердце (4 кусочка; 4 препарата) – артерии, артериолы малокровны, в состоянии спазма, венозные сосуды неравномерного кровенаполнения, набухание гладкомышечных клеток стенок сосудов, ближе к эндокарду в строме видны линейные кровоизлияния, миофрагментация и волнообразная деформация выражена во многих полях зрения, строма отечна. Легкие (3 кусочка; 3 препарата) – выраженное полнокровие сосудов, стенки сосудов разрыхлены, в просвете артериальных сосудов среднего калибра тромбомассы, состоящие из эритроцитов, в просвете крупного артериального сосуда обтурирующие тромбомассы, состоящие из эритроцитов, фибрина, лейкоцитов, тромбоцитов, очаги эмфизематозно расширенных альвеол, дистелектазы, очаги клеточной инфильтрации в интерстиции, бронхи в состоянии спазма, диффузные кровоизлияния под висцеральной плеврой. № 1 Легочная артерия (1 кусочек; 1 препарат) – в препарате артериальный сосуд, просвет которого обтурирован тромботическими массами, состоящими из эритроцитов, фибрина, лейкоцитов, тромбоцитов. Печень (2 кусочка; 2 препарата) – сосуды полнокровны, очаги некробиоза гепатоцитов, пространства Диссе умеренно расширены, умеренная дисконфлексация печеночных балок. Почка (2 кусочка; 2 препарата) – резко выраженное полнокровие сосудов, плазморрагии, очаги некробиоза и мелких некрозов эпителия извитых и прямых канальцев, в просветах канальцев белковые массы, некоторые клубочки отечны. Селезенка (1 кусочек; 1 препарат) – артериолы малокровны, в состоянии спазма, артерии полнокровны, в паренхиме крупноочаговые кровоизлияния, состоящие из кучно расположенных эритроцитов. Надпочечник (1 кусочек; 1 препарат) – сосуды полнокровны, в корковом слое мелкоочаговые геморрагии, под капсулой единичные мелкоточечные геморрагии. Поджелудочная железа (1 кусочек; 1 препарат) – сосуды полнокровны, паренхима обычной структуры, лейкостазы, плазморрагии. *Судебно-гистологический диагноз:* Полнокровие и периваскулярный отек головного мозга. Малокровие артерий и артериол миокарда с ангиоспазмом. Линейные межклеточные кровоизлияния в субэпикардальной зоне миокарда. Диффузная

миофрагментация и волнообразная деформация кардиомиоцитов. Выраженное полнокровие легочной ткани. Тромбоз легочной артерии и ее ветвей. Диффузные субплевральные кровоизлияния. Очаги эмфиземы легких. Очаговая интерстициальная пневмония. Бронхоспазм. Полнокровие печени с очагами некробиоза гепатоцитов. Резко выраженное полнокровие почечной ткани с очагами некробиоза и микронекрозов почечного эпителия. Малокровие артериол селезенки с артериолспазмом. Крупноочаговые кровоизлияния в паренхиме. Полнокровие надпочечника с мелкоочаговыми геморрагиями в корковом слое. Полнокровие поджелудочной железы. *Из стандартной карты КИЛИ.* ... Ф.И.О. Б-в А-й С-ч 1984 г.р. – 28 лет, отделение: ортопедии и травматологии. Номер истории болезни № xxx/xxx. Леч. врач У-в Ч.К. Дата поступления: 11.12.11 г. Дата смерти: 15.12.11 г. в 11 часов 40 минут. Количество койкодней – 4. Дата установления клинического диагноза: 11.12.11 г. Дата установления заключительного диагноза: 15.12.11 г. Посмертный основной клинический диагноз: Сочетанная травма. Закрытый перелом средней трети левой бедренной кости со смещением. Закрытая черепно-мозговая травма: Сотрясение головного мозга. Ушибы и ссадины лица, туловища, конечностей. Осложнение: Тромбоэмболия легочной артерии, молниеносное течение. Острая сердечно-сосудистая недостаточность. Острая дыхательная недостаточность. Судебно-медицинский диагноз: Основной: Автотравма. Тупая травма нижней конечности: кровоподтеки, закрытый оскольчатый перелом левой бедренной кости. Осложнения: Тромбоэмболия легочного ствола, легочных артерий (закрытие просвета тромбом), множественные геморрагические инфаркты обоих легких. Острая сердечно-сосудистая, легочная недостаточность. Сопутствующий диагноз: ссадины на лице. Волосистой части головы. Кровоизлияния волосистой части головы, сотрясение головного мозга (по клиническим данным). Ссадины левой голени.левой кисти. Операция от 11.12.11 г.: скелетное вытяжение, операция от 15.12.11 г.: открытая репозиция, металлоостеосинтез левой бедренной кости. Ошибка в диагностике и лечении: в истории болезни нет анализов крови на маркеры вирусных гепатитов, формы № 50 (на момент операции находились в

работе), коагулограмма своевременно не взята в виду малого кол-ва пробирок, выдаваемых клинико-диагностической лабораторией, в истории представлены только результаты ПТИ, ПТВ, нет подписи врача в трансфузионном листе. Замечаний по лечению нет, проводилась адекватная антикоагулянтная терапия клексаном в дозе 40 мг/сутки в соответствии степеням риска венозных тромбоэмболических осложнений. Ошибки и дефекты догоспитального этапа: нет. Качество оформления истории болезни: малая информативность дневников ежедневного обхода лечащего врача, недостаточно отражен локальный статус левой нижней конечности на скелетном вытяжении. В истории болезни нет записи обхода заведующим отделением. Расхождение диагноза (если имеется) по основному. Сопутствующему и осложнениям – расхождения диагноза нет. Присутствие лечащего врача на вскрытии: присутствовал заведующий отделением М-в С.С., лечащий врач Ул-в Ч.К. анестезиолог Я-в М.А..

Заключение: Смерть молодого мужчины 28 лет наступила в результате прогрессирующей острой сердечно-сосудистой, дыхательной недостаточности, причинами которых послужило развитие грозного осложнения с высоким риском летального исхода – массивной тромбоэмболией легочной артерии молниеносной формы (результаты судебно-медицинского вскрытия – тромбоэмболия легочного ствола, легочных артерий: полное закрытие просвета тромбом, множественные геморрагические инфаркты обоих легких), несмотря на проводимую адекватную профилактику тромбоэмболических осложнений в предоперационный период (40 мг/сутки клексан) в соответствии степеням риска венозных тромбоэмболических осложнений. У больного в предоперационном периоде клинических признаков тромбоза вен нижних конечностей, каких-либо других признаков тромбоэмболических осложнений не было. Прижизненная диагностика затруднена, и часто факт тромбоэмболии легочной артерии выявляется при вскрытии. Таким образом, летальный исход при молниеносной массивной тромбоэмболии легочной артерии был неизбежен. При массивной ТЭЛА смертность достигает 70%, смерть наступает в течение первых 2-х часов. *Данные медицинской карты стационарного больного № xxx/xxx.* Б-в А.С., 1984 г.р.

поступил в лечебное учреждение 11.12.11 года в 06 часов 50 минут. При поступлении жалобы на боли в области левого бедра, нарушение опороспособности, боль в области ран лица. Со слов работников скорой помощи был найден на дороге в районе Военкомата. Больной был доставлен бригадой скорой помощи в травмпункт, где произведено клинико-рентгенологическое обследование, наложение скелетного вытяжения и госпитализирован в травматологическое отделение Р-ой больницы. Общее состояние средней степени тяжести. В сознании, несколько заторможен. На вопросы отвечает с затруднением. Обстоятельства травмы не помнит. Кожные покровы бледные. В легких дыхание везикулярное. Тоны сердца ясные, ритм правильный. Пульс 88 в минуту. АД-120/80 мм рт.ст.. Живот мягкий, безболезненный. Местно: при осмотре патологическая подвижность и деформация левого бедра на уровне средней трети. Выраженный болевой синдром. Под местной анестезией раствора новокаина 1% - 40 мл наложение скелетного вытяжения. Обширные ссадины лица, ушибы, кровоподтеки лица. Диагноз: Закрытый перелом левого бедра в средней трети со смещением. Обширные ссадины лица. Ушибы и кровоподтеки верхних конечностей. На рентгенограммах костей черепа в 2-х проекциях № xxx от 11.12.11 г. Костно-травматических повреждений не выявлено. На рентгенограмме левой бедренной кости в одной нестандартной проекции № xxx определяется оскольчатый перелом средней трети бедренной кости со смещением и захождением костных отломков. 11.12.11 г. Под местной анестезией раствора новокаина 1% - 30,0 через мышелки левого бедра наложено скелетное вытяжение, конечность уложена на шину Белера, груз по оси конечности – 5 кг. Асептическая повязка. 11.12.11 г. Дежурный невролог. Жалобы на момент осмотра на головные боли, боли в пояснично-крестцовом отделе позвоночника, боли в левой нижней конечности, боли в местах ушибов. Со слов момент травмы и после не помнит. В анамнезе врожденный двусторонний птоз. Неврологически: сознание ясное, речь не нарушена, менингознаки - ригидности мышц нет, с. Кернига справа отрицательный, слева – нижняя конечность на скелетном вытяжении. ЧМН – зрачки D=S, круглые. Глазодвижение в полном объеме, нистагма нет. Лицо с

легкой асимметрией носогубных складок. Язык слегка девирует вправо. Мышечный тонус и сила в конечностях не изменена. Сухожильные рефлексы D=S, средней живости. Патологических стопных знаков нет. Пальценосовая проба с легкой дисметрией. Астенизирован. Заключение: Закрытая черепно-мозговая травма, сотрясение головного мозга. Ушибы мягких тканей лица, перелом левой бедренной кости. Рекомендовано: Таблетки диакарб 0,25 1т утром, по схеме: 11.12-14.12.-17.12 (?!), ..., таблетки аспаркама по 1 т 3 раза в день в дни приема диакарба, таблетки глицина 0,1 по 2 т 3 раза в день под язык ... 11.12.11 г. Дежурный врач: Общее состояние средней тяжести, компенсированное по витальным функциям. Жалобы на болезненность в левом бедре и левом голеностопном суставе, общую слабость. Дыхание билатеральное. АД-110/70 мм рт.ст.. Левая нога на шине. Назначения выполняются ... 12.12.11 г. Лечащий врач. Жалобы на боли в левом бедре, нарушение функции левой нижней конечности, боли в голове. Объективно: состояние средней тяжести. В сознании. Кожные покровы обычной окраски. В легких дыхание везикулярное, хрипов нет. ЧДД-20 в минуту, тоны сердца ясные ритмичные. АД-110/70 мм рт.ст., Пульс-84 в минуту. Язык влажный. Живот мягкий, безболезненный. Физиологические отправления в норме. Локально: левая нижняя конечность на скелетном вытяжении ... 12.12.11 г. ЭКГ. Ритм синусовый. ЧСС-92 в минуту. ЭОС вертикальная. PQ 0,12; QRS 0,08; QT 0,32. Синусовая тахикардия ... 13.12.11 г. Лечащий врач. Жалобы на боли в левом бедре, нарушение функции левого бедра, боли в местах ушибов. Объективно: состояние средней тяжести. В сознании. Кожные покровы обычной окраски. Сердце и легкие в норме. Гемодинамика стабильная. Живот мягкий, безболезненный. Физиологические отправления в норме. Локально: левое бедро на скелетном вытяжении. Лечение получает, планируется на операцию ... 14.12.11 г. Лечащий врач. Жалобы на боли в левом бедре. Объективно: состояние средней тяжести, стабильное, в сознании. Сердце и легкие в норме. Гемодинамика стабильная. Живот мягкий, безболезненный. Физиологические отправления в норме. Локально: левое бедро на скелетном вытяжении. Лечение получает, планируется на операцию ... 14.12.11 г. 14:20 Осмотр анестезиолога. Общее

состояние – тяжелое. В сознании, контактен, адекватен. Жалоб не предъявляет. Анамнез заболевания: ознакомлен. Анамнез жизни: хронический бронхит, ПТОЗ - 2010. Общий наркоз. Аллергологический анамнез спокоен. Кожные покровы и видимые слизистые физиологической окраски. Ссадины на лице и руках. Дыхание самостоятельное. Аускультативно везикулярное, хрипов нет. ЧДД-18 в минуту. Сердечные тоны ритмичные. АД=140/90 мм рт.ст., пульс - 100 в минуту. Живот мягкий, безболезненный. Отеков нет. Планируется металлоостеосинтез бедренной кости под спинальной анестезией. Кровь и СЗП (свежезамороженная плазма) по 500 мл заказаны. Согласие на анестезию от больного получено. Премедикация: Sol. Atropini 0,1%-1 мл: Sol. Dimedroli 1%-1мл: Sol. Promedoli 2%-1 мл п/к за 30 минут до операции. Предоперационная инфузия: раствор Рингера – 400,0 мл, физраствор – 400,0 мл ... 14.12.11 г. Дать одну таблетку фенобарбитала на ночь ... 15.12.11 г. Предоперационный эпикриз. Больному Б-ву А.С., 1984 г.р. с диагнозом: Закрытый перелом левой бедренной кости со смещением. Закрытая черепно-мозговая травма. Сотрясение головного мозга планируется металлоостеосинтез левого бедра под спинальной анестезией, риск операции высокий. Анестезиологом осмотрен. Согласие больного получено. Назначается за 30 минут до операции премедикация: Sol. Promedoli 2%-1 мл; Sol. Dimedroli 1%-1мл: Sol. Atropini sulfatis 0,1%-1 мл. Сделано в 08:15. Температурный лист: температура тела 11.12.11 г. – 37,5°C, 12.12. - 37,2°C ... 14.12.11 г. – 37,4°C ... 15.12.11 г. Протокол анестезии. СМА (спинномозговая анестезия). В асептических условиях под местной анестезией произведена пункция субарахноидального пространства спинальной иглой на уровне L III – L IV без технических трудностей. 9.15. Контроль – ликвор в игле. Введено: Маркаин Спинал – Хеви 2,8 мл. Эффект блока – достаточный. Больной уложен на правый бок. Начата операция 09:55. Поддержание анестезии с целью седации S.Relanii 2,0. Течение гладкое. Гемодинамика стабильная. Инфузионная терапия раствор Рингер-Локка 500,0; физраствор 0,9% - 400,0; раствор стабиrola 500,0. АД-150/90 – 100/70 – 120/80 мм рт.ст/. Пульс-110 – 120 – 96 в минуту. 10:55 – у больного беспокойство, жалобы на боль в области сердца, чувство нехватки воздуха с последующей

потерей сознания и периодизацией дыхания. АД снизилось до критических цифр 40/0 – 50/0 мм рт.ст., пульс нитевидный. Акроцианоз, цианоз шеи, верхней половины грудной клетки. Начаты реанимационные мероприятия: искусственная вентиляция легких аппаратом через маску. Внутривенно струйно: S. Prednizoloni 90 мг; внутривенно капельно подключены вазопрессоры: S. Mezatonil 1,0; S. R – L 500.0; S. NaCl 0,9%-400.0; S. Dofamini 20.0; S. Heparini 10 т.ед. в/стр. Несмотря на проводимые мероприятия произошла остановка кровообращения и дыхания. Реанимационные мероприятия. После введения: S. Relanii 2.0; S. Ketamini 100 mg; S. Ditolini 100 mg произведена интубация трахеи трубкой № 8, переведен на искусственную вентиляцию легких. Медикаментозная стимуляция сердечной деятельности: S. Adrenalini 0,1 - 1,0 в/в струйно № 3; S. CaCl₂ 10%-10.0 № 3; S. Natrii bicarbonati 4%-40,0 № 3. Постоянный непрямой массаж сердца. Произведена катетеризация подключичной вены справа. Внутрисердечное введение раствора адреналина 1,0 раствора атропина 0,1% - 1,0; раствора хлористого кальция 10%-10,0. Сердечная деятельность не восстановилась. 11:25. произведена дефибриляция сердца дважды с мощностью 300 Вт. Сердечная деятельность не восстанавливалась. Реанимационные мероприятия безуспешны. Констатирована смерть в 11:40 15.12.2011 г. ... 15.12.11 г. с 09:55 часов до 11:40 часов. Операция. Открытая репозиция, металлоостеосинтез левой бедренной кости. ... Произведен разрез длиной 20 см по наружной поверхности левого бедра, послойно вскрыты мягкий ткани, выделены костные отломки, костные отломки зачищены, сопоставлены, отломок фиксирован винтом, поставлена пластина, фиксирована винтами ... операция остановлена в связи с резким ухудшением состояния больного, остановка сердечной деятельности, послеоперационная рана ушита. В 11:40 констатирована смерть больного. Диагноз послеоперационный: тот же. Посмертный диагноз: Основной: Сочетанная травма. Закрытый перелом левой бедренной кости со смещением. Закрытая черепно-мозговая травма. Сотрясение головного мозга. Ушибы, ссадины лица, туловища, верхних и нижних конечностей. Осложнение: Тромбоэмболия легочной артерии молниеносное течение. Острая сердечно-сосудистая, дыхательная недостаточность. Острый

инфаркт миокарда? Согласно листу назначений Б-в А.С. получал лечение с 11.12. по 15.12.11 г. ежедневно: раствор Рингера 400 мл + витамин С 5,0 внутривенно капельно; ГНС (глюкозо-новокаиновая смесь) 400 мл внутривенно капельно; рефортан 500 мл внутривенно; физраствор 400 мл + витамины В₁, В₆ внутривенно капельно; клексан 0,4 подкожно; кеторол 2,0x3 р/д внутримышечно; анальгин 50%-2,0; димедрол 1%-1,0 х 2р в/м; был введен стафилококковый анатоксин и противостолбнячная сыворотка при поступлении; цефтриаксон 1,0x2 р внутривенно. В анализах крови, мочи – без особенностей. Обсуждение полученных результатов. Изучением истории болезни больного Б-ва А-я С-ча 1984 г.р., установлено, что он доставлен бригадой скорой помощи в травмпункт 11.12.11 г. в 6 ч. 50 мин., со слов доставивших больной найден на улице в районе «райвоенкомата», травма получена в ДТП, сбит автомашиной. При поступлении больной в сознании, контактен. Кожные покровы обычного цвета. Дыхание везикулярное. Тоны сердца ритмичные. Пульс-76 в минуту, АД-120/80 мм рт.ст.. Живот мягкий, безболезненный. Местно: деформация левого бедра на уровне средней трети, патологическая подвижность; ссадины, кровоподтеки области головы, туловища, конечностей. Больной обследован: № xxx Рентгенограмма костей черепа – костной патологии не выявлено; № xxx левого бедра – в одной не стандартной проекции определяется оскольчатый перелом средней трети со смещением и захождение костных отломков. Консультация невропатолога – Закрытая черепно-мозговая травма. Сотрясение головного мозга. Ушибы лица. Взята кровь на алкоголь – акт № xxx от 12.12.11 г. – этиловый алкоголь не обнаружен. На основании анамнеза, клинических и рентгенологических данных, осмотра невролога состояние больного расценено как средней тяжести, и выставлен предварительный Диагноз: Сочетанная травма. Закрытая черепно-мозговая травма. Сотрясение головного мозга. Закрытый оскольчатый перелом средней трети левого бедра со смещением. Ушибы, ссадины головы, туловища, конечностей. Больному проводилось лечение: 11.12.11 г. наложено скелетное вытяжение, обезболивание, инфузионная терапия в объеме 1700 мл, антикоагулянты – клексан 0,4-1р в день подкожно, АС 0,5, ПСС 3 тыс ед,

мексидол 2,0 внутримышечно, диакарб 0,25 по 1 т по схеме, аспаркам 1 т-3р. Проведено обследование: общий анализ крови и мочи, биохимические анализы, ЭКГ, сахар крови, коагулограмма, группа крови, анализы на гепатиты, RW, ф№50, ПТИ, ПТВ – данные без патологии. После проведенного лечения состояние больного улучшилось, в сознании, контактен, гемодинамика стабильная, по органам без ухудшения в динамике. По стабилизации состояния больного, 15.12.11 г. оперативное лечение: металлоостеосинтез оскольчатого перелома диафиза левой бедренной кости компрессирующей пластиной. В ходе оперативного вмешательства, после установки металлоконструкции, на этапе ушивания послеоперационной раны состояние больного начало внезапно резко ухудшаться, больной предъявлял жалобы на одышку, боли за грудиной, произошла остановка дыхания и сердечной деятельности. Проводимые экстренные реанимационные мероприятия без эффекта. 15.12.2011 г. в 11 ч. 40 мин. констатирована смерть больного. Посмертный клинический диагноз: Основной: Сочетанная политравма. Закрытый перелом средней трети левой бедренной кости со смещением. Закрытая черепно-мозговая травма. Сотрясение головного мозга. Ушибы и ссадины лица, туловища, конечностей. Осложнение: Тромбоэмболия легочной артерии, молниеносное течение. Острая сердечно-сосудистая недостаточность. Острая дыхательная недостаточность. Судебно-медицинский диагноз: Основной: Автотравма. Тупая травма нижней конечности: кровоизлияния, закрытый оскольчатый перелом левой бедренной кости. Осложнения: Тромбоэмболия легочного ствола, легочных артерий (закрывание просвета тромбом), множественные геморрагические инфаркты обоих легких. Острая сердечно-сосудистая недостаточность, легочная недостаточность. Сопутствующий диагноз: Ссадины на лице, волосистой части головы. Кровоизлияния волосистой части головы, сотрясение головного мозга (по клиническим данным). Ссадины левой голени, левой кисти. Операция от 11.12.11 г.: скелетное вытяжение, операция от 15.12.11 г.: Открытая репозиция, металлоостеосинтез левой бедренной кости. Членами экспертной комиссии установлено, что больному обследование и лечение проводилось согласно

Стандартам оказания специализированной травматологической помощи при сочетанных травмах. Также комиссией выявлены замечания по оформлению медицинской документации (истории болезни): при поступлении больного нет осмотра заведующим отделением, дневники осмотра больного малоинформативные (недостаточно отражен локальный статус), нет подписи врача в листе переливания трансфузионных средств. Смерть молодого мужчины 28 лет наступила в результате прогрессирующей острой сердечно-сосудистой, дыхательной недостаточности, причинами развития которых послужила травма левой нижней конечности с закрытым переломом средней трети бедренной кости, полученная в результате автотравмы и как следствие – развитие грозного осложнения с высоким риском летального исхода – массивной тромбоэмболией легочного ствола, легочных артерий (полное закрытия просвета тромбом), множественные геморрагические инфаркты обоих легких, несмотря на проводимую адекватную профилактику тромбоэмболических осложнений в предоперационный период (введение клексана 40 мг в сутки) в соответствии степеням риска венозных тромбоэмболических осложнений. По литературным данным, среди причин смертности населения травмы занимают второе место после сердечно-сосудистых заболеваний, а у категории лиц трудоспособного возраста – первое место и составляют 45% в структуре всех причин смертности [П.В. Елфимов с соавт., 2000]. ТЭЛА (тромбоэмболия легочной артерии) является одной из основных причин смертности и потери трудоспособности, занимает 3 место в ряду наиболее частых причин смерти, второе - среди причин внезапной смерти, и является наиболее частой причиной госпитальной летальности. Ежегодно смертность от ТЭЛА 0,1% населения, причем летальность среди пациентов, не получивших антитромботическую терапию, достигает 30%. Массивная ТЭЛА заканчивается в 70% случаев летально. Смерть наступает в течение 30 минут. Диагностика ТЭЛА является сложной задачей для практикующих врачей, при жизни диагноз ТЭЛА выставляется менее чем в 70% наблюдений. По данным Фрамингамского исследования ТЭЛА, как причина смерти больных, составляет 15,6% от всей внутригоспитальной летальности,

причем на хирургических больных приходится 18% от всей летальности. При общей хирургической патологии частота тромбоза глубоких вен нижних конечностей составляет 32%, множественные травмы - 50%. Статистика распространенности тромбоза глубоких вен нижних конечностей у пациентов травматологических отделений печальна [В.С. Савельев, 1999]. При политравме ТЭЛА является одной из наиболее частых причин смерти. По данным многих авторов [А.А. Бешко, 1999; L.J. Lapidus et al., 2013; А.К. Tarbox, М. Swaroop, 2013; М. Wada et al., 2013] более 90% ТЭЛА возникают из-за тромбоза вен голени, клинические признаки и симптомы тромбоза неспецифичны и подавляющее большинство протекают бессимптомно [В.С. Савельев, 1999]. По данным исследований [А.В. Скороглядов, С.С. Копенкин, 2003] отмечено, что тромбоэмболия легочной артерии явилась непосредственной причиной смерти каждого четвертого умершего больного с повреждениями опорно-двигательного аппарата. Выявленные замечания по оформлению истории болезни не повлияли на исход заболевания. При производстве комиссионной судебно-медицинской экспертизы использовались следующие методы: аналитический, описательный, диагностический. Список законов, справочно-нормативных, методических материалов и литературных источников, используемых при производстве данного исследования: - УПК РФ; - ФЗ № 73 «О Государственной судебно-экспертной деятельности в РФ» от 31.05.2001 г. - Постановление правительства РФ от 17.08.08 г. № 522 «Об утверждении правил определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека». - Приказ Министерства здравоохранения и социального развития № 194н от 16.09.08 г. «Об утверждении медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека». - Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 346н от 12.05.2010 г. «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-медицинских учреждениях Российской Федерации». - Солохин А.А. Судебно-медицинская экспертиза в случаях автомобильной травмы. М.: Медицина, 1968. - Полный справочник травматолога. – Под редакцией Елисеева Ю.Ю.: М.: Эксмо, 2006г. - Хохлов В.В.

Судебная медицина: Руководство. Смоленск, 2010. - Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия: учебник. М.: Медицина, 1995 - Матвеева Н.Ю. и др. Венозные тромбоемболические осложнения при травмах нижних конечностей и эндопротезировании тазобедренного и коленного сустава. Вестн. Травматолог ортопед. 2002. - Юмашев Г.С. Травматология и ортопедия. М.: Медицина, 1977 г. Члены экспертной комиссии: Л. Т-ко, Г. Д-ко, И. У-на, Н. Ш-в. **ВЫВОДЫ:** Экспертная комиссия, проанализировав представленную документацию, на вопросы, указанные в постановлении от 25.01.12 г. о назначении настоящей комиссионной судебно-медицинской экспертизы, считает возможным ответить следующее. **Вопрос:** Какова причина и давность наступления смерти Б-ва А.С.? **Ответ:** Смерть гр-на Б-ва А.С., 1984 г.р., наступила 15.12.11 г. в 11 часов 40 минут (по данным медицинской документации) от тупой травмы левой нижней конечности, сопровождавшейся оскольчатый переломом левой бедренной кости, осложнившейся развитием тромбоемболии легочного ствола и легочных артерий, что привело к развитию острой легочно-сердечной недостаточности. **Вопрос:** Имеются ли на трупе Б-ва А.С. телесные повреждения? Каковы их давность и механизм образования? Имеется ли причинно-следственная связь между полученными повреждениями и смертью Б-ва А.С.? **Ответ:** При исследовании трупа гр. Б-ва А.С. обнаружены следующие повреждения: А) кровоподтеки на левом бедре, закрытый оскольчатый перелом левой бедренной кости. Б) ссадины на лице, волосистой части головы, кровоизлияния в мягких тканях волосистой части головы, сотрясение головного мозга (по клиническим данным). В) ссадины на левой голени, левой кисти. Повреждения пункта «А» образовались одновременно от воздействия твердого тупого предмета со значительной силой незадолго до поступления в Р-ую больницу. Перелом бедренной кости образовался в результате деформации изгиба выпуклостью кнутри, о чем свидетельствуют признаки растяжения в краях перелома на внутренней поверхности и сжатия на наружной. Данные повреждения привели к опасному для жизни состоянию – тромбоемболии легочного ствола и легочных артерий и смерти, и расцениваются как тяжкий вред здоровью, опасный для жизни человека,

создающий угрожающее жизни состояние (согласно п.6 п.6.2.8 раздела II «Медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека» Приложения к Приказу Минздравсоцразвития России от 24.04.2008 г. № 194н). Между данными повреждениями и смертью гр. Б-ва А.С. имеется прямая причинная связь. Повреждения пункта «Б» образовались от воздействия твердого тупого предмета(тов) незадолго до поступления в Р-ую больницу и применительно к живым лицам расцениваются как легкий вред, причиненный здоровью человека (согласно п.8, п. 8.1 раздела II «Медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека» Приложения к Приказу Минздравсоцразвития России от 24.04.2008 г. № 194н). Повреждения пункта «В» образовались от воздействия твердого тупого предмета(тов) незадолго до поступления в Р-ую больницу и применительно к живым лицам расцениваются как повреждения, не причинившие вред здоровью человека (согласно п.9 раздела II «Медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека» Приложения к Приказу Минздравсоцразвития России от 24.04.2008 г. № 194н). Между повреждениями пунктов «Б», «В» и смертью гр. Б-ва А.С. причинная связь отсутствует. **Вопрос:** Имеет ли место переезд автомашиной через тело Б-ва А.С.? **Ответ:** Повреждения характерные для переезда автомобилем на теле трупа гр. Б-ва А.С. не обнаружено. **Вопрос:** Употреблял ли Б-в А.С. незадолго до смерти спиртное? Если да, то, в каком количестве? **Ответ:** При судебно-химическом исследовании крови от трупа гр. Б-ва С.А. 1984 г.р. этиловый алкоголь не обнаружен. **Вопрос:** Не наступила ли смерть потерпевшего в результате допущенного нарушения правил оказания медицинской помощи? Какие и почему были допущены нарушения правил оказания медицинской помощи, их влияние на возникновение эффекта, на наступление неблагоприятного исхода? **Ответ:** Обследование и лечение гр. Б-ву А.С. проводилось согласно Стандартам оказания специализированной травматологической помощи при сочетанных травмах. **Вопрос:** Какова непосредственная причина наступления неблагоприятного исхода оказанной потерпевшему медицинской помощи? **Ответ:** Смерть гр. Б-ва А.С. наступила в

результате прогрессирующей острой сердечно-сосудистой, дыхательной недостаточности, причинами развития которых послужила сочетанная травма с закрытым переломом средней трети бедренной кости, полученная в результате автотравмы, и как следствие – развитие грозного осложнения с высоким риском летального исхода – массивной тромбоэмболией легочного ствола, легочных артерий (полное закрытие просвета тромбом), множественные геморрагические инфаркты обоих легких. **Вопрос:** Можно ли было не допустить наступления неблагоприятного исхода медицинской помощи? **Ответ:** По литературным данным среди причин смертности ТЭЛА (тромбоэмболия легочной артерии) занимает второе место среди причин внезапной смерти, несмотря на проводимую адекватную профилактику тромбоэмболических осложнений. **Вопрос:** Имелись ли реальные условия оказания адекватной медицинской помощи потерпевшему, если нет, то что этому препятствовало, какие меры предпринимались для улучшения ситуации, как это отражено в истории болезни в других медицинских документах? **Ответ:** гр. Б-ву А.С. в предоперационный период проводилась адекватная профилактика тромбоэмболических осложнений (вводился клексан 40 мг в сутки), а для улучшения создавшейся ситуации во время операции при проведении реанимационных мероприятий вводился гепарин 10 т. ед. внутривенно струйно, что отражено в медицинской карте стационарного больного. Заместитель начальника по экспертной работе экспертного учреждения Л. Т-ко; заведующая танатологическим отделом Г. Д-ко; заведующая судебно-гистологическим отделением И. У-на; Главный хирург Министерства здравоохранения и социального развития Р-ки ... Н. Ш-в». Аналитическая часть Из предоставленной светоконии заключения экспертов № xxx от 27.01. – 11.04.2012 года известно, что после событий 11.12.2011 года гр. Б-в А.С.

- был госпитализирован в лечебное учреждение 11.12.2011 года в 06:50;
- в день госпитализации (11.12.2011 года, время не указано!) ему было наложено скелетное вытяжение «через мышечки левого бедра» с грузом по оси конечности 5 кг;

➤ 15.12.2011 года в период времени с 09:55 до 11:40 ему выполнялась операция – открытая репозиция, накостный металлоостеосинтез левой бедренной кости;

➤ в 10:55 15.12.2011 во время выполнения операции он стал предъявлять жалобы на «боль в области сердца», «чувство нехватки воздуха», произошло падение артериального давления, потеря сознания; были начаты реанимационные мероприятия;

➤ в 11: 25 15.12.2011 года произведена дефибриляция сердца;

➤ в 11:40 15.12.2011 года врачами была констатирована смерть.

В день смерти (?!) 15.12.2011 года было проведено судебно-медицинское исследование трупа Б-ва А.С..

Согласно данным судебно-медицинского исследования трупа и сведений из медицинской карты стационарного больного, на трупе Б-ва А-я С-ча, 1984 г.р., были выявлены повреждения –

1. Закрытая черепно-мозговая травма, сотрясение головного мозга, ссадины лица и волосистой части головы, травматический отек мягких тканей левой височной области, кровоизлияние на внутренней поверхности мягких тканей свода черепа в левой височной области.

2. Закрытый перелом левой бедренной кости в средней трети, в 71 см от подошвенной поверхности стоп, кровоподтеки (3) левого бедра по передней наружной поверхности.

3. Ссадины тыльной поверхности левой кисти, передней внутренней поверхности левой голени в нижней трети.

Все вышеперечисленные повреждения были причинены вследствие воздействия твердых тупых предметов, специалистами не исключается их образование в едином механизме при столкновении автомобиля с пешеходом в срок, указанный в предоставленном экспертном документе, а именно 11.12.2011 года.

Помимо этих повреждений, при производстве судебно-медицинского исследования трупа Б-ва А.С. были выявлены следы медицинских манипуляций в виде –

1. катетеризации правой подключичной вены,
2. послеоперационной раны по наружной поверхности левого бедра,
3. «точечных ранок» по передней поверхности груди, слева от средней линии в «области соска»,
4. «точечных ранок» по передней наружной поверхности правого бедра.

Исходя из объективных данных, изложенных в копии заключения эксперта № ххх, непосредственная причина смерти Б-ва А.С. была обусловлена развитием острой сердечной и дыхательной недостаточности.

Причиной острой сердечной и дыхательной недостаточности явилась тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА). Данный вывод специалистов основан на –

- клинических данных – *«у больного беспокойство, жалобы на боль в области сердца, чувство нехватки воздуха с последующей потерей сознания и периодизацией дыхания. АД снизилось до критических цифр 40/0 – 50/0 мм рт.ст., пульс нитевидный. Акроцианоз, цианоз шеи, верхней половины грудной клетки»*,
- данных секционного исследования – *«из единичных перерезанных сосудов выступают мелкие тонкие свертки крови в виде «червячков». В просвете обеих легочных артерий имеются плотные серовато-вишневого цвета свертки крови, полностью закрывающие их просвет»*,
- данных гистологического исследования – *«в просвете артериальных сосудов среднего калибра тромбомассы, состоящие из эритроцитов, в просвете крупного артериального сосуда обтурирующие тромбомассы, состоящие из эритроцитов, фибрина, лейкоцитов, тромбоцитов»*.

Специалисты разъясняют, что для установления причинной связи между ТЭЛА у Б-ва А.С. (15.12.2011) и ранее причиненными повреждениями (11.12.2011) необходимо установить –

1. наличие венозного тромбоза как источника ТЭЛА;

2. сроки формирования тромбоза;
3. сроки возникновения ТЭЛА;
4. исключение иных причин (помимо повреждений) тромбоза и как следствие ТЭЛА.

В отношении пункта № 1. В теории и практике медицины источником ТЭЛА считается тромб, оторвавшийся (тромбоэмбол) от своего места прикрепления на внутренней поверхности стенки вены, входящей в систему верхней либо нижней полых вен. Поэтому при обнаружении макроскопических признаков ТЭЛА при проведении секционного исследования трупа **обязательным** для судебно-медицинского эксперта является поиск места, откуда оторвался данный тромб. Данное положение, диктует эксперту **обязательное исследование венозных сосудов**. Наиболее частым источником ТЭЛА по данным литературы и, исходя из собственного практического экспертного опыта, специалисты называют глубокие вены нижней конечности, входящие в систему нижней полой вены. При этом обязательно исследуются вены обеих нижних конечностей. Однако в данном конкретном случае, в исследовательской части копии заключения эксперта № ххх, **не имеется никаких сведений об исследовании глубоких вен нижних конечностей** (ни правой, ни левой) трупа Б-ва А.С.. Не исследованы также вены таза, верхних конечностей. Все это лишает комиссию специалистов обоснованного суждения об источнике ТЭЛА.

В отношении пункта № 2. Специалисты не могут по имеющимся данным, изложенным в копии заключения эксперта № ххх, высказаться о сроках формирования венозного тромбоза по причине того, что не был найден сам тромбоз вен, т.к. сами вены при исследовании трупа не вскрывались и соответственно не исследовались.

В отношении пункта № 3. Что касается срока формирования ТЭЛА, то анализ данных акта судебно-медицинского исследования трупа, данных медицинской карты стационарного больного и результатов гистологического исследования выявил существенные противоречия. Так, по клиническим данным

и частично по результатам гистологического исследования, ТЭЛА сформировалась за несколько десятков минут до наступления смерти Б-ва А.С..

Однако в исследовательской части акта судебно-медицинского исследования трупа есть указание на наличие макроскопических признаков инфаркта легкого: *«На задней поверхности верхней доли правого легкого имеются два участка темно-вишневого цвета размером 12x4 см и 4,5x2 см, несколько западающих по отношению к окружающей ткани. Аналогичный участок имеется на задней поверхности нижней доли левого легкого, поверхность его шероховатая с темно-красного цвета кровоизлияниями. На разрезе данные участки имеют вид треугольников с основанием, обращенным к плевре, верхушкой к корню легкого. На разрезе данные участки несколько плотноватые, темно-вишневого цвета»*. Такая морфологическая картина соответствует тому, что ТЭЛА за счет эмболии мелких ветвей легочной артерии начала развиваться за 1–7 суток до наступления смерти [Д.Д. Зербино, Л.Л. Лукасевич, 1983; 1998; Г.Н. Маслякова, 2005]. В то же время, это утверждение не находит своего подтверждения ни по клиническим данным (функции дыхания и сердечной деятельности были в пределах нормы в промежуток времени с 11 по 14.12.2011 года), ни по результатам проведенного гистологического исследования (не были обнаружены микроскопические признаки инфаркта легкого).

Помимо этого, установление сроков ТЭЛА предполагает изготовление гистологических препаратов с окраской на фибрин [Д.Д. Зербино, Л.Л. Лукасевич, 1998]. В данном случае это выполнено не было, что также лишает специалистов возможности высказаться о сроках возникновения ТЭЛА.

В отношении пункта № 4. Тромбозы вен по своей природе являются многофакторным патологическим процессом. Причинами тромбоза могут быть как нарушение целостности самой сосудистой стенки (что не исключает и травматическое происхождение тромбоза), так и нарушения в системе гемостаза как наследственного, так и приобретенного характера.

Учитывая пол потерпевшего (мужской), молодой возраст (28 лет), наличие в анамнезе врожденного птоза, специалисты не исключают как причину тромбоза и

возможную наследственную патологию у Б-ва А.С. (наследственную тромбофилию) [M.D. Tadlock et al., 2014]. Наследственная тромбофилия сама по себе может явиться причиной развития тромбоза с последующим фатальным осложнением в виде ТЭЛА, а наличие травмы может считаться лишь фоновым, не стоящим в прямой причинной связи с наступившей смертью потерпевшего. Однако в заключении эксперта № xxx не были предприняты никакие попытки для установления либо исключения данного факта, начиная от сбора семейного анамнеза и заканчивая генетическим типированием ДНК потерпевшего на наличие мутаций в таких генах как *MTHFR 677 CT*, *MTHFR 1298 AC*, *PAI-1 -675 5G/4G*, *NOS3 894GT*, *FII G20210A*, *FV G1691A*, тем более, что в последние годы активно предлагается внедрение в практику судебно-медицинского эксперта этих методов [F. Mobilia, 2014].

Таким образом, этот пример свидетельствует о том, что выводы экспертной комиссии о наличии причинной связи между закрытым переломом левой бедренной кости и развитием ТЭЛА, приведшей к смерти потерпевшего являются научно необоснованными и противоречат теории и практике судебной медицины.

Наблюдение № 3. Пациентка (62 года) экстренно госпитализирована в лечебное учреждение по поводу закрытого импрессионного перелома наружного мыщелка правой большеберцовой кости (рисунок 53).

При поступлении наложено скелетное вытяжение. Пациентка стратифицирована в группу высокого риска тромбоэмболических осложнений. Начата профилактика ТО гепарином в дозировке 5000 ед 3 раза в сутки. На 8-е сутки потерпевшая взята в операционную для проведения открытой репозиции, накостного металлоостеосинтеза со свободной костной пластикой. Операция проводилась под эпидуральной анестезией. В ходе операции у пациентки развились симптомы ТЭЛА. Начата тромболитическая терапия, лечение продолжено в отделении интенсивной терапии, где пациентка скончалась на 3 сутки после развития осложнения.



Рис. 53. Наблюдение № 3. Диагностические рентгенограммы области повреждения

В ходе секционного исследования обнаружен тромбоз глубоких вен травмированной голени (рисунок 54).



Рис. 54. Наблюдение № 3. Аутопсийный материал: тромбоз глубоких вен голени на стороне перелома

Гистологическое исследование подтвердило стаз, лейкоцитарную инфильтрацию, некробиоз миоцитов и тромбоз вен в зоне повреждения. Генетическое типирование выявило полиморфизм в генах *MTHFR 677CT*, *PAI-1 4G/5G*, *NOS3 894GT*.

Наблюдение № 4. Пациент (24 года) госпитализирован по поводу закрытого перелома дна вертлужной впадины, центрального вывиха головки правого бедра. В день поступления в районную больницу вывих правого бедра вправлен, наложено скелетное вытяжение. Сведений о фармакологической профилактике тромбоэмболических осложнений в течение первых четырёх суток нет. На пятые сутки после травмы пациент переведён в областное лечебное учреждение, где начата профилактика тромбоэмболических осложнений эноксапарином натрия в дозировке 0,4 мл подкожно 1 раз в день [А.Г. Румянцев, 2008; Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России, 2010]. Биохимические показатели, характеризующие свёртывающую систему крови, оставались нормальными в течение всего периода наблюдения.

На 13 сутки после травмы под общей анестезией начата открытая репозиция, накостный металлоостеосинтез дна вертлужной впадины. В ходе операции хирургическая бригада отметила прекращение кровотечения из операционной раны, приобретение мягкими тканями тусклого, дряблого вида. Произошли падение артериального давления и остановка сердечной деятельности. Реанимационные мероприятия успеха не принесли. Через 10 минут после начала оперативного вмешательства и через 60 минут после начала реанимационных мероприятий была констатирована смерть.

«Наркозная смерть», рассматривавшаяся как одна из причин летального исхода, при судебно-медицинском исследовании была отвергнута. На стороне травмы обнаружен тромбоз глубоких вен бедра. Постмортальное генетическое типирование выявило полиморфизм *MTHFR 677CT*, *MTHFD1 G1958A*, *PAI-1 4G/4G*, *NOS3 894GT*.

Наблюдение № 5. Пациент (43 года) госпитализирован по поводу закрытого перелома наружного мыщелка левой большеберцовой кости со

смещением. Принято решение о лечении методом скелетного вытяжения. На 22 сутки со дня поступления у пациента появились боли в правой половине грудной клетки, кашель с мокротой, гипертермия. Описанная симптоматика была расценена как развитие правосторонней пневмонии. Скелетное вытяжение снято, наложена гипсовая повязка, пациент переведен в терапевтическое отделение. На 33 сутки у него отмечены кровохарканье, одышка, усиление болей в правой половине грудной клетки, рецидивировала гипертермия. По данным спиральной компьютерной томографии органов грудной клетки диагностирован массивный инфаркт долей правого лёгкого, ТЭЛА ветвей правой лёгочной артерии. В комплекс терапии включены непрямые антикоагулянты - варфарин, в процессе лечения было достигнуто среднее значение МНО - 2,5. Генетическое типирование выявило полиморфизмы *MTHFR 677 CT*, *NOS3 894GT*.

Результаты генетического типирования пациентов из наблюдений № 3 – 5 представлены ниже (таблица 45).

Анализ данных генотипирования позволяет констатировать, что у всех трех пациентов мутация в гене фактора II свертывания (протромбин *G20210→A*) и в гене фактора V свертывания крови (*FV Leiden*) отсутствовала.

Все пациенты являлись гетерозиготными носителями гена фермента *MTHFR (677CT)* вследствие полиморфизма *C677→T*. При исследовании полиморфизма *894GT* в гене фермента *NOS3* у трех пациентов выявлена форма *894GT*, т.е. они также являлись гетерозиготным носителем этого признака.

Обнаружение полиморфизма *4G/5G* в гене фермента *PAI-1* в наблюдении № 3 подтверждает, что пациентка (потерпевшая) являлась гетерозиготным носителем данного признака. Пациент № 4 относился к гомозиготам (*4G/4G*), пациент № 5 был носителем *5G/5G*.

Результаты генетического типирования пациентов с верифицированной посттравматической тромбозомболией лёгочной артерии

Наблюдение	Мутации и полиморфизм генов					Исход
	FII (G20210A)	FV (G1691A)	MTHFR 677CT	NOS3 894GT	PAI-1 (4G/5G)	
Наблюдение № 3	GG	GG	CT	GT	4G/5G	Летальный
Наблюдение № 4	GG	GG	CT	GT	4G/4G	
Наблюдение № 5	GG	GG	CT	GT	5G/5G	Выздоровление
<p><i>FII (G20210A)</i> – замена гуанина на аденин в позиции 20210 гена протромбина; <i>FV (G1691A)</i> – замена гуанина на аденин в позиции 1691 гена проакцелерина; <i>MTHFR (677CT)</i> – замена цитозина на тимин в позиции 677 гена метилентетрагидрофолатредуктазы; <i>NOS3 (894GT)</i> – замена гуанина на тимин в позиции 894 гена эндотелиальной NO-синтазы; <i>PAI-1 (4G/5G)</i> - наличие 4 гуанинов вместо 5 в структуре гена ингибитора активатора плазминогена</p>						

Таким образом, в каждом из описываемых наблюдений (наблюдения № 3 – 5) обнаружены мутации генов факторов, участвующих в работе свертывающей-противосвертывающей системы, что может быть расценено как причина возникновения тромбозомболических осложнений, несмотря на проводившуюся антикоагулянтную терапию.

Наблюдение № 6. В постановлении о назначении экспертизы сказано, что «... в период с декабря 2007 года по 06 июля 2008 года в воинской части XXXX проходил военную службу по призыву рядовой N. При призыве N жалоб на состояние здоровья не предъявлял и был признан годным для прохождения военной службы. За весь период прохождения службы неоднократно обращался за медицинской помощью с жалобами на повышенную температуру тела,

предъявлял жалобы на отечность ног, потертости и мозоли стоп после физических нагрузок.

В период с 16 по 30 апреля 2008 года к рядовому N старослужащими применялись неуставные отношения, выразившиеся в нанесении ударов руками и ногами по ногам рядового N. Принуждение нахождения его в вынужденном положении «мама моет пол». 04 мая 2008 года N вновь поступил в медпункт части с диагнозом острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ). С 15 по 20 мая 2008 года находился на лечении в медпункте части уже с диагнозом «Ревматоидный полиартрит. Суставная форма. Активная фаза. Активность 2. Соп: лакунарная ангина, легкая форма». 20.05.2008 года N с диагнозом «Ревматоидный полиартрит. Суставная форма. Активная фаза. Активность 2» был переведен в клиническую больницу областного центра в связи неэффективностью лечения в медпункте части. Согласно свидетельству о болезни от 04.07.2008 года у N выявлены заболевания: «флеботромбоз глубоких вен правой нижней конечности. Посттромбофлебитическая болезнь глубоких вен левой нижней конечности третьей стадии с умеренным нарушением кровообращения, отечно-индуративная форма. Хроническая венозная недостаточность. Анемия легкой степени тяжести. Гепатоспленомегалия. Хронический пульпит». Военной врачебной комиссией (ВВК) N признан ограниченно годным к военной службе (группа «В»). При проведении первичной экспертизы комиссия экспертов пришла к выводу, что «тромбоз сосудов нижних конечностей наиболее вероятно возник вследствие наследственной предрасположенности к этим заболеваниям, либо является последствиями имевшегося до призыва на военную службу тромбофлебита вен нижних конечностей ... о наличии возможной причинно-следственной связи между указанными заболеваниями и нанесенными «...ударами по ногам N...» и о степени вреда, причиненного здоровью N – высказаться не представилось возможным. Для установления причинно-следственной связи между указанными заболеваниями и нанесенными «...ударами по ногам N...» необходимо полное, глубокое и всестороннее обследование N с обязательным проведением генетического исследования крови N на предмет установления носительства

последним полиморфных вариантов некоторых генов системы свёртывания крови и системы фолатного цикла ...». В связи с такими выводами следователем прокуратуры было вынесено постановление о проведении дополнительной комиссионной комплексной судебно-медицинской экспертизы. С учетом предположения о наследственном характере у военнослужащего N тромбоз сосудов нижних конечностей от него и его родителей были взяты образцы крови для проведения генетического типирования на предмет наличия мутации и полиморфизмов генов-кандидатов предрасположенности к тромбофилии. Типирование полиморфных локусов *FV Leiden*, *PRT*, *MTHFR* и *MTHFD1* проводили методом энзиматической амплификации с последующей постановкой реакций рестрикции продуктов ПЦР и анализом продуктов рестрикции в агарозном геле с помощью набора «Ампликит THROMB 1» производства «Ампликит». Энзиматическую амплификацию ДНК осуществляли методом ПЦР с помощью термоциклера GeneAmp PCR System 9700 «PE Applied Biosystems». Для оценки специфичности реакции амплификации использовали положительный и отрицательный (проба без ДНК) контроля. Визуализацию продуктов рестрикции выполняли с помощью гель-документирующей системы BioDoc Analyze («Biometra»). Результаты типирования ДНК военнослужащего N представлены в таблице 46.

Исследование молекулярных механизмов тромбообразования позволяет с уверенностью говорить о том, что существуют наследуемые, а иногда и приобретенные в процессе жизни дефекты белков, которые и обуславливают предрасположенность того или иного человека к тромбообразованию [M. Ogawa et al., 2004], т.е. определяют наличие у него истинной тромбофилии.

Высокую группу риска составляют люди с такими наследственными формами тромбофилии как – мутации в гене протромбина (*G20210A*) [B. Zoller et al., 1999; Г.Л. Волков с соавт., 2005], в гене фактора V (*G1691A*) [V. Dordević et al., 2005], полиморфизм генов ответственных за синтез белков фолатного цикла метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) (*C677T*) [С.М. Баймурадова с соавт.,

2004] и метилентетрагидрофолатдегидрогеназы (*MTHFD1*) (*G1958A*) [N. Akar et al., 2001].

Таблица 46

Результаты молекулярно-генетического исследования наличия мутаций в генах фактора V свертывания крови (*FV Leiden*), фактора II свертывания (протромбин *G20210*→*A*) и полиморфизма в гене фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR* *C677*→*T*) и в гене фермента метилентетрагидрофолатдегидрогеназы (*MTHFD1* *G1958*→*A*) у военнослужащего

N

Ф.И.О.	<i>FII</i> (<i>G20210A</i>)	<i>FV</i> (<i>G1691A</i>)	<i>MTHFR</i> (<i>C677T</i>)	<i>MTHFD1</i> (<i>G1958A</i>)
Военнослужащий N	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>T/T</i>	<i>A/A</i>

Мутация *G* → *A* (*20210*) в гене протромбина приводит к повышению его уровня в крови, что способствует повышенному тромбообразованию [V. Dordević et al., 2005]. Это означает, что уже у гетерозиготного носителя могут возникнуть клинические проявления тромбоза. Мутация гена фактора V свертывания крови (проакцелерина), состоящая в замене гуанина на аденин в положении *1691*, приводит к замещению в его полипептидной цепи аргинина на глутамин в положении *506*. В результате чего фактор Va становится более устойчивым к расщепляющему действию активированного протеина C, и, следовательно, вызывает усиление прокоагулянтной активности крови по следующему механизму – снижение скорости деградации фактора Va, повышение образования тромбина и снижение инактивации активированного фактора VIII. Клиническим проявлением указанной мутации является предрасположенность к тромбозу глубоких вен [G. Grünbacher et al., 2007]. При проведении исследования ДНК крови военнослужащего N мутации в гене фактора II свертывания (протромбин *G20210*→*A*) и в гене фактора V свертывания крови (*FV Leiden*) не выявлены.

Ген *MTHFR* кодирует белок метилентетрагидрофолатредуктазу, основной фермент фолатного цикла. Мутация в этом гене приводит к снижению его активности, и, как следствие, к гипергомоцистеинемии. Гомоцистеин является независимым фактором риска для атеротромбозов и атеросклероза, его уровень в плазме связан с сосудистыми расстройствами.

В гене *MTHFR* замена *C* на *T* в положении 677 (*C677T*), приводит к замене аланина на валин в каталитическом домене в молекуле белка-фермента. У гомозигот (*677TT*) по полиморфному аллелю активность фермента *in vitro* снижена на 70%, а у гетерозигот (*C677CT*) – на 35% [И.Н. Фетисова, 2006].

В результате снижения активности фермента *MTHFR* может возникнуть легкая или умеренная гипергомоцистеинемия, что, в свою очередь, приводит к целому ряду нарушений в свертывающей системе крови.

При исследовании полиморфизма *C677→T* в гене фермента *MTHFR* у военнослужащего N выявлена форма *677TT*, т.е. он является гомозиготным носителем данного признака (таблица 46).

В связи с обнаружением гомозиготного носительства признака *677TT* у военнослужащего N, для подтверждения наследственной природы этого признака был исследован однонуклеотидный полиморфизм гена *MTHFR* в позиции 677 у отца и матери военнослужащего N. Полученные результаты приведены в таблице 47 и на рисунке 55.

Таблица 47

Результаты молекулярно-генетического исследования однонуклеотидного полиморфизма гена фермента метилентетрагидрофолатредуктазы в позиции 677 у военнослужащего N, отца и матери военнослужащего N

Ф.И.О.	Военнослужащий N	Отец N	Мать N
Локус			
<i>MTHFR</i>	<i>677TT</i>	<i>677CT</i>	<i>677TT</i>

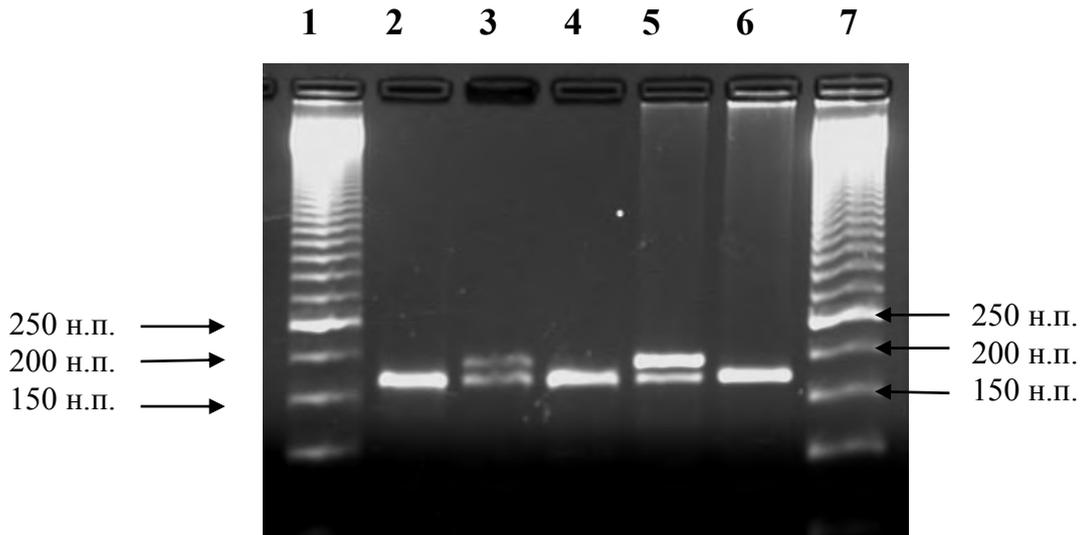


Рис. 55. Результаты электрофореза продуктов рестрикции ПЦР-амплификатов *MTHFR* (*C677T*) в 3%-ом агарозном геле (дорожки 2-6) в качестве размерного стандарта использовали 50 Base-Pair Ladder (дорожки 1 и 7). Дорожка 2 – ДНК военнослужащий N (размер ПЦР-продукта 180 н.п., генотип «677TT»), дорожка 3 – ДНК отец (размеры ПЦР-продуктов 200 и 180 н.п., генотип «677CT»), дорожка 4 – ДНК мать (размер ПЦР-продукта 180 н.п., генотип «677TT»), дорожка 5 – гетерозиготный положительный контроль (размеры ПЦР-продуктов 200 и 180 н.п., генотип «677CT»), дорожка 6 – гомозиготный положительный контроль (размер ПЦР-продукта 180 н.п., генотип «677TT»)

Таким образом, при исследовании однонуклеотидного полиморфизма (*C677→T*) в гене фермента *MTHFR* у отца выявлена форма *CT*, т.е. он является гетерозиготным носителем данного признака. Мать военнослужащего N является гомозиготным носителем признака *677TT* (таблица 47).

Следовательно, военнослужащий N унаследовал гомозиготное состояние полиморфного признака *677TT* как от отца, так и от матери. Вследствие чего активность его фермента могла быть снижена по сравнению с нормой, а, учитывая, что полиморфизм *C677T* связан с риском развития венозных и артериальных тромбозов, особенно у гомозигот по мутантному аллелю (*TT*) в позиции 677 гена фермента метилентетрагидрофолатредуктазы [R. Franchis et al., 1996; M.V. Keijzer et al., 2002], наличие такого гомозиготного состояния у военнослужащего N может являться одним из факторов развившегося тромбоза.

Что же касается однонуклеотидной замены *G1958A* в гене *MTHFD1*, то она у родителей военнослужащего в рамках проведенной экспертизы не исследовалась. Исследование на полиморфизм в гене *MTHFD1* осуществлено уже в рамках дополнительного научного исследования.

Патогенез развития тромбоза вен нижних конечностей у военнослужащего N в таком случае сводится к следующему механизму: наличие однонуклеотидной замены изменяет химическую природу белка МТНFR (фермент становится термолабильным и его активность снижается на 70%). Кроме того, полиморфизм гена *MTHFD1*, как и полиморфизм гена *MTHFR*, способствует нарушению фолатного цикла, накоплению в плазме крови гомоцистеина в концентрациях, превышающих норму. Гомоцистеин оказывает разрушающее воздействие на эндотелий сосудов, способствует активации плазменных факторов свертывания крови XII и V факторов, а также экспрессии тканевого фактора; при этом нарушается высвобождение естественных ингибиторов коагуляции и антиагрегантов – протеина С, ингибитора внешнего пути свертывания крови; снижается гликозаминогликанзависимая активация антитромбина III, подавляется активность тромбомодулина. По данным коагулограммы 29.05.2008 года у военнослужащего N установлено снижение концентрации АТ-III (антитромбина III), которая составляла 76% при норме 80-120%, а также концентрации протеина С, которая составляла 0,7, т.е. нижний уровень нормы.

Однако однократное определение концентрации гомоцистеина в плазме крови при генетических дефектах гена фермента МТНFR может не отражать истинной биохимической картины, так как она нормализуется при приеме витаминов группы В (B_6 и B_{12}), а также фолиевой кислоты [И.Я. Буртина, 2005].

Обозначенные атерогенные и тромбофилические эффекты в совокупности определяют хроническую эндотелиальную дисфункцию при гипергомоцистеинемии [С.М. Баймурадова с соавт., 2004; Ж.Г. Джанджгава, В.О. Бицадзе, 2005].

Стоит отметить, что у военнослужащего N нарушение в фолатном цикле могли носить и носили не только наследственный, но и приобретенный характер.

Нарушению в фолатном цикле в организме военнослужащего могли способствовать следующие факторы: 1) повышенное артериальное давление [O. Stanger et al., 2003, 2004], 2) алиментарная причина – диета с низким содержанием витаминов В₆ и В₁₂, фолиевой кислоты, наличие панкреатита (что уменьшает возможность всасывания вышеназванных витаминов) [O. Stanger et al., 2003, 2004], 3) проводимая терапия с использованием эуфиллина (препарат, который обладает ингибирующими свойствами для витамина В₆ и В₁₂) [А.З. Кашежева, В.С. Ефимов 2001; С.И. Жук, 2008].

Таким образом, как видно из приведенного экспертного случая, наследственные тромбофилии могут встречаться в практике судебно-медицинского эксперта при наличии тромботических осложнений у лиц молодого возраста. Для установления причинно-следственных взаимоотношений с имевшей ранее травмой необходимо проведение генетического исследования для выявления мутаций в генах кандидатах предрасположенности к тромбофилии.

Приведенные примеры экспертных случаев ставят перед судебной медициной и судебно-медицинской экспертизой задачу создания отраслевого стандарта проведения судебно-медицинских экспертиз в случаях с тромбозами сосудистого русла.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Тромботические осложнения в современной медицине представляют собой до конца не решенную проблему. Если для клиницистов основная задача состоит в том, как предупредить эти осложнения, то для судебно-медицинского эксперта тромбоз является уже случившимся фактом, и остается только его констатировать как причину смерти, либо инвалидизацию потерпевшего. Таким образом, очевидно, что оценка патогенеза, места и роли тромбоэмболического синдрома при выполнении судебно-медицинской экспертизы в отношении потерпевшего является актуальной задачей.

При возникшей необходимости оценки влияния патологического процесса на клиническое течение и исход травмы судебно-медицинский эксперт сталкивается со значительными трудностями. При этом ответственность, которая возложена на эксперта, является значительной и вряд ли ее можно переоценить. Такая ответственность обусловлена тем, что от полноты, всесторонности и обоснованности заключения во многом, если не полностью, зависит решение, которое вынесет суд. При этом решение может быть диаметрально противоположным: в одном случае оправдание, а в другом - максимально возможное суровое наказание. В приведенных экспертных примерах, содержащихся в разделе «результаты собственных исследований», рассматривается положение, что при одних и тех же исходных клинических и морфологических данных эксперты единолично, либо в составе комиссии, дают прямо противоположные выводы. Суть этих выводов сводится к простой формуле – наличие или отсутствие причинной связи между механической травмой, выполненным оперативным вмешательством (в ранний или отсроченный период), его тромботическим осложнением, последовавшей ТЭЛА и наступлением смерти, либо инвалидизации пациента. Причина таких противоречивых выводов может

быть объяснена различным уровнем подготовки судебно-медицинских экспертов и клинических врачей, современным уровнем развития научных знаний, отсутствием строгой терминологии, четкого определения содержания основных понятий. Не лишним будет отметить, что проблема требует философской оценки соотношения причиненной травмы, выполненного оперативного вмешательства и имевшим место патологическим процессом. Во многом данные трудности связаны с тем, что современная наука объясняет тромбообразование как многофакторный процесс, когда порой имеются значительные сложности выделить ведущее патогенетическое звено в развивающемся патологическом процессе. Поэтому на сегодняшний день назрела проблема стандартизации судебно-медицинских исследований случаев тромботических осложнений как при экспертизе живого лица, так и при экспертизе трупа с достижением оптимальной степени упорядоченности проведения экспертиз.

В начале проведения научных исследований в данном направлении, при анализе специальной литературы как отечественных, так и зарубежных авторов была выявлена одна закономерность: значительное количество публикаций по проблеме тромбоза среди клинических дисциплин и единичные публикации применительно к актуальным проблемам судебно-медицинской экспертизы. В частности, в поисковой сети eLibrary.ru по ключевым словам *тромбоз*, *травматология* было найдено 217 источников за 2010 – 2013 годы. При этом в той же поисковой системе по ключевым словам *тромбоз*, *судебная медицина* было выявлено всего 20 источников за период времени с 2009 по 2011 годы, т.е. соотношение источников из двух групп поиска составило значение 0,09. Осуществление поиска литературы в аналогичной системе PubMed по тем же ключевым словам – *thrombosis*, *trauma*, *forensic medicine* были получены результаты – 11305 в период времени с 1918 по 2013 год и 1312 с 1951 по 2013 годы соответственно, коэффициент соотношения источников составил 0,12. С другой стороны, стоит заметить, что при наличии большого количества вообще публикаций по данной тематике, они не охватывают всего круга вопросов,

составляющих содержание судебно-медицинской экспертизы при наличии тромботических осложнений.

Малое количество публикаций в специальной судебно-медицинской литературе может быть объяснено тем, что ТЭЛА встречается при производстве экспертиз и исследований трупа сравнительно редко. По данным проф. В.В. Жарова, количество ТЭЛА варьировало к общему количеству исследований экспертами танатологами от 0,5% до 0,75% [В.В. Жаров, И.Е. Панов, С.В. Шигеев, 2003]. В проанализированных экспертных случаях в рамках настоящего исследования за период с 2004 по 2010 годы, частота ТЭЛА к общему числу исследованных случаев в танатологическом отделе Бюро судебно-медицинской экспертизы Ростовской области составила в среднем 0,45%. По годам частота случаев смертей от ТЭЛА колебалась в пределах от 0,17% до 0,71%, что, впрочем, не противоречит вышеприведенным сведениям. По крайней мере, эти различия незначительные и находятся в пределах статистической ошибки эксперимента.

Тем не менее, полученные результаты по эпидемиологии частоты встречаемости смертельных случаев с ТЭЛА по данным Ростовского областного Бюро СМЭ были сопоставлены со сведениями, изложенными в главе «Обзор литературы». За период времени с 2004 по 2010 годы в танатологическом отделе было исследовано 31594 трупа. Таким образом, в среднем каждый месяц производилось по ~ 376 исследований.

С другой стороны, проведенное ретроспективное исследование J. Lucena и соавт. установило, что в институте судебной медицины Испании (г. Севилья) за 32 месяца было проведено 2477 вскрытий [J. Lucena et al., 2009]. Следовательно, количество судебно-медицинских исследований в 1 месяц составило около 77. Из чего следует, что объем экспертной продукции превышал в областном Бюро СМЭ РО по сравнению с объемом экспертных исследований в институте судебной медицины Испании в ~ 5 раз, а частота смертельных тромбоэмболических осложнений в соответствии со сведениями, изложенными испанскими учеными, составила 1,3% от общего числа исследований (32 трупа). По результатам собственного исследования это значение за 7 лет было равно 143 исследованиям

труппа (в среднем в год 0,45%). Таким образом, сопоставление приведенных значений свидетельствует, что тромботические осложнения со смертельным исходом испанскими экспертами были зафиксированы в 2,89 раза чаще, чем экспертами Ростовского областного Бюро СМЭ. Безусловно, полученные различия требуют объективного объяснения.

С одной стороны сравниваемые выборки сопоставимы по генотипу, что будет продемонстрировано ниже по тексту. Это утверждение основано на результатах собственного генотипирования, показавшего совпадение количества лиц с мутациями и полиморфизмами в генах-кандидатах наследственной предрасположенности к тромбофилии, лишь как одного из факторов повышенного риска развития ТО. Такое суждение согласуется и с мнением ряда авторов, утверждающих, что количество пациентов (потерпевших) во всех странах примерно одинаковое [Т.В. Авилова, 2010].

По возрасту сравниваемые группы не имели значимых различий, а именно: по данным испанских исследователей, средний возраст колебался в пределах $50,3 \pm 13,8$ лет, а по результатам собственного исследования, в зависимости от анализируемой группы, в промежутке от $45,38 \pm 4,09$ года до $73,71 \pm 2,51$ года.

С другой стороны, собственные данные свидетельствуют о незавершенности конкретного отдельного судебно-медицинского исследования, что подразумевает «пропуск» судебно-медицинским экспертом случаев смертельных ТО.

Таким образом, показатель ТЭЛА в 0,45% от общего числа всех исследований за годовой период необходимо считать показателем некачественной работы экспертного учреждения точно так же, как, по мнению R. Alikhan и A.C. Spyropoulos, летальность свыше 5% от ТЭЛА в лечебном учреждении, с учетом современных методов профилактики ВТЭО, является недопустимой [R. Alikhan, A.C. Spyropoulos, 2008].

Анализируя динамику частоты встречаемости ВТО по годам, необходимо отметить, что в исследованном временном промежутке отмечался рост фатальных тромбоэмболических осложнений, максимальное количество случаев было

отмечено в 2006 году, с некоторым последующим спадом и стабилизацией цифр в 2008–2010 годах. Динамика количества встречаемых случаев по годам приводится на рисунке 56.

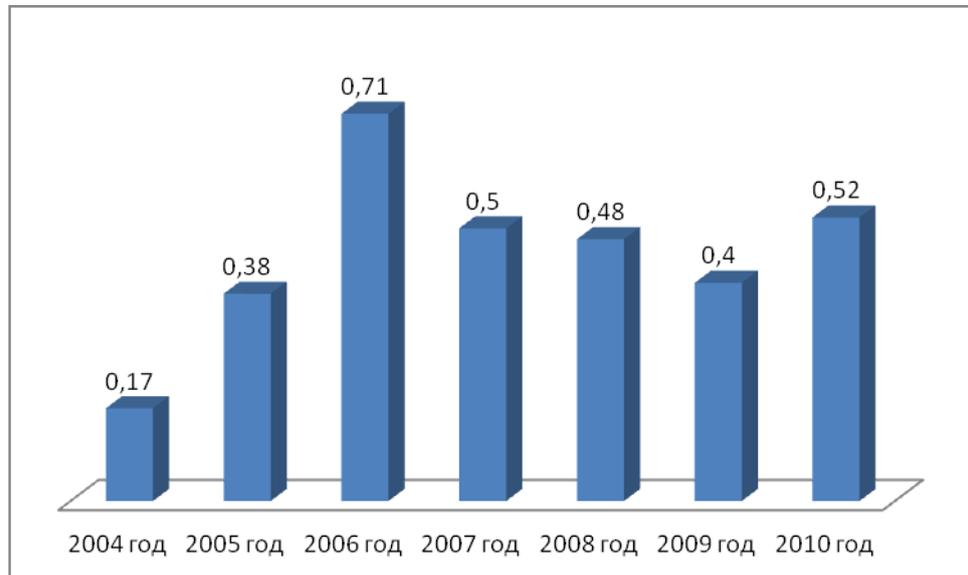


Рис. 56. Общая динамика случаев с ТЭЛА по анализируемым годам (в % по отношению к общему числу исследованных трупов за каждый год)

То есть, наблюдается некоторый волнообразный характер частоты встречаемости случаев с фатальными тромботическими осложнениями за анализируемый период времени. Выявленная закономерность не позволяет в полной мере согласиться с утверждением о росте смертности населения от венозных тромбоэмболических осложнений. В частности, по данным Р.Э. Асамова и соавт. за период наблюдения в 2001-2009 годах удельный вес ВТЭО возрос практически в 8 раз [Р.Э. Асамов с соавт., 2011]. По собственным данным, напротив, отмечается волнообразный характер с периодом роста и последующим спадом. В то же время такие данные не в полной мере согласуются с высказыванием о том, что за последние 25 лет отмечено некоторое снижение частоты возникновения ТЭЛА, в то время как общая частота ВТЭО в мужской популяции не изменилась, у женщин, наоборот, в возрасте старше 60 лет – увеличилась [M.D. Silverstein et al., 1998].

Такой волнообразный характер распределения случаев по годам предположительно можно объяснить различным количеством исследованных случаев в танатологическом отделе за каждый анализируемый год. Сравнение относительного увеличения или уменьшения объема проведенных экспертных исследований в танатологическом отделе указывает динамику, отраженную на рисунке 57.

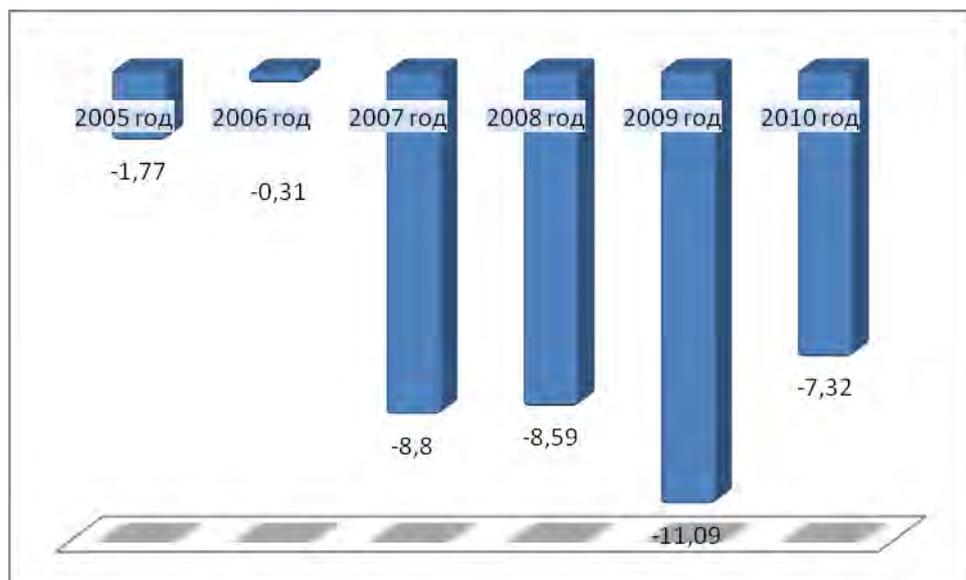


Рис. 57. Динамика объема проведенных исследований трупов за анализируемый временной промежуток (в %, нулевая точка отсчета 2004 год)

То есть, не наблюдается зависимости (закономерности) между сравниваемыми показателями – количеством исследованных трупов и количеством выявленных ТЭЛА как причин смерти.

Наиболее значимыми представляются данные, полученные при исследовании выделенной группы III танатологического отдела: потерпевшие, имевшие травму опорно-двигательного аппарата, которым в различные сроки после причинения повреждений были выполнены «агрессивные» травматолого-ортопедические операции (накостный металлоостеосинтез и пр.). В подавляющем большинстве данную группу составили потерпевшие мужского пола ($\approx 65\%$) и лишь приблизительно 1/3 данной группы составили женщины ($\approx 35\%$). Такие различия вполне закономерны, так как механической травме в большинстве

случаев подвержены лица мужского пола в трудоспособном возрасте, и концепция лечащих врачей заключается в сокращении сроков лечения и реабилитации пациента, чему способствует применение инвазивных методов лечения травмы опорно-двигательного аппарата, в частности, с использованием накостного металлоостеосинтеза.

По механизму причинения повреждений в $\approx 95\%$ всех случаев было воздействие твердых тупых предметов, как правило, вследствие дорожно-транспортных происшествий – либо столкновение автомобиля с пешеходом, либо травма внутри салона автомобиля. Средний промежуток времени после причинения травмы и выполненного оперативного вмешательства составил $15,09 \pm 2,73$ суток. Следовательно, оперативное вмешательство было выполнено в отсроченные временные промежутки, а смерть от развившейся ТЭЛА наступала через $14,43 \pm 3,05$ суток после оперативного вмешательства для мужчин, и $6,08 \pm 0,96$ суток для женщин. Таким образом, потерпевшие находились на постельном режиме, в вынужденном лежачем положении в течение одной - двух недель, что является одним из предрасполагающих факторов риска тромботических осложнений. Не без основания такой временной промежуток между выполненным оперативным вмешательством и последовавшей ТЭЛА можно назвать как «феномен второй недели».

Полученные временные промежутки клинического проявления тромбоэмболических осложнений необходимо сравнить с опубликованными данными экспертов ассоциации травматологов-ортопедов России и ассоциации флебологов России [Профилактика венозных тромбоэмболических осложнений в травматологии и ортопедии: российские клинические рекомендации, утверждены на совещании экспертов 25.06.2011]. По данным этой ассоциации, не менее половины тромбоэмболических осложнений развивались после выписки больных из стационара, когда двигательная активность пациентов оставалась ограниченной. В то же время во всех проанализированных случаях в рамках настоящего исследования со смертельными тромбоэмболиями этот факт установлен не был. Тогда как в соответствии с полученными собственными

данными смерть наступала в лечебном учреждении в послеоперационном периоде. По всей видимости, выявленное противоречие можно объяснить лишь тем, что после выписки из лечебного учреждения имевшие место тромботические осложнения не носили фатального характера. Тем не менее, характеризуя сроки клинического проявления тромботических осложнений по данным отдела экспертизы живых лиц, стоит отметить, что средний срок ТО после причинения механической травмы и выполненного оперативного вмешательства составил $43,77 \pm 5,44$ суток.

Исходя из выявленной закономерности «феномена второй недели», анализа статистически значимых различий коагулограммы и биохимических показателей системы гемостаза в группах сравнения для лиц с тромботическими осложнениями, имевшими механические повреждения и без них по данным проведенного исследования, все же для формирования научно-обоснованных экспертных выводов надо учитывать изменения этих показателей в динамике. Экспертная оценка имевших место тромботических осложнений по этим лабораторным показателям может считаться обоснованной тогда, когда в предоставленной медицинской документации имеется несколько точек сравнения (тс) – первые стуки после госпитализации (1тс), непосредственно перед оперативным вмешательством по поводу полученной травмы (2тс), через 2-3 суток после выполненного оперативного вмешательства (3тс) и на второй неделе («феномен второй недели») после выполненного оперативного вмешательства (4тс).

Изучение практических экспертных случаев позволило установить, что в подавляющем большинстве при проведении наружного исследования судебно-медицинские эксперты формально отмечают следы медицинских манипуляций. Принципиальным здесь кажется тот аспект, что в предоперационном периоде подготовки травматолого-ортопедических больных проводится профилактика тромботических осложнений с применением антикоагулянтов путем их подкожного введения в область передней стенки живота [А.Г. Румянцев, 2008; Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России, 2010]. В то же время, из

всех исследованных экспертных заключений лишь в единичных актах судебно-медицинского исследования трупа либо заключениях эксперта имеется ссылка на наличие точечных ран от инъекций в данной анатомической области. Важно отметить, что в очень редких случаях к экспертному заключению прилагалась фототаблица с наличием следов медицинских манипуляций (рисунок 58).

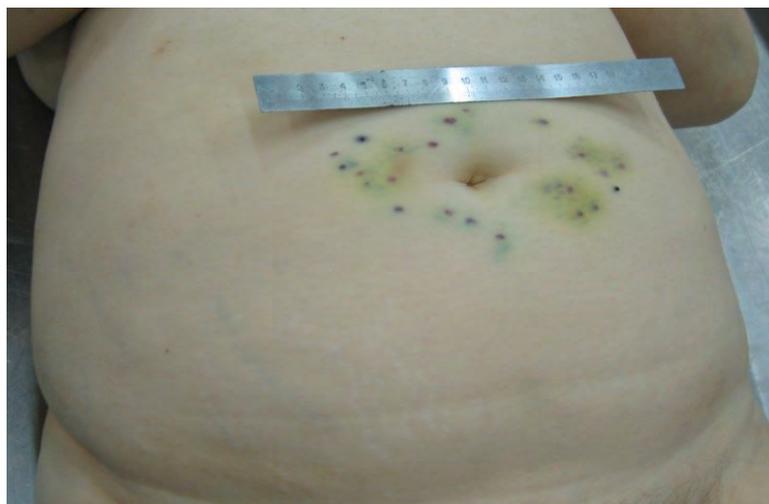


Рис. 58. Следы медицинских манипуляций профилактики тромбоэмболических осложнений в предоперационном периоде

Такое «поверхностное» отношение дает повод обвиняемой стороне и их представителям выдвинуть тезис о неадекватной, неполной и недостаточной медицинской помощи в части неспецифической и специфической профилактики тромбоза, в том числе, то, что касается длительности специфической профилактики, либо отсутствие должного лабораторного контроля системы гемостаза. В таком случае при отсутствии полной и достаточной медицинской информации ятрогенное происхождение тромбоза выглядит довольно убедительным или, по крайней мере, нельзя исключить. С учетом правовых норм оказания медицинской помощи вполне обосновано и отражение в медицинской документации информации о том, что пациент был предупрежден, с какой целью и как выполняется профилактика тромботических осложнений в пред- и послеоперационном периодах. Тем не менее, наличие такой информации не

позволяет говорить об адекватности профилактики. Не лишним будет повториться, что среди клиницистов существует высоко обоснованное суждение: *«с практической точки зрения целесообразно считать, что без профилактики развития ТГВНК при повреждениях и оперативном лечении, сочетанной травме и постельном режиме - тромбоз является закономерностью»* [С.С. Копенкин, 2005]. Такое утверждение не противоречит мнению J.A. Molina и соавт., высказывающих суждение, что венозный тромбоз потенциально предотвратим, особенно в тех лечебных учреждениях, которые активно занимаются его профилактикой [J.A. Molina et al., 2009].

Не стоит забывать, что оперативное вмешательство само по себе является одним из существенных факторов риска возникновения тромбоза. В качестве подтверждения этого высказывания достаточно сравнить коэффициент относительного риска тромботических осложнений у потерпевших с травмами опорно-двигательного аппарата вне зависимости от наличия или отсутствия венозных тромбоемболических осложнений и без учета способа предполагаемого оперативного вмешательства, который составил $10,75 \pm 0,67$ и $9,79 \pm 0,54$ соответственно.

Еще одним из дефектов оформления экспертных заключений по данной тематике является тот факт, что далеко не во всех экспертных исследованиях при оформлении конспекта истории болезни указывается группа крови потерпевшего по системе АВО. Проведенный W. Cohen анализ указывает на то, что группа крови может выступать одним из факторов риска развития тромботических осложнений. По данным его исследования риск тромбоза в 14,4 раза больше для лиц, имеющих группу крови АВ [W. Cohen et al., 2012]. Однако проведенное нами исследование не позволило подтвердить наличие такой взаимосвязи. Скорее всего, данное противоречие обусловлено подбором групп для исследования. Так в настоящей работе делался акцент именно на потерпевших, имеющих травму опорно-двигательного аппарата, в то время как в цитируемом источнике изучались лица с тромбозом глубоких вен без наличия механических повреждений в анамнезе.

Классическим представлением о причинах и патогенезе тромботических осложнений является теория Р. Вирхова о триаде причин тромбоза: нарушение целостности стенки сосуда, нарушение тока крови и функции белков крови. Работа Р. Вирхова способствовала новым исследованиям по объяснению механизма тромбообразования (тромбогенеза), в частности тромбов венозного русла и развития тромбоэмболии легочной артерии [цит. по J. Cervantes, G. Rojas, 2005; C.N. Vagot, R. Arya 2008]. Новые сведения о возможных изменениях в сосудистой стенке, биохимические особенности факторов свертывания крови лишь дополняют эту теорию. В последние десятилетия из-за бурного развития молекулярной биологии большое внимание стали уделять наследственным факторам предрасположенности к тромбообразованию. Известны точечные мутации и полиморфные участки в генах, ответственных за синтез белков плазменных факторов свертывания крови, сосудисто-тромбоцитарного звена, претендующие на роль генов-кандидатов предрасположенности к повышенному тромбообразованию. Введено понятие – наследственная тромбофилия, т.е. одним из факторов, способствующих развитию тромботического осложнения, может быть и вовремя не выявленная наследственная предрасположенность, что в практической медицине в настоящее время не учитывается при проведении «рутинных» методов исследования в той же предоперационной подготовке потерпевшего или для таргетной терапии ТО. Ретроспективный анализ отобранных экспертных заключений показал, что ни один из лечащих врачей не предпринимал попыток к применению генетических методов исследования в предоперационном периоде.

Иначе говоря, приступая к проведению судебно-медицинской экспертизы по таким случаям, надо четко осознавать, что тромботические осложнения представляют собой многофакторный патологический процесс, обусловленный определенным количеством факторов риска, которые явно не в равной степени оказали свое влияние на прогресс патологического процесса, приведшего к фатальному исходу. Предложено выделить следующие группы факторов риска [P. Prandoni et al., 2011]:

- I. наследственные
- II. приобретенные
 - a. постоянные приобретенные (онкозаболевания, миелопролиферативные заболевания, парапротеинемические гемобластозы)
 - b. транзиторные (механические повреждения, оперативные вмешательства, беременность, гормональные контрацептивы, васкулиты, длительные перелеты и переезды и пр.)
 - c. спровоцированные (синдром отмены антикоагулянтов)
- III. иные факторы риска

Согласно данной классификации риски повышенного тромбообразования могут носить как постоянный, так и временный характер [J.V. Segal et al., 2009]. Наличие наследственных факторов риска, обусловленных мутациями и полиморфизмами в генах, имеющих отношение к свертывающей и противосвертывающей системам, а также в тромболитической системе, надо относить к постоянным рискам, которые с течением времени не устраняются.

Для III группы при анализе случаев танатологического отдела в соответствии с данной классификацией усматриваются факторы риска транзиторного характера, и не исключены имеющиеся наследственные факторы предрасположенности.

Наличие факторов предрасположенности к повышенному тромбообразованию однозначно вызывает сложности у судебно-медицинского эксперта в трактовке танатогенеза. Скрытый генетический дефект может способствовать переводу условно-патогенного воздействия в разряд патогенных, вызвать развитие тромботического осложнения и, как следствие, запустит танатогенетический механизм [Ю.М. Падеров, 2011]. Еще в 20-е годы прошлого столетия Г.В. Шор говорил: «Только признаки генотипической конституции являются постоянной нагрузкой на чашу *«жизненных весов»*, по крайней мере, судя по существующему мнению в конституциологии» [Г.В. Шор, 2002]. Хотя не факт, что наличие наследственной предрасположенности проявит себя фенотипически, всегда существует какая-то определенная доля вероятности.

В мировой практике молекулярные тесты становятся все более доступными для проведения рутинных исследований. Эти тесты широко используются в клинической медицине. Их точность зависит от применяемых методов генетического типирования [I. Garagiola et al., 2003]. Результаты новых генетических исследований позволяют по-новому трактовать патологические процессы. Вполне уместна аналогия с проблемой внезапной смерти новорожденного. Так, новые генетические данные, освещающие эту проблему, заставили пересмотреть принципы английского законодательства [S.H. Opdal, T.O. Rognum, 2004]. Вполне возможно, что генетическое типирование при производстве судебно-медицинских экспертиз позволит кардинально изменить подходы к формулированию выводов судебно-медицинским экспертом.

Тем не менее, несмотря на различия в существующих классификациях по оценке тромботических осложнений, их объединяет одна особенность - наличие критерия наследственного фактора, а именно мутаций и полиморфизмов в генах-кандидатах наследственной предрасположенности. Присутствие мутаций либо полиморфных аллелей в генах предполагает с течением времени развитие тромбоза, без конкретики степени вероятности развития этого осложнения.

Британский комитет по гематологическим стандартам в 1990 году разделил наследственные нарушения свертывания, при которых реально существует повышенная тенденция к развитию тромбоза, и нарушения, которые только, вероятно, связаны с тромбофилией:

- Точно установленные причины тромбофилии:

1. дефицит антитромбина III (1965 г.)
2. дефицит протеина S (1984 г.)
3. дефицит протеина C (1987 г.)
4. Лейденовская мутация (1993 г.)

- Вероятные причины тромбофилии:

1. дефицит плазминогена
2. дефицит активатора плазминогена
3. дефицит кофактора гепарина II

4. дефицит XII фактора
5. избыток ингибитора фибринолиза
6. высокий уровень гликопротеина плазмы богатого гистидином
7. дисфибриногенемия
8. гомоцистеинемия

Согласно этой классификации, наиболее частыми причинами врожденной тромбофилии являются: дефицит антитромбина III, дефицит протеина S, дефицит протеина C и открытая в 1993 году Лейденовская мутация или резистентность к активированному протеину C. Из чего следует, что именно эти 4 формы наследственного расстройства гемостаза прежде всего следует включать в круг дифференциальной диагностики при подозрении на тромбофилию [U.H. Winkler, 1998].

С некоторыми отличиями, но по тому же принципу существует иная классификация, при которой наследственные факторы подразделены на –

1) строгие факторы риска (мутации в генах, ответственных за синтез антитромбина, протеина C и S);

2) умеренные факторы риска тромбообразования, к которым относят мутации в генах, ответственных за синтез плазменных факторов свертывания крови FII и FV;

3) слабые факторы риска развития тромботических осложнений в виде полиморфизмов в генах, ответственных за синтез фибриногена (FGB), синтез белков, участвующих в процессах фибринолиза (PAI-1), гипергомоцистеинемии (MTHFR) [P.H. Reitsma, 2015].

Сравнение двух приводимых классификаций указывает и на наличие противоречий, в частности, в отношении мутаций в генах, кодирующих белки FII и FV факторов свертывания крови.

Поэтому ретроспективно, при анализе экспертных заключений и актов судебно-медицинского исследования трупа, было проведено генетическое типирование на наиболее часто упоминаемые в качестве наследственных факторов предрасположенности биологического материала в случаях с

тромботическими осложнениями после причиненной механической травмы и выполненного впоследствии оперативного вмешательства. Типирование полиморфных локусов проведено в генах *FV G1691A*, *FII G20210A*, *MTHFR 677 CT*, *FGB -455 G/A*, *NOS3 894GT* и *PAI-1 -675 5G/4G*, т.е. относящихся к умеренным и/или слабым факторам риска тромботических осложнений в соответствии с вышеприведенной классификацией.

Сравнение результатов генетического типирования проводили с группами, где заведомо был ТГВНК, подтвержденный клиническими и инструментальными методами исследования, но где однозначно было исключено предшествовавшее механическое воздействие. Дополнительно проводили сравнение с группами обследованных, где объективно зафиксирована травма опорно-двигательного аппарата, но не имели место клинические лабораторные объективные признаки ТГВНК, и с группой лиц, признанных практически здоровыми.

Обсуждая результаты генетического типирования, в первую очередь стоит остановиться на точечных мутациях в генах *FII* и *FV* факторов свертывания крови, считающихся уже классическими мутациями *FII G20210A* и *FV G1691A* наследственных форм тромбофилии [P.M. Ridker et al., 1995; S.R. Poort et al., 1996; C. Butt et al., 2003; P.H. Reitsma, F.R. Rosendaal, 2007]. За последние десятилетия ассоциациям выявленных мутаций с венозными тромбозами посвящены тысячи научных исследований. Результаты генетического типирования в группе практически здоровых людей на территории Ростовской области в возрасте около 25 лет ($25,32 \pm 0,44$ года) показали, что гетерозиготные носители представлены в исследуемой IVG группе с частотой 4,0% и 3,0%, что не противоречит опубликованным научным данным [C. Butt et al., 2003; P.H. Reitsma, F.R. Rosendaal, 2007]. Во IIG группе с ТГВНК частота гетерозиготных носителей составила 4,0% и 2,67%. При этом возраст данной группы обследованных лиц составил $53,95 \pm 2,29$ года. Различия в возрасте носили статистически значимые отличия в сравнении с IVG группой (практически здоровых людей). С учетом сведений из научной литературы об увеличении риска развития тромботических осложнений в несколько раз [F.R. Rosendaal et al., 1997; S. Doix et al., 2003], надо

полагать, что у обследованных лиц IVG группы с возрастом будут выявлены клинические и морфологические признаки ТГВНК.

В то же время ни в IG, ни в IIIГ группах не было выявлено гетерозиготных носителей с точечными мутациями в генах *FII G20210A* и *FV G1691A*. Лишь как одно из объяснений, и вряд ли единственное, это малая выборка обследованных в IG группе. Однако это объяснение невозможно для IIIГ группы, где количество обследованных было сопоставимо с группами IIГ и IVG, что позволяет утверждать о бесперспективности генетического типирования потерпевших граждан на наличие этих точечных мутаций. Такое суждение согласуется с выводами группы ученых The Johns Hopkins University Evidence-based Practice Center [J.B. Segal et al., 2009] и дополняет их мнение М. Makris [М. Makris, 2012], обсуждавших положительные и отрицательные стороны использования генотипирования по точечной мутации *FV G1691A*. Однако М. Makris рассматривал выявление точечной мутации с позиций частого и неоправданного назначения клиницистами данного лабораторного исследования, делая акцент на том, что даже при выявлении этой миссенс мутации с заменой в белке FV Arg506Gln, что делает его менее чувствительным к инактивации активированным протеином С, не влечет за собой каких-либо кардинальных изменений в профилактике и лечении тромботических осложнений [М. Makris, 2012].

Несколько отличные результаты в отношении умерших от ТЭЛА при наличии точечных мутаций в генах *FII G20210A* и *FV G1691A* были получены итальянскими учеными [V. Fineschi et al., 2012]. Ретроспективным анализом случаев смерти потерпевших с механической травмой от ТЭЛА за десятилетний период было выявлено 20 летальных случаев, среди которых в четырех установлено у потерпевших наличие данных точечных мутаций, причем, в трех - *FII G20210A*, и в одном - *FV G1691A*. Однако в этом исследовании обращает на себя внимание возраст умерших, среднее значение которого составило $76,25 \pm 4,73$ года, в то время, как известно, что возраст потерпевшего сам по себе является фактором риска повышенного тромбообразования.

Следовательно, с учетом полученных результатов, исходя из эффективности проведения генетического типирования потерпевших с тромботическими осложнениями на наличие точечных мутаций *FII G20210A* и *FV G1691A* необходимо собирать семейный анамнез, в частности выяснить наличие эпизодов тромбоза, как у самого потерпевшего, так и у его ближайших родственников, наличие или отсутствие прерываний беременности (невынашивание беременности), а также наличие отрицательных результатов генетического типирования в отношении иных генов кандидатов наследственной предрасположенности к тромбофилии.

Тем не менее, в исследованной группе с тромботическими осложнениями преобладали лица с полиморфизмами в генах *MTHFR 677 CT*, *PAI-1 -675 5G/4G*, *NOS3 894GT*, о чем более подробно изложено ниже по тексту.

Обсуждая полученные результаты о количестве лиц в сравниваемых группах, имевших полиморфные аллели в гене *MTHFR 677CT*, стоит отметить, что фермент метилентетрагидрофолатредуктаза - играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Среди лиц IIГ группы «дикий» генотип *CC* встретился в 52,0%, гетерозиготы *CT* в 38,67%, гомозиготы *TT* в 9,33% соответственно. При этом, частота аллеля *C* составила 0,71, а аллеля *T* 0,29. В исследовании было установлено, что в группе с тромботическими осложнениями механической травмы гетерозиготных носителей с аллелем *CT* было 66,67%, гомозиготных носителей с аллелем *TT* 16,67%, что значительно выше по отношению к сравниваемым группам (IIГ, IIIГ, IVГ). Т.е., одной из ведущих причин тромботических осложнений у потерпевших явилась дисфункция эндотелия, обусловленная повышенным уровнем гомоцистеина.

Результаты генотипирования лиц из IIГ группы по количеству случаев с наличием однонуклеотидных полиморфизмов в гене *PAI-1* были представлены следующим образом: «дикий» генотип встретился лишь в 6,67% от всех случаев, гетерозиготы составили 56,0% и мутантные гомозиготы 37,33%. Как следствие, у лиц во IIГ группе, так и у лиц в IГ группе за счет повышенного уровня фермента PAI-1 в плазме крови была снижена способность к лизису вновь образованного

тромба. Стоит обратить внимание, что по данным литературы, полиморфизм *4G/5G* в гене *PAI-1* особенно заметно коррелирует со средними уровнями PAI-1 в крови при наличии ожирения [Н.О. Kim et al., 2011]. Тем не менее, различий между группами сравнения при анализе полученных данных по танатологическому отделу в отношении толщины ПЖК на передней стенке груди и живота обнаружено не было, как среди мужчин, так и среди женщин, т.е. по данному фактору риска группы были однородными. Таким образом, если повышенное питание в какой-либо степени и влияло на усиленное тромбообразование, то это влияние во всех группах было равнозначным.

Давая характеристику количеству лиц (IG) с полиморфными локусами в гене *NOS3*, стоит отметить, что «дикий» генотип по гену *NOS3 894GG* встретился в 16,67% случаев, гетерозиготы *894GT* в 83,33%. Как следствие, у большинства потерпевших отсутствовала адекватная реакция сосудистой стенки на изменение концентрации кислорода в зоне травмирования.

Таким образом, у описываемых пациентов была выявлена наследственная предрасположенность к тромбофилии по генам, способствующим нарушению функции эндотелия за счёт дисбаланса в системе фолатного цикла и повышению содержания гомоцистеина в плазме крови, было выявлено нарушение функции лизиса тромба, дисбаланс в релаксации сосудистой стенки.

Результаты генетического исследования биоматериала погибших пациентов позволяют предполагать следующий патогенетический механизм дефекта тромбообразования - мутации в гене *MTHFR* сопровождаются повышением уровня гомоцистеина, что приводит к повреждению и дисфункции эндотелия, возможно, к обнажению базальной мембраны сосудов. Вызванные морфофункциональные нарушения ускоряют процессы тромбообразования за счет активации сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза.

Наличие мутации в гене *PAI-1 -675 5G/4G* у пациентов привело к недостаточности лизиса формирующихся тромбов глубоких вен нижней конечности. Мутация *NOS3 894GT* способствовала замедлению скорости кровотока за счет нарушения регуляции диаметра сосудов.

Анализ медицинской документации, подтверждающий, что в данных экспертных случаях проводилась стандартная тромбопрофилактика гепарином, с учетом полученных генетических данных, позволяет утверждать, что применение в описанных случаях гепарина, влияющего преимущественно на плазменное звено системы гемостаза, не могло быть эффективным и патогенетически обоснованным, поскольку у погибших пациентов имелись генетически обусловленные дефекты сосудисто-тромбоцитарного сегмента гемостаза.

Надо полагать, что своевременное распознавание генетических мутаций позволит вносить дополнения в профилактику тромбозных осложнений, например, включение в ее комплекс препаратов, способствующих снижению уровня гомоцистеина и оказывающих релаксирующее действие на сосудистую стенку.

Применяемые стандарты профилактики тромбозных осложнений не могут считаться эффективными при наличии факторов наследственной предрасположенности к тромбофилии. Одним из направлений усовершенствования профилактики тромбозных осложнений травм и плановых оперативных вмешательств может стать генетическое типирование пациентов с целью индивидуализации антикоагулянтной терапии.

При сравнении коэффициента риска развития тромбоза, общепринятого международными экспертами по вопросам тромботических осложнений, были установлены статистически значимые различия. Эти различия определены в значении коэффициента в группе с тромботическими осложнениями без каких-либо механических воздействий (IG) в сравнении с группами потерпевших, у которых была травма ОДА, независимо имел место или нет тромбоз глубоких вен нижних конечностей (IG и IIIG). При этом сравниваемый коэффициент соответственно в группах IG и IIIG между собой не дал никаких статистически значимых различий. Поэтому для группы лиц с травмой ОДА и последовавшим ВТЭО (IG) представляется следующая патогенетическая (причинная) связь возникших тромботических осложнений в виде схемы (рисунок 59).

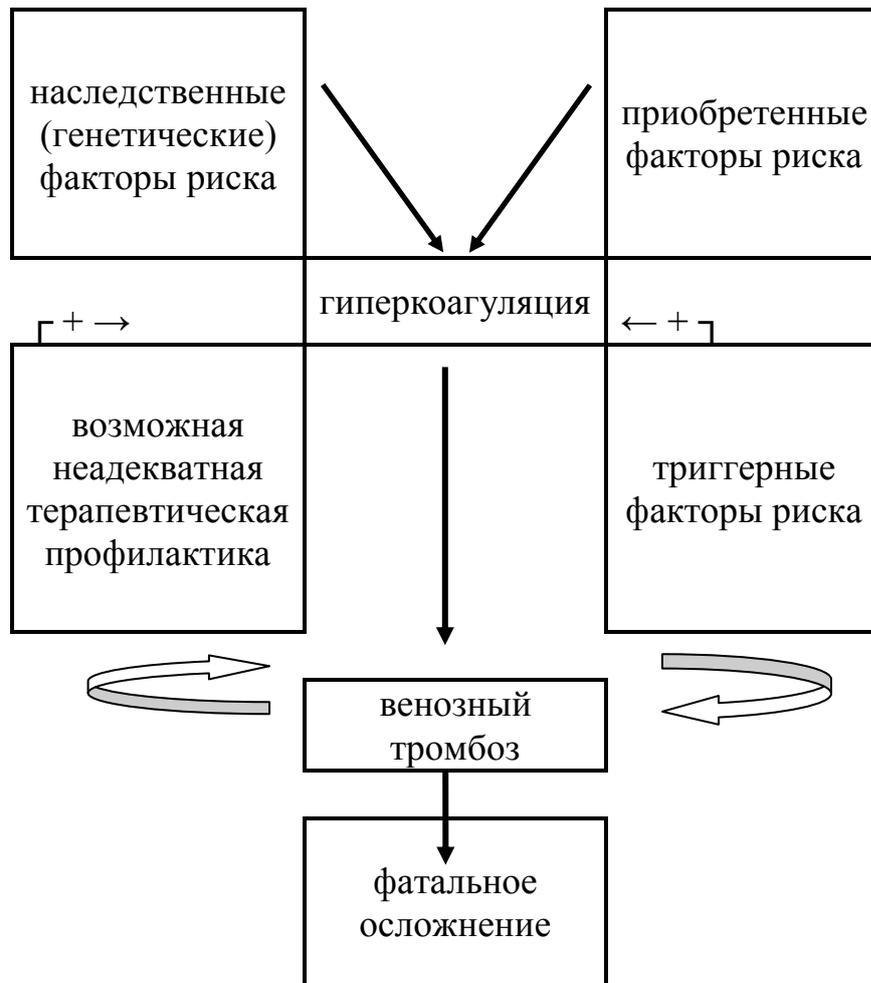


Рис. 59. Патогенетические связи между механической травмой и последовавшим венозным тромбозэмболическим осложнением

Ключевым моментом в предлагаемой схеме является наличие триггерных факторов риска, под которыми надо понимать любые провоцирующие факторы, в том числе и механическое воздействие (или оперативное вмешательство), приводящие к первоначальному выбросу факторов свертывания, концентрация которых достаточна для запуска процессов тромбообразования.

В то же время стоит оговориться, что, несмотря на полученные различия в количестве лиц с мутациями и полиморфизмами в исследуемых генах, формулировать экспертные выводы лишь на одном генетическом типировании еще рано. Как подтверждение этому, не исключена ошибка при постановке генетического диагноза по техническим причинам, на что обращают внимание I. Garagiola и соавт. [I. Garagiola et al., 2003], которые рекомендуют полученные

данные генетического исследования сопоставлять с данными фенотипа и клиническим течением болезни для того чтобы исключить как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты генетического типирования.

Таким образом, при проведении судебно-медицинского исследования в отношении лиц, умерших от ТЭЛА с предшествовавшей ей травмой и выполненным оперативным вмешательством по поводу полученных повреждений необходимо придерживаться строгой методологии. Обязательная комплексная оценка результатов секционного исследования с учетом данных гистологического исследования направленного на установление давности формирования тромба. Проведение генетического типирования на предмет наличия точечных мутаций и полиморфизмов в выше обозначенных генах, при этом акцент в генетическом типировании в первую очередь необходимо делать на поиск полиморфизмов в генах *MTHFR 677 CT*, *PAI-1 -675 5G/4G*, *NOS3 894GT*. Тщательный анализ имеющихся клинических данных с учетом факторов риска как приобретенного, так и транзиторного характера и подсчета коэффициента риска тромбоза. Принципиальным также является и оценка судебно-медицинским экспертом совместно с клиническими врачами (в том числе со специалистами в области гематологии-трансфузиологии и клинической фармакологии) адекватности проведенной неспецифической и специфической профилактики тромботических осложнений. Схематично данная методология изображена в таблице 48.

Характеризуя сезонную встречаемость тромботических осложнений, стоит пояснить, что в специальной литературе данный вопрос освещен очень слабо. Что же касается сезонности ТО в практике судебно-медицинского эксперта, проведенный анализ литературы показал, что такие сведения вообще отсутствуют. С другой стороны, литературные источники в отношении венозного тромбоэмболизма и зависимости от сезона года носят противоречивый характер. В частности, по данным В.А. Воробьевой и И.А. Пономаревой (2009) [В.А. Воробьева, И.А. Пономарева, 2009] при анализе летальных случаев в лечебном учреждении утверждается, что наибольшее количество ТО случается в

летний период, что составляет 27,6%. По данным же проведенного метанализа F. Dentali и соавт. (2011) [F. Dentali et al., 2011]: наибольшее количество случаев венозного тромбоза было зафиксировано в зимний период, из месяцев наиболее часто встречались такие случаи в январе-месяце, но это касалось лишь идиопатического тромбоза. По данным же M. Gallerani и соавт. (2004) [M. Gallerani et al., 2004]: тромбоз глубоких вен наиболее часто встречался в зимнее время, но месяц, который они указывают, это декабрь.

Таблица 48

Методология судебно-медицинской оценки смертельных случаев ТЭЛА

ТЭЛА	результаты клинического исследования	наличие факторов риска	приобретенные транзиторные
		профилактика тромботических осложнений	неспецифическая
			специфическая
		результаты секционного исследования	наружное исследование
	внутреннее исследование		
	гистологическое исследование источника ТЭЛА		установление давности формирования тромба
	<i>MTHFR C677T</i>		
	<i>PAI-1 -675 5G/4G</i>		
	<i>NOS3 G894T</i>		
	проведение генетического исследования на предмет наличия точечных мутаций и полиморфизмов в генах кандидатах наследственной предрасположенности к тромбофилии	<i>FGB -455 G/A</i>	
<i>FII G20210A</i>			
<i>FV G1691A</i>			

Результаты собственного исследования говорят о наличии существенных различий в четырех выделенных группах. I группу обследованных лиц логично было сопоставить с литературными данными о сезонной встречаемости идиопатического тромбоза. Сезонный пик был отмечен в апреле и октябре, что противоречит данным M. Gallerani и соавт. (2004) [M. Gallerani et al.,

2004]. Связь между зимним временем и ТЭЛА ими объясняется низкой температурой окружающей среды. Однако эти же результаты согласуются с данными Р.Э. Асамова и соавт., также установившими снижение частоты встречаемости ВТЭО по мере снижения температуры окружающей среды [Р.Э. Асамов с соавт., 2011].

В то же время для объяснения весеннего пика наиболее вероятно надо исходить из традиционных представлений, что тромботические осложнения обусловлены с одной стороны триадой Р. Вирхова [цит. по D.R. Kumar et al., 2010], а с другой стороны имеющимися наследственными факторами предрасположенности к повышенному тромбообразованию [Г.Л. Волков с соавт., 2005]. Однако из всей совокупности известных генов кандидатов наследственной предрасположенности – *FII (G20210A)*, *FV (G1691A)*, *MTHFR (C677T)*, *PAI-1*, *FGB (-455 G/A)*, *NOS3 894GT* и пр., весенний сезонный пик может быть объяснен лишь мутацией в генах фолатного цикла, связанной с повышенным уровнем гомоцистеина, как независимого фактора риска тромботических осложнений [И.Н. Фетисова, 2006]. Доказано, что витамины группы В способны нормализовать уровень гомоцистеина [И.Н. Фетисова, 2006], а весенний период считается временем гиповитаминоза [J. McGrath et al., 2007], что согласуется с вышеприведенными данными по частоте встречаемости полиморфных аллелей. Во II группе наибольшее число случаев тромботических осложнений отмечено осенью, что не исключает связь с максимальным количеством дорожно-транспортных происшествий в это время года [К.Л. Кравченко, С.А. Язев, Г.В. Гречаный, 2005; С.В. Базанов, 2012; Э.В. Рахматуллин, 2014]. Для III группы максимальный пик был в зимнее время, что, с одной стороны, не противоречит данным М. Gallerani и соавт. (2004) [M. Gallerani et al., 2004], однако имеются различия со II группой. Притом, что механизм образования повреждений у лиц в этих группах был однотипным, половозрастные различия несущественные. Существенным различием было то, что к III группе применялись «агрессивные» методы лечения травмы ОДА. Характеризуя V группу (по данным отдела экспертизы живых лиц), можно утверждать, что пик был летом. Однако такой

результат нельзя объяснить ни наличием наследственной предрасположенности, ни различием в возрасте обследуемых лиц. Методы лечения данных потерпевших были сходны с III группой, поэтому единственное объяснение может быть связано с тем, что в отношении данной группы делать выводы еще рано по причине малой выборки (14 пациентов (потерпевших) за 7 лет).

Таким образом, в проведенном исследовании была выявлена слабая сезонная связь между тромботическими осложнениями у лиц, перенесших травму и оперативное вмешательство. Поэтому время года не стоит считать одной из причин сосудистой патологии, обусловившей тромбообразование, и скорее всего пики встречаемости случаев с ТО для групп лиц с травмой в анамнезе объясняются большим количеством потерпевших в данный период времени.

Тем не менее, при анализе тромботических осложнений в танатологическом отделе и отделе экспертизы живых лиц не было четкого диагностического критерия, который мог бы позволить при проведении морфологических исследований – секционного исследования трупа, гистологического исследования отобранного материала обосновать прижизненное повышенное содержание гомоцистеина в плазме крови у данных потерпевших, что потребовало проведение экспериментального исследования. Сочетание описательного метода с моделированием экспериментального исследования позволило наиболее правильно и всесторонне изучить вопрос о механизме тромбообразования в условиях причинения механических повреждений на фоне повышенного уровня гомоцистеина.

Гомоцистеин - это аминокислота с формулой $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, которая является гомологом аминокислоты цистеина и отличается от нее на одну метиленовую группу (-CH₂-). Гомоцистеин биосинтезируется из метионина, удалением терминальной Cε метильной группы. Он может быть обратно конвертирован в метионин при помощи витаминов В-группы [S.P. Durmazlar et al., 2009; D.M. Cheng et al., 2010].

В течение жизни уровень гомоцистеина в крови постепенно повышается. До периода полового созревания концентрация гомоцистеина у мальчиков и девочек

примерно одинаковы (около 5 мкмоль/л). В период полового созревания она повышается до 6-7 мкмоль/л, при этом у мальчиков это более выражено, чем у девочек. У взрослых концентрация ГЦ колеблется в интервале 10-11 мкмоль/л, у мужчин этот показатель обычно выше, чем у женщин. Тем не менее, у женщин скорость нарастания концентрации выше, чем у мужчин. Постепенное нарастание уровня гомоцистеина с возрастом объясняют снижением функции почек, а более высокое содержание у мужчин - большей мышечной массой [C.Y. Miao et al., 2005].

ГГЦ приводит к дисфункции эндотелия, возможно к нарушению синтеза NO, пролиферации стенки сосудов, к усилению перекисного окисления липидов, нарушению баланса в гемостазе, при этом повышается риск развития тромбоза, в том числе и глубоких вен нижних конечностей (ТГВНК) [S. Dayal, S.R. Lentz, 2005; A. Wong et al., 2006; M.S. Jamaluddin et al., 2007].

Однако стоит отметить, что в научной литературе практически отсутствуют конкретные указания на наличие таких морфологических маркеров, поэтому, была выполнена серия экспериментов на лабораторных животных, находившихся в состоянии умеренно повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови с механической травмой задних конечностей. После выведения животных из эксперимента были изучены морфометрические показатели сосудистого русла в зоне механической травмы и на контралатеральной (не травмированной) конечности.

Что касается адекватности выбранной экспериментальной модели с последующей экстраполяцией полученных в ходе выполнения данной работы результатов на патологические процессы, происходящие в организме человека, то, по крайней мере, в части механического воздействия на конечность они реально сопоставимы. На данное утверждение указывает сравнение результатов морфометрического исследования в отношении диаметра и толщины стенки вен в экспериментальных группах животных, которым было причинено механическое повреждение костей голени с литературными данными ультразвукового исследования диаметра и толщины стенки вен у пациентов с переломами костей

голени в раннем послеоперационном периоде с погружным остеосинтезом на 8-10 сутки после выполненного оперативного вмешательства [В.В. Писарев с соавт., 2009]. Как в настоящем исследовании, так и по данным клинко-инструментального исследования, в остром периоде механической травмы отмечается увеличение диаметра и толщины стенки вен на стороне травмирования. Таким образом, реакция венозной системы на острую травму характеризуется расширением вен, а, следовательно, снижением скорости венозного кровотока в поврежденной области [В.В. Писарев с соавт., 2009].

Для моделирования гипергомоцистеинемии животных содержали в условиях диеты с повышенным содержанием метионина. Введение лабораторным животным метионина внутривенно позволило увеличить концентрацию гомоцистеина в плазме крови до значений $12,14 \pm 0,92$ мкмоль/л, что превысило содержание ГЦ по сравнению с контрольной группой животных в 1,48 раза. На фоне повышенного уровня ГЦ у лабораторных животных формировали закрытый перелом костей голени. К первому месяцу эксперимента уровень ГЦ в группе лабораторных животных, находившихся на метиониновой диете со сформированным переломом костей голени, составил $23,53 \pm 1,83$ мкмоль/л, т.е. был значительно больше, чем в группе животных, не имевших механической травмы, но находившихся на метиониновой диете. Полученные экспериментальные результаты в отношении уровня ГЦ также были сопоставимы с клинко-лабораторными данными у лиц с венозными тромбозами. Так у лиц без венозных тромбозов концентрация ГЦ составила $9,95 \pm 0,47$ мкмоль/л, в то время как у лиц с венозными тромбозами этот показатель был равен $13,1 \pm 1,0$ мкмоль/л [А.С. Петриков с соавт., 2011]. Таким образом, как в части механического воздействия, так и в части уровня ГЦ выбранная экспериментальная модель механической травмы в условиях ГЦ является вполне адекватной для экстраполяции на патологические процессы в организме человека.

Считается, что ГЦ является наиболее информативным показателем для прогноза тромботических осложнений [А. Gupta et al., 1998; Е.И. Баранова, О.О. Большакова, 2001; Р. Hainaut et al., 2002; Т.В. Вавилова, 2010]. Однако в

повседневной клинической и/или экспертной практике не так часто можно встретить целенаправленное определение уровня ГЦ у пациента с целью прогноза риска тромботических осложнений или для установления причинно-следственной связи между имеющимся повреждением и возникшим тромботическим осложнением. Мало того, при анализе всего отобранного экспертного материала такого лабораторного теста не было выявлено ни разу. Поэтому тем более непонятно влияние травматической болезни на уровень ГЦ в плазме крови. Все причины, приводящие к ГГЦ, подразделяют на врожденные и приобретенные. К врожденным относятся мутации генов ферментов, участвующих в обмене ГЦ: метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), редуктазы метионинсинтетазы (MTRR), цистатион- β -синтетазы (CBS), бетаин-гомоцистеин-метилентрансферазы (BHMT) [W. Hagen et al., 2001; M. Fukasawa et al., 2003; И.Н. Фетисова, 2006; I. Spiroski et al., 2008]. Среди основных приобретенных факторов, способствующих развитию ГГЦ, выделяют дефицит витаминов В₆, В₁₂, фолиевой кислоты, нарушение функции почек, печени, прием лекарственных препаратов и др. [R. Clarke, 1998; K.L. Tucker et al., 2005]. По данным литературы, увеличение концентрации ГЦ в крови выше уровня 22 мкмоль/л связано с четырёхкратным повышением риска возникновения ТГВНК [A. Gupta et al., 1998; P. Hainaut et al., 2002; Т.В. Вавилова, 2010]. Особенно опасна ГГЦ для мужчин при повышении ее уровня всего на 12% выше нормы. В таком случае риск возникновения сердечного приступа у мужчин повышается в 3 раза [R. Myerburg et al., 1993; Г.И. Костюченко, З.С. Баркаган, 2003; R.S. Vasani et al., 2003]. Данные, которые приводят авторы в своих клинических наблюдениях, сопоставимы с результатами, полученными в этом исследовании на экспериментальных животных. Так, уровень ГЦ по мнению многих авторов в норме составляет – $10,7 \pm 3,2$ мкмоль/л, а у лиц с переломами шейки бедра $11,7 \pm 4,7$ мкмоль/л [R.S. Vasani et al., 2003]. В то время как результаты настоящего экспериментального исследования соответствовали для контроля - $8,27 \pm 1,18$ мкмоль/л, а для животных с травмой голени - $9,21 \pm 0,7$ мкмоль/л.

Используемая метиониновая диета в III экспериментальной группе (срок эксперимента 6 недель) дала ожидаемый, уже известный по научным исследованиям и публикациям [F.Y. Chen et al., 2006] результат, и уровень ГЦ в этой экспериментальной группе был повышен по отношению к контролю на 46,8% ($p < 0,05$). Несмотря на то, что в настоящем исследовании метионин вводился в концентрации 2,46 г/кг, были получены значительно меньшие значения ГЦ для плазмы крови. По литературным данным уровень ГЦ составил 240–334 мкмоль/л [R. Clarke, 1998], в то время как в III экспериментальной группе уровень ГЦ соответствовал $12,14 \pm 0,92$ мкмоль/л ($p < 0,05$). Само же травматическое воздействие не оказывало существенных изменений на уровень ГЦ. Вполне логично, что уровень ГЦ в экспериментальной группе, где животные подверглись и травматическому воздействию, и находились на метиониновой диете, не должен был значительно отличаться от экспериментальных данных II (traum) и III групп (hhcy). Однако в эксперименте было получено значительное превышение концентрации ГЦ. Одним, и, по всей видимости, не единственным из объяснений этого процесса – является гиподинамия [W. Hagen et al., 2001]. Способствовать гиподинамии могла еще и та причина, что в условиях ГГЦ преобладают процессы резорбции кости [K.L. Tucker et al., 2005]. Следовательно, надо ожидать более медленные темпы консолидации сформированного перелома.

Используемый метионин для повышения уровня ГЦ сам по себе является токсическим веществом, действие которого проявляется гемолитической анемией, супрессией роста, способствует снижению массы тела [M. Herrmann et al., 2007]. Однако в проведенном эксперименте не было подтверждено высказывание в отношении снижения массы тела. На протяжении всего эксперимента масса тела во всех экспериментальных группах еженедельно увеличивалась, и различия между группами во многом не носили статистически достоверных значений.

При анализе показателей формулы крови экспериментальных животных были получены статистически значимые различия в количестве содержания эозинофилов, сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов во II экспериментальной группе, за исключением моноцитов, количество которых по

отношению к контролю было снижено. Что касается количества тромбоцитов, то минимальное их количество было отмечено в IV экспериментальной группе, максимальное – закономерно во II и промежуточное значение количества тромбоцитов было в III группе. При этом стоит отметить, что статистически значимые различия по отношению к контрольным значениям были отмечены в III – IV группах, а во II группе по отношению к контролю находились в пределах ошибки эксперимента.

Что же касается наличия тромботических масс в сосудах микроциркуляторного русла исследованных гистопрепаратов, то в I группе их выявлено практически не было (за исключением одного гистопрепарата); в группах животных, перенесших перелом нижней конечности, и у животных, находившихся на метиониновой диете, оценивали с частотой в 10,53% - 47,06%. Сочетание же факторов тупой травмы и повышенного уровня ГЦ приводило к увеличению данного значения до 60% в зависимости от срока эксперимента. Применительно к проблемам судебной медицины, такие результаты могут говорить о том, что возникшее фатальное тромботическое осложнение при травме может быть связано непосредственно как с механическим воздействием, так и с предшествовавшим токсическим воздействием ГЦ на эндотелий сосудов. Такой вывод предполагает поиск критериев, по которым можно было бы разграничить прямое воздействие травмы от токсического воздействия ГЦ. Как показали полученные результаты, такие критерии можно обосновать по оценке морфометрических параметров артериальных и венозных сосудов в зоне травмы, сравнивая с сосудами интактной конечности. Подробный алгоритм дифференциальной диагностики будет изложен по тексту ниже.

Вполне закономерно, что при наличии травмы, у животных (II экспериментальная группа) отмечено увеличение количества тромбоцитов, в то же время количество тромбоцитов в III экспериментальной группе было снижено до $51,18 \pm 6,90$ в поле зрения, в группе экспериментальных животных у которых был сформирован перелом в условиях метиониновой диеты (IV) содержание тромбоцитов было еще меньше. Объяснением данных результатов можно считать

то, что травма является инициирующим фактором для увеличения количества тромбоцитов, метионин (а может и повышенный уровень ГЦ в плазме крови) оказывает токсическое воздействие, а травма на фоне метиониновой диеты способствует усилению токсического эффекта. Повышенное тромбообразование отмечено при сочетанном влиянии тупой травмы и метиониновой диеты (в IV и V группах), где установлен низкий уровень тромбоцитов и высокий уровень ГЦ. Поэтому надо полагать, что увеличение частоты тромботических осложнений в таких условиях, связано не с тромбоцитарным звеном, а с нарушением функции эндотелия в эксперименте [J.C. Chambers et al., 1998]. Таким образом, на фоне снижения количества тромбоцитов, отмечается повышение частоты встречаемости тромбов, что является особенностью тромбообразования при травме опорно-двигательного аппарата в условиях ГГЦ.

Конкретизируя данные морфометрического исследования, следует обратить внимание на то, что в отношении толщины эндотелия сосудистой стенки в артериях происходило достоверное его увеличение на травмированной конечности. Это значение по отношению к контролю было повышено на 42,91% ($p < 0,05$), в то время как на интактной конечности во II экспериментальной группе это значение было сопоставимо с цифрами в контрольной группе - $2,89 \pm 0,03$ мкм ($2,89 \pm 0,04$ мкм в I группе). Введение метионина в течение 6 недель (III экспериментальная группа) не приводило к статистически значимым изменениям в толщине эндотелия артерий задних конечностей, и этот показатель соответствовал значению $2,79 \pm 0,05$ мкм. В IV экспериментальной группе, где животным первоначально в течение четырех недель вводили внутрижелудочно метионин для увеличения концентрации уровня гомоцистеина, а затем формировали перелом, и еще в течение двух недель вводили метионин, установлено увеличение на стороне травмированной конечности толщины эндотелия по сравнению с контрольной группой на 12,46%. В то же время при сравнении значений толщины эндотелия во II и IV группах, выявлены статистически значимые различия, и толщина эндотелия во II группе в артериях

была увеличена на 27,08% ($p < 0,05$). Однако в сравнении с интактными конечностями во II и IV группах значимых различий выявлено не было.

Анализ морфометрических данных в отношении вен в зоне травмирования и на интактной стороне в экспериментальных группах показал, что во II экспериментальной группе толщина эндотелия превысила показатели контроля на 75,54% ($p < 0,05$) и в абсолютных цифрах соответствовала $4,09 \pm 0,05$ мкм против $2,33 \pm 0,02$ мкм в контроле, в то время как на интактной конечности толщина эндотелия вены во II экспериментальной группе практически не отличалась от контрольных значений и составила $2,35 \pm 0,02$ мкм. Введение метионина в течение шести недель приводит к достоверному увеличению толщины эндотелия по отношению к контролю на 59,23% ($p < 0,05$) и в абсолютных значениях составляет $3,71 \pm 0,12$ мкм. В IV экспериментальной группе также отмечено увеличение толщины эндотелия по сравнению с контролем: на травмированной конечности на 45,92% ($p < 0,05$) и на интактной на 48,07% ($p < 0,05$).

Толщина эндотелия капилляров во II группе на травмированной конечности была увеличена на 12,05% ($p < 0,05$) по отношению к контролю, на интактной конечности во II группе этот показатель практически не отличался от контрольных значений и составил $2,29 \pm 0,03$ мкм, в то время как в контрольной группе это значение соответствовало $2,24 \pm 0,02$ мкм. Длительное введение метионина в III группе так же несущественно отразилось на толщине эндотелия капилляров, и значение показателя толщины эндотелия капилляра составило $2,23 \pm 0,02$ мкм, в то время как в IV группе на травмированной конечности в сочетании с введением метионина отмечено достоверное уменьшение толщины эндотелия капилляра на 8,93% ($p < 0,05$).

Коэффициент корреляции между уровнем ГЦ и толщиной эндотелия в сосудах указан в таблице 49.

Таким образом, установленные результаты свидетельствуют, что при механическом воздействии в зоне травмирования отмечается реакция эндотелия в виде увеличения его толщины во всех исследуемых сосудах (артериях, венах и капиллярах). При этом в интактной зоне (на противоположной стороне) каких-

либо статистически значимых различий не наблюдается. Метиониновая диета, способствующая увеличению концентрации гомоцистеина, вызывает увеличение толщины эндотелия лишь вен. При сочетании травматического воздействия в условиях гипергомоцистеинемии наоборот установлено уменьшение толщины эндотелия в капиллярах по сравнению с интактной конечностью. Полученные результаты отражены в сводной таблице для дифференциальной диагностики изолированного травматического воздействия и травматического воздействия в условиях повышенного уровня гомоцистеина (таблица 50).

Таблица 49

Коэффициент корреляции между уровнем ГЦ и толщиной эндотелия в сосудах

Экспериментальная группа	артерия	вена	капилляр
I	-0,05	-0,47	-0,02
II FRACT	-0,22	0,59	0,35
II INTACT	-0,32	-0,09	-0,77
III	-0,29	0,24	0,03
IV FRACT	0,29	-0,26	-0,70
IV INTACT	-0,89	0,67	-0,70
V FRACT	0,26	-0,31	-0,43
V INTACT	-0,60	0,19	-0,54
VI FRACT	-0,53	0,09	0,03
VI INTACT	-0,44	-0,36	-0,56
VII	-0,31	0,27	0,06
VIII FRACT'	0,24	-0,19	-0,47
VIII INTACT	-0,72	0,66	-0,59

Дифференциальная диагностика изолированного травматического
воздействия в условиях ГГЦ по толщине эндотелия

	В зоне травмирования	На противоположной интактной стороне	В условиях метиониновой диеты	На травмированной стороне в условиях метиониновой диеты
Артерия	↑	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>N</i>
Вена	↑	<i>N</i>	↑	↑
Капилляр	↑	<i>N</i>	<i>N</i>	↓
<p><i>N</i> – нет изменений ↑ - увеличение по отношению к контролю ↓ - уменьшение по отношению к контролю</p>				

Полученные результаты на основе объективных морфологических данных позволят провести постмортальную дифференциальную диагностику, когда результаты биохимических исследований в определении гомоцистеина, его уровня по той ли иной причине не возможны. Хотя полученные данные необходимо еще подтвердить микроскопическим исследованием случаев с фатальными осложнениями ТГВНК.

Надо полагать, что с одной стороны введение метионина, а следовательно и увеличение концентрации гомоцистеина в плазме крови приводит к достоверному увеличению толщины эндотелия, а с другой уменьшает ответную реакцию того же эндотелия на внешнее травматическое воздействие.

Таким образом, при изучении уже реального секционного материала с целью постмортальной диагностики, имела ли место у потерпевшего (пациента) транзиторная гипергомоцистеинемия, необходимо проведение

морфометрического исследования как в зоне травмирования, так и на противоположной интактной стороне с последующей идентификацией полученных результатов с вышеприведенной сравнительной таблицей.

Характеристика работы не была бы полной без анализа состояния перекисного окисления липидов при механической травме в условиях повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови. Во многих клетках активные формы кислорода образуются за счет последовательного поэтапного одноэлектронного присоединения 4 электронов к 1 молекуле кислорода. В результате данной реакции образуется конечный продукт – вода. Однако на промежуточных этапах данной реакции формируются активные формы кислорода, инициирующие цепную реакцию окисления. Функция свободнорадикальной реакции окисления может быть полезной для организма в целом, но может вызывать и разрушение органических молекул, в частности липидов, составляющих основу клеточной мембраны, что и обуславливает гибель клетки. Поэтому, в ходе эволюции возникла система ингибирования перекисного окисления липидов [Е.Б. Меньщикова с соавт., 2006; О.Л. Белая с соавт., 2009]. Механическое воздействие генерирует ферменты и субстраты, которые могут образовывать свободные радикалы, включающие цепные реакции «повреждения» с фрагментацией мембранных фосфолипидов [А. Telci et al., 2000; Н.А. Мишина, 2009]. На этом фоне активизируется антиоксидантная система защиты.

Результаты механического воздействия могут проявляться в виде немедленных (первичное повреждение) и прогрессирующих со временем (вторичное повреждение) реакций [Н.В. Эделева с соавт., 2001; D.J. Isaacman et al., 2002; Н.Т. Keenan, S.L. Bratton, 2006]. Вторичное повреждение усугубляется в результате биохимических каскадов, неизбежно запускаемых травмой, что еще больше ухудшает клеточный метаболизм, т.к. затрудняет снабжение клеток травмированных тканей кислородом и нутриентами, инициируя порочный круг патофизиологических реакций. Вторичные повреждения являются важнейшими факторами, определяющими исход у пациентов с механической травмой [Г.М. Гусейнов с соавт., 1990; В.А. Барабой с соавт., 1997].

Практически значимой представляется перспектива использования показателей свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты для оценки степени структурных и метаболических нарушений при травматической болезни, а также в качестве критерия судебно-медицинской оценки тяжести травмы.

В острый период травмы (спустя сутки после сформированного перелома) установлены достоверные изменения таких показателей в экспериментальной группе как диеновых конъюгатов, каталазы и шиффовых оснований как в плазме крови, так и в гемолизате, МДА в гемолизате, СОД в плазме и GSH в плазме. Все показатели перечисленных ферментов (кроме МДА) были повышены по отношению к контролю, тогда как МДА был снижен. Удлинение срока эксперимента до двух недель приводило к нивелированию изменений в данных показателях, за исключением диеновых конъюгатов в плазме крови, которые по отношению к контролю были снижены практически в полтора раза.

Введение экспериментальным животным метионина с длительностью эксперимента четыре и шесть недель также приводило к изменению в активности системы антиоксидантной защиты. Так на четвертой неделе эксперимента установлены статистически значимые различия для диеновых конъюгатов, МДА, как в плазме крови, так и в гемолизате, шиффовых оснований в гемолизате, GSH, СПА и ВЭГ в плазме крови экспериментальных животных. Объединенные схематические данные о состоянии ключевых факторов ПОЛ представлены в таблице 51.

В условиях экспериментальной умеренной гомоцистеинемии, наблюдали повышение концентрации восстановленного глутатиона в 1,6 раза и в 2,1 раза через 4 недели и 6 недель метиониновой диеты, соответственно. Данные изменения носили ожидаемый характер, так как механизм образования глутатиона тесно связан с фолатным циклом через образование аминокислоты цистеин, что отражено на рисунке 60.

Динамика изменения ключевых факторов системы ПОЛ-антиоксиданты в экспериментальных группах по отношению к контрольной группе

	VI	II	VII	III	VIII	V	IV
ДЖ в ПК	↑		↓		↓		
ДЖ в ГЕМ	↑	↓	↓		↓		↓
Активность каталазы ПК	↑						
Активность каталазы ГЕМ	↑						
МДА в ПК			↑				
МДА в ГЕМ	↓		↑	↓			↑
ШО в ПК	↑						
ШО в ГЕМ	↑		↓		↓	↓	↓
СУА в ПК	↑			↑			
СОД в ГЕМ				↓	↓		↑
GSH в ГЕМ	↑		↑	↑			↑
СПА в ПК			↓	↑			↓
ВЭГ в ПК			↓		↓		
ГПО в ГЕМ						↑	

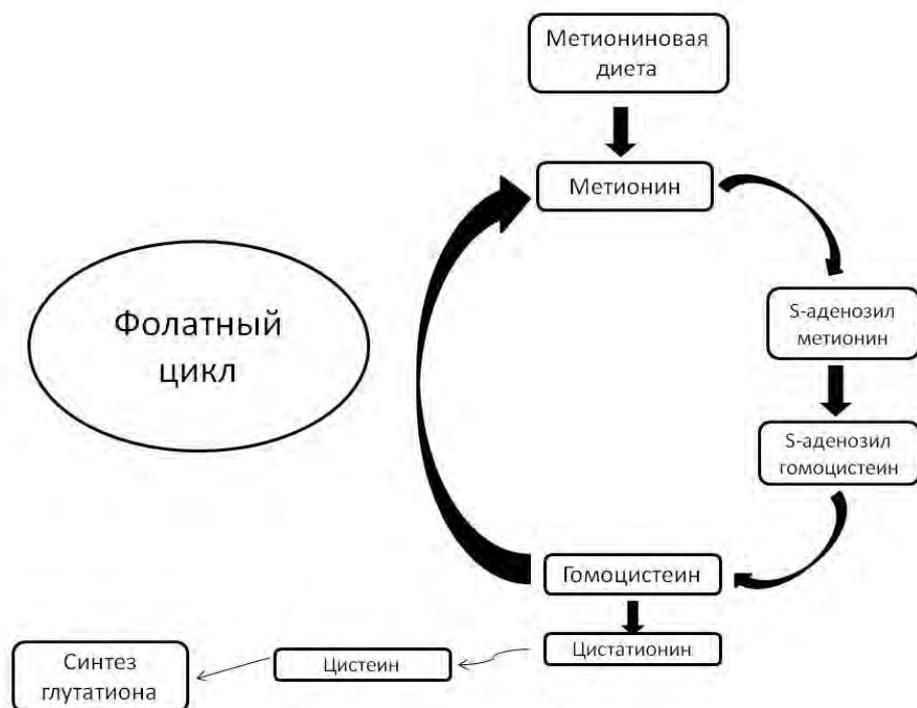


Рис. 60. Схема образования восстановленного глутатиона в условиях ГГЦ

Ввиду того, что восстановленный глутатион является мощнейшим природным антиоксидантом, основной антиоксидантный эффект которого реализуется через взаимодействие с SH-группой со свободными радикалами, увеличение его концентрации косвенно указывает на усиление антиоксидантных процессов при умеренной ГГЦ. Что, собственно, и подтверждается при наблюдении за изменением концентрации ДК и ШО, содержание которых снижается у животных, содержащихся на метиониновой диете.

Данное утверждение подтверждается при параллельном сравнении динамики изменения концентрации глутатиона и гомоцистеина в экспериментальных группах, что наглядно показано на рисунке 61.

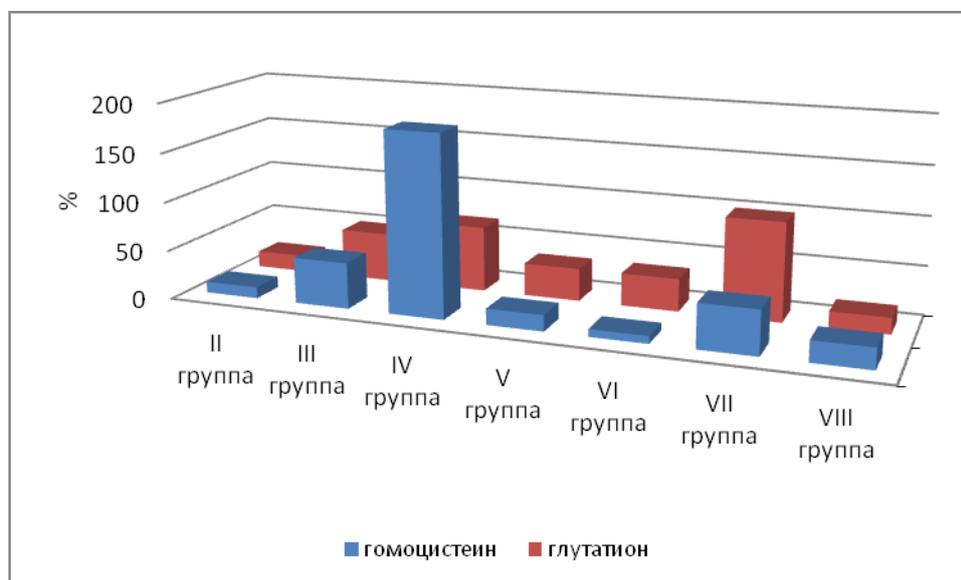


Рис. 61. Динамика изменения концентрации восстановленного глутатиона и гомоцистеина в экспериментальных группах животных по отношению к контрольной группе (I группа) (в %)

Таким образом, изменения в антиоксидатной – прооксидатной системе были обусловлены и механическим воздействием с одной стороны, и высоким уровнем гомоцистеина - с другой, а однонаправленная динамика уровня глутатиона и гомоцистеина свидетельствует о том, что по уровню глутатиона можно судить об уровне гомоцистеина в плазме крови.

Выявленные изменения в морфометрических показателях в отношении диаметра артерий, вен и капилляров во многом были опосредованы за счет

изменения количества синтеза NO в зоне травмирования, тем более, что любая травма сопровождается системной реакцией воспаления. В свою очередь синтез NO обусловлен активностью фермента NO-синтазы. Именно NOS2 (индуцибельная, макрофагальная) синтезируется в ответ на воспалительную реакцию в организме под влиянием цитокинов [S. Adnot et al., 1995; С.М. Hart, 1999]. Поэтому следующим ключевым моментом при постановке эксперимента стало изучение экспрессии гена *NOS2*, тем более, что при определении уровня экспрессии всех трех изоформ NO-синтаз были получены результаты, свидетельствующие о том, что уровни экспрессии генов *NOS1* и *NOS3* не имели каких-либо достоверных различий в экспериментальных группах по отношению к контрольной. В связи с этим был сделан вывод о том, что экспрессия генов *NOS1* и *NOS3* не может считаться маркером тех морфологических показателей, которые имели место в ответ на механическое воздействие.

В то же время при сравнении уровня экспрессии гена *NOS2* экспериментальных групп с контролем были получены статистически значимые различия лишь спустя 2 недели после механической травмы.

Полученный результат не в полной мере согласуется с данными литературы. В частности, по данным L. Chenlong и соавт. при определении уровня экспрессии в ответ на повреждение спинного мозга было установлено, что пик экспрессии гена *NOS2* в клетках спинного мозга приходится именно на первые сутки после травмы [L. Chenlong et al., 2002]. Данные различия можно объяснить тем, что для экспрессии гена *NOS2* необходимо наличие макрофагов и определенное время для их миграции в зону повреждения, а также различным (иным) характером травмы.

Подавление экспрессии гена *NOS2* в крови может быть связано с активацией генов других NO-синтаз в эндотелии, гладких мышечных клетках сосудов и повышением концентрации NO [W.K. Alderton et al., 2001; R. Ginnan et al., 2008].

Таким образом, полученные экспериментальные данные не исключают возможность использования в комплексе результатов морфометрического и генетического исследования для установления давности причинения травмы, а

уровень экспрессии гена *NOS2* может быть использован в качестве маркера давности причинения механического повреждения.

Обсуждение было бы неполным без сопоставления между собой всех экспериментальных результатов, а именно: полученных данных по ПОЛ, экспрессии гена *NOS2* и морфометрических показателей. Роль АФК и сопряженных с ними реакций ПОЛ в патогенезе различных патологических состояний общепризнанна. Свободные радикалы являются ключевыми регуляторами различных физиологических и патофизиологических процессов, происходящих в функционирующих клетках. Особое значение в развитии окислительного стресса придается NO, как одному из представителей свободных радикалов. При введении экспериментальным животным метионина в течение 4 и 6 недель (VII и III экспериментальные группы соответственно) было выявлено увеличение концентрации гомоцистеина в плазме крови по отношению к контрольным показателям. В то же время лишь для III экспериментальной группы установлено статистически значимое различие по уровню содержания СОД (СУА), где уровень был повышен в 3,41 раза, а уровень экспрессии гена *NOS2* превысил значения контрольной группы на 88,91%. Следовательно, содержание NO в организме животных данной экспериментальной группы было снижено. Стоит подчеркнуть, что NO играет ключевую роль в инициации окислительного стресса, регуляции образования АФК [Н.К. Зенков с соавт., 2001]. Учитывая, что АФК сопровождается повышением уровня МДА, необходимо указать, что в той же экспериментальной группе животных (III) МДА по отношению к контрольным значениям был также повышен в плазме в 1,31 раза. Повышенное содержание МДА, как промежуточного продукта ПОЛ, предполагает интенсификацию окислительного стресса и считается маркером повреждения тканей [М. Hultqvist, J. Hegbrant, 1997]. Таким образом, надо полагать, что имеется обратная зависимость между уровнем NO и активностью МДА. Увеличение активности МДА сопряжено со снижением концентрации NO. Это в свою очередь свидетельствует о накоплении токсических продуктов пероксидации. Одной из причин понижения концентрации NO может быть образование пероксинитрита в

результате реакции NO и супероксида. Не исключено, что морфологическим эквивалентом происходящих биохимических процессов является увеличение толщины эндотелия вен. По крайней мере, лишь для эндотелия вен в этой экспериментальной группе было отмечено статистически значимое увеличение этого морфометрического показателя на 59,23% ($p < 0,05$). Однако диаметр артерий и капилляров был меньше, чем в контрольной группе на 17,25% и 13,98% соответственно ($p < 0,05$), что может быть обусловлено уменьшением концентрации NO, как релаксирующего фактора стенки сосудов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам исследования было установлено, что венозные тромбозмболические осложнения являются многофакторным патологическим процессом. Проведенный анализ эпидемиологических данных установил волнообразный характер встречаемости ВТО. Ежегодно в практике судебно-медицинского эксперта танатологического отдела ВТО встречаются в среднем в 0,45% от всех исследований. В практике судебно-медицинского эксперта отдела экспертизы живых лиц - 0,007%. Тем не менее, сопоставление этих данных с данными зарубежной научной литературы за последнее десятилетие предполагает, что значение ниже обозначенного порога можно использовать как показатель оценки качества работы как самого эксперта, так и экспертного учреждения в целом.

Исследованием определено, что у лиц с ВТО, имевших механические повреждения как по данным танатологического отдела, так и по данным отдела экспертизы живых лиц, установлен как минимум один фактор риска развития тромботических осложнений. Механические повреждения у данной категории обследованных в основном были причинены в результате воздействия твердых тупых предметов. Как правило, в большинстве случаев источником тромбозмболии легочной артерии являлись вены нижних конечностей. Критичным периодом для развития смертельного осложнения в виде ТЭЛА у таких потерпевших надо считать срок второй недели либо после причинения повреждения, либо после выполненного оперативного вмешательства.

Экспертная оценка причинной связи между ВТО и имевшей место механической травмой или выполненным оперативным вмешательством возможна лишь после выявления факторов как наследственной, так и приобретенной предрасположенности к тромбофилии.

Ретроспективный анализ проведенного генетического типирования биологических образцов от лиц с ВТО показал отсутствие случаев с мутациями в генах факторов свертывания крови FII и FV (*FII G20210A*; *FV G1691A*). В то же время у лиц с тромботическими осложнениями после причиненной механической травмы встречались полиморфизмы в генах *MTHFR C677T*, *PAI-1 -675 5G/4G*, *NOS3 G894T*. Наличие этих полиморфных локусов предполагает в патогенезе тромботических осложнений следующий механизм: полиморфизм в гене *MTHFR C677T* сопровождается повышением уровня гомоцистеина, что приводит к повреждению и дисфункции эндотелия, возможно, к обнажению базальной мембраны. Наличие полиморфизма в гене *PAI-1 -675 5G/4G* у пациентов ведет к недостаточности лизиса формирующихся тромбов. Полиморфизм в гене *NOS3 G894T* способствует замедлению скорости кровотока за счёт нарушения регуляции диаметра сосудов.

Наиболее часто в анализируемом экспертном материале за семилетний период встречались случаи с ВТО у лиц с полиморфизмом в гене *MTHFR C677T*. Однако ретроспективно оценить уровень концентрации гомоцистеина в плазме крови у потерпевших с механической травмой не представлялось возможным. По этой причине было выполнено экспериментальное исследование на лабораторных животных (крысах-самцах) с моделированием умеренной гипергомоцистеинемии и механической травмы.

В ходе выполнения эксперимента установлено, что длительная умеренная повышенная концентрация гомоцистеина в плазме крови приводит к изменению в строении сосудов. При этом отмечаются пролиферативные процессы в клетках эндотелия и миоцитах, в ряде случаев имел место фиброз стенок артерий мелкого калибра, дистрофия миоцитов. Наиболее значимые изменения были отмечены в таких морфометрических параметрах сосудов микроциркуляторного русла, как изменение диаметра артерий и вен, толщины эндотелиальных клеток, выстилающих сосуд.

При выполнении эксперимента на лабораторных животных была установлена корреляция в изменении концентрации гомоцистеина и

восстановленного глутатиона в плазме крови. Выявленная закономерность предполагает использование определения концентрации восстановленного глутатиона для косвенной оценки концентрации гомоцистеина.

В то же время установлено, что изолированное механическое воздействие не приводит к статистически значимому достоверному увеличению концентрации гомоцистеина в плазме крови. Тем не менее, при наличии механической травмы на фоне уже существовавшей умеренной гипергомоцистеинемии концентрация ГЦ увеличивается по сравнению с контрольными значениями практически в четыре раза.

В заключение проведенный анализ собственных данных позволяет утверждать: для того чтобы выводы судебно-медицинской экспертизы соответствовали существующим требованиям, предъявляемым к экспертному документу правоохранительными органами, целесообразно придерживаться следующего алгоритма (рисунок 62):

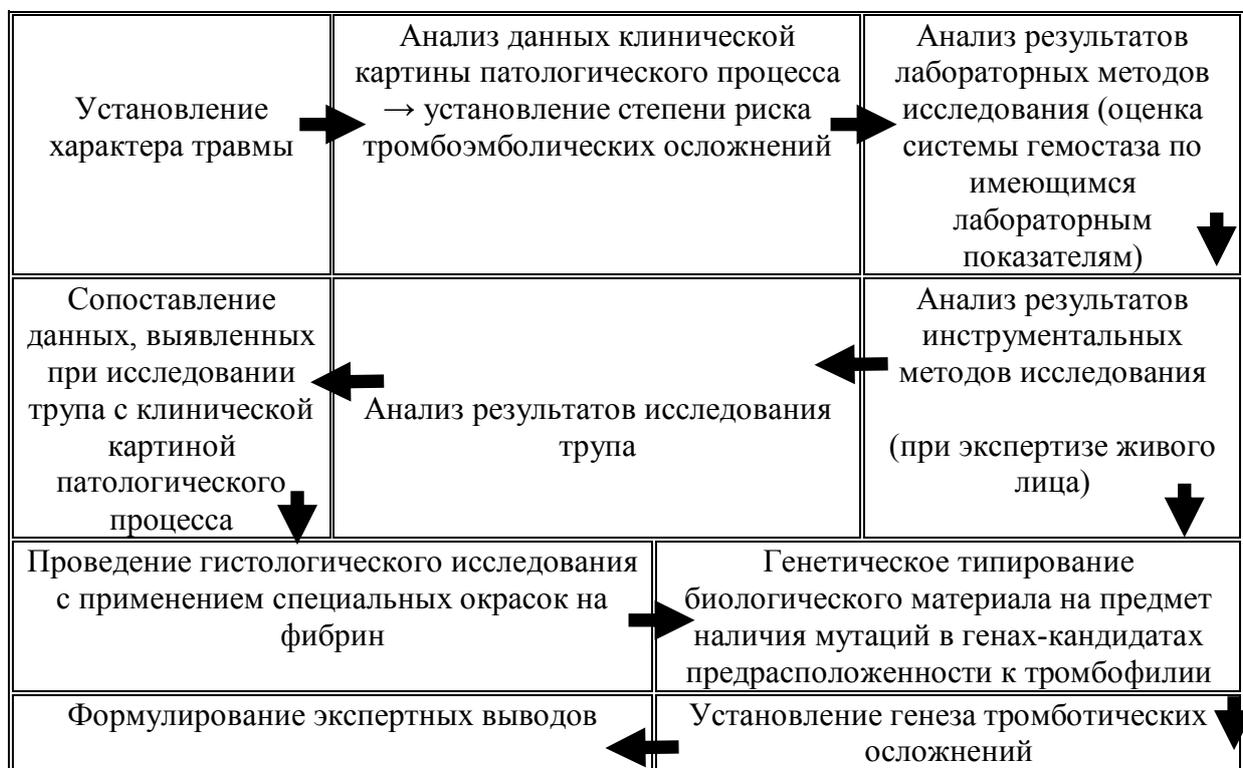


Рис. 62. Алгоритм судебно-медицинской оценки тромботических осложнений при механической травме

Таким образом, практические рекомендации при проведении судебно-медицинской экспертизы в отношении потерпевших с механической травмой и/или выполненным оперативным вмешательством и последовавшими ТО должны включать: обязательное привлечение к выполнению экспертизы специалиста в области гематологии; оценку коэффициента риска ТО как самой механической травмы, так и оперативного вмешательства; сопоставление клинических данных с данными, полученными в ходе проведенного секционного исследования с учетом гистологической картины; особенно для мужчин молодого возраста обязательным считается генетическое типирование на предмет наличия мутаций и полиморфных аллелей в генах *MTHFR C677T*, *PAI-1 -675 5G/4G*, *NOS3 G894T*.

ВЫВОДЫ

1. Частота экспертных случаев с тромботическими осложнениями составляет не более 0,45% от общего количества исследованных судебно-медицинских трупов и не более 0,007% при экспертизе живого лица. Средний возраст погибших мужчин от тромботических осложнений механической травмы равен $45,38 \pm 4,09$ годам, женщин - $73,71 \pm 2,51$ года; у живых лиц: мужчины – $38,0 \pm 2,67$ лет, женщины - $43,3 \pm 11,41$ лет; у погибших преобладает травма нижних конечностей от действия твердого тупого предмета.

2. Результаты экспериментальных и клинических исследований показали, что гиперкоагуляционные нарушения в системе гемостаза являются многофакторным патологическим процессом, обусловленным механической травмой и наследственными факторами.

3. У погибших от механической травмы нижних конечностей наблюдается прямая зависимость между длительностью нахождения больного на постельном режиме и риском развития фатальных тромботических осложнений.

4. Показатели коагулограммы, зависящие от внутренних и внешних факторов (протромбиновое время, протромбиновый индекс, концентрация растворимых фибрин-мономерных комплексов, концентрация фибриногена, активированное частичное время, тромбиновое время) могут быть использованы для судебно-медицинской диагностики тромбоэмболических осложнений при механической травме.

5. У всех потерпевших отсутствовали мутации генов факторов FII и FV, в то же время наблюдали полиморфизм генов PAI-1 -675 5G/4G, FGB -455 G/A, NOS3 G894T. Полиморфизм гена MTHFR C677T у лиц с механической травмой и последовавшим тромбозом был выявлен в 83,34%, при этом доля гомозиготных носителей (вариант 677TT) составила 16,67%.

6. Разработана экспериментальная модель гиперкоагуляционных нарушений в системе гемостаза при механической травме в условиях гипергомоцистеинемии.

7. Предложены морфологические и биохимические маркеры диагностики гипергомоцистеинемии:

- утолщение эндотелия в сосудах микроциркуляторного русла;
- уменьшение диаметра артериальных сосудов;
- увеличение диаметра вен;
- увеличение концентрации восстановленного глутатиона.

8. В эксперименте в раннем травматическом периоде установлено увеличение концентрации диеновых конъюгатов и шиффовых оснований (основных показателей перекисного окисления липидов); ко второй неделе эксперимента наблюдается изменение экспрессии гена индуцибельной NO-синтазы, что можно использовать в качестве маркеров давности причинения механической травмы.

9. На основании комплексной оценки данных клинико-морфологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования разработаны судебно-медицинские критерии диагностики тромботических осложнений при механической травме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Настоящие практические рекомендации предназначены для судебно-медицинских экспертов Бюро судебно-медицинской экспертизы при проведении экспертиз (живых лиц и трупов) в случаях тромботических осложнений после причиненной механической травмы и выполненного оперативного вмешательства.

На основании проведенного научного исследования, с учетом полученных результатов эксперимента, предлагаются следующие критерии поэтапной судебно-медицинской оценки тромботических осложнений:

1) первый этап – изучение предоставленных правоохранительными органами документов (протокол осмотра места происшествия, медицинские документы, отражающие состояние здоровья пациента после причиненной травмы до и после выполненного оперативного вмешательства, и пр. документы). При изучении сведений, содержащихся в медицинской карте стационарного больного, учитывается семейный анамнез, локализация повреждений, оперативная тактика ведения пациента, длительность анестезиологического пособия и выполненного оперативного вмешательства, сведения о профилактике тромбоэмболических осложнений согласно стандарту оказания медицинской помощи и профилактике тромботических осложнений у пациентов соответствующего профиля, данные коагулограммы (желательно в динамике временных промежутков: на момент поступления в лечебное учреждение, непосредственно после выполненного хирургического этапа лечения, через неделю после выполненного оперативного вмешательства).

2) второй этап (при экспертизе трупа) – проведение секционного исследования. Учитывая, что источником ТЭЛА, как правило, являются сосуды системы нижней полой вены, то при наружном исследовании обязательно измеряется окружность нижних конечностей. При внутреннем исследовании,

после обнаружения тромбоза в легочном стволе либо ее ветвях, начинается целенаправленный поиск источника ТЭЛА, в связи с чем исследуются сосуды системы верхней и нижней полых вен. При описании тромбоза найденного либо в самом легочном стволе, либо в его крупных ветвях отмечают наличие вдавлений на его поверхности от клапанов вены, указывающих на источник его происхождения. Определив источник ТЭЛА, описывают состояние внутренней поверхности стенки вены, ее клапанов. С учетом того, что при ТЭЛА развивается легочное сердце, для объективизации на макроуровне развития острой, подострой или хронической ТЭЛА требуется определение угла между межжелудочковой перегородкой и передней стенкой правого желудочка, а также отмечают степень смещения межжелудочковой перегородки в сторону полости левого желудочка. Для хронической ТЭЛА из-за гипертензии в малом кругу кровообращения будет характерна гипертрофия стенок правого желудочка сердца. Отмечают степень кровоснабжения легочной паренхимы в зоне локализации тромбоза.

3) третий этап - на основе сведений, содержащихся в медицинской карте стационарного больного и полученных при проведении секционного исследования, устанавливается коэффициент относительного риска тромботических осложнений.

4) четвертый этап – после установления источника тромбоза на гистологическое исследование направляются стенка вены с головкой тромба, аналогичный участок вены иссекается с контралатеральной конечности (для внутреннего контроля). Обязательному гистологическому исследованию подвергаются кусочки легких, мягкие ткани в зоне повреждений нижних конечностей и на противоположной стороне в интактной зоне.

5) пятый этап – параллельно с забором кусочков органов и тканей на гистологическое исследование осуществляется забор образцов крови для проведения генетического типирования на предмет наличия мутаций или полиморфизмов в генах кандидатах наследственной предрасположенности к тромбофилии.

6) шестой этап - помимо рутинной гистологической окраски гистопрепаратов на гематоксилин-эозин, используются окраски по Зербино и Шуенинову для ориентировочной оценки «возраста» тромба и тромбоембола с дальнейшим сопоставлением полученных результатов гистологического исследования с клиническими данными. Предлагается морфометрическое исследование таких показателей, как диаметр сосудов микроциркуляторного русла, толщина эндотелия, толщина сосудистой стенки артерии и вены как на травмированной конечности, так и на нетравмированной (контралатеральной). Если при проведении морфометрического исследования толщины эндотелия будет установлено увеличение данного показателя в венах на травмированной стороне при сопоставимых значениях толщины эндотелия в артериях и капиллярах, не исключается, что у потерпевшего при жизни была умеренная гипергомоцистеинемия.

7) седьмой этап – при установлении, что причиной смерти явилась ТЭЛА у потерпевшего в молодом возрасте с низким показателем коэффициента относительного риска тромботических осложнений, с наличием в семейном анамнезе смерти родственников от тромботических и/или тромбоемболических осложнений, наличием по данным морфометрического исследования изменений в толщине эндотелия и диаметра сосудов, проводится генетическое типирование. В первую очередь осуществляется поиск мутаций и полиморфизмов в генах *MTHFR C677T*, *PAI-1 -675 5G/4G*, *NOS3 G894T*.

Предлагаемые рекомендации существенно расширяют возможности судебно-медицинской оценки тромботических осложнений и позволяют ответить на многие вопросы, интересующие судебно-следственные органы при расследовании уголовных и гражданских дел.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авилова, Т.В. Лабораторные исследования системы гемостаза в поиске причин тромбоэмболических осложнений / Т.В. Авилова // Новости хирургии. – 2010. – № 2. – С. 146-155.
2. Акиньшина, С.В. Значение полиморфизма гена MTHFR C677T и гипергомоцистеинемии в патогенезе акушерских осложнений / С.В. Акиньшина, О.Ю. Панфилова, Н.А. Макацария, З.Х. Бабаниязова: (Материалы конференции «Современные технологии в акушерстве и гинекологии», Москва, 14 апр. 2006 г.) // Вестник РГМУ. – 2006. – Т. 49, № 2. – С. 450.
3. Акиньшина, С.В. Тромбофилия и синдром системного воспалительного ответа как причина тромботических осложнений при заместительной гормональной терапии / С.В. Акиньшина // Материалы конференции «Современные технологии в акушерстве и гинекологии», Москва, 14 апреля 2006 г. // Вестник РГМУ. – 2006. – Т. 49, № 2. – С. 451.
4. Антропова, И.П., Система гемостаза после эндопротезирования коленного сустава при антитромботической профилактике прямым ингибитором тромбина дабигатраном / И.П. Антропова, И.Л. Шлыков, Н.Л. Кузнецова // Гений ортопедии. – 2011. – № 4. – С. 90-96.
5. Асамов, Р.Э. Бессимптомные флеботромбозы и наследственная тромбофилия у больных со скелетной травмой / Р.Э. Асамов, Р.П. Туляков, Ш.М. Муминов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 73-78.
6. Асамов, Р.Э. Частота фатальной и нефатальной тромбоэмболии легочной артерии в многопрофильном стационаре / Р.Э. Асамов, Б.А. Магруппов, Т.А. Вerveкина [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 17, № 3. – С. 21-24.

7. Баешко, А.А. Послеоперационный тромбоз глубоких вен нижних конечностей и эмболия легочной артерии: предрасполагающие факторы и уровни риска развития / А.А. Баешко // Хирургия. – 1999. – № 3: – С. 31-34.
8. Базанов, С.В. Динамика показателей дорожно-транспортных происшествий в Ивановской области в 2004-2011 годах, произошедших по вине водителей // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 7. – С. 83-84.
9. Баймурадова, С.М. АФС и генетические формы тромбофилии у беременных с гестозами / С.М. Баймурадова, В.О. Бицадзе, Т.Е. Матвеева [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2004. – № 2. – С. 21-27.
10. Барабой, В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В.А. Барабой, Д.А. Сутковой; под ред. Ю.А.Зозули. – Киев: Чернобыльинтеринформ, 1997. – 413 с.
11. Баранов, В.Л. Тромбоэмболия легочной артерии / В.Л. Баранов, И.Г. Куренкова, А.В. Николаев; под ред. С.Б. Шустова. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2007. – 219 с.
12. Баранова, Е.И. Клиническое значение гомоцистеинемии / Е.И. Баранова, О.О. Большакова // Артериальная гипертензия. – 2004 – Т.10, № 1 – С. 12-15.
13. Баркаган, З.С. Геморрагические заболевания и синдромы / З.С. Баркаган. – М.: Медицина, 1988. – 528 с.
14. Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: "Ньюдиамед-АО", 2001. – 296 с.
15. Баркаган, З.С. Классификация, молекулярные механизмы и новые методы диагностики тромбофилий / З.С. Баркаган, Л.П. Цывкина, Г.И. Костюченко, А.П. Момот // Бюллетень СО РАМН. – 2002. – Т. 104, № 2. – С. 51-55.
16. Батрашов, В.А. Взаимосвязь тромботических осложнений системы гемостаза и степени нарушения периферического артериального кровообращения

нижних конечностей / В.А. Батрашов, Е.П. Кохан, В.В. Крашутский [и др.] // Реконструктивная и пластическая хирургия: сб. – М., 2001. – С. 4-5.

17. Белая, О.Л. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у больных ишемической болезнью сердца / О.Л. Белая, Н.Е. Артамошина, В.И. Калмыкова [и др.] // Клиническая медицина. – 2009. – № 5. – С. 21-24.

18. Бернакевич, А.И. Состояние системы гемостаза у пациентов, подвергшихся эндопротезированию тазобедренного сустава / А.И. Бернакевич, С.А. Васильев, Н.А. Еськин // Вестник травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова. – 2009. – № 1. – С. 37-42.

19. Богомолов, Д.В. Перспективы использования методов иммуногистохимии в судебно-медицинской танатологии / Д.В. Богомолов, И.Н. Богомоллова, И.Е. Караваева // Судебно-медицинская экспертиза. – 2009. – № 6. – С. 32-38.

20. Божкова, С.А. Опыт организации тромбопрофилактики в стационаре травматолого-ортопедического профиля / С.А. Божкова, Р.М. Тихилов, А.М. Борисов, А.В. Цыбин // Флебология. – 2012. – Т. 6, № 4. – С. 49-54.

21. Бокарев, И.Н. Венозные тромбозы и тромбоэмболии легочных артерий / И.Н. Бокарев, В.А. Люсов, А.И. Кириенко [и др.] // Российский кардиологический журнал. - 2011. - № 4 (90). - С. 5 - 12.

22. Бондаренко, А.В. Ранний чрескостный остеосинтез по Илизарову открытых диафизарных переломов костей голени как фактор профилактики осложнений и неблагоприятных исходов у больных с политравмой / А.В. Бондаренко // Гений ортопедии. - 2004. - № 1. - С. 118-122.

23. Буртина, И.Я. Влияние комбинированного препарата кардонат на уровень гомоцистеина в плазме крови у пациентов с ишемической болезнью сердца / И.Я. Буртина // Український Медичний Часопис. – 2005. – № 1 (45). – С. 45-48.

24. Бутенас, С. Свертывание крови. Клиническое применение новых антитромботических препаратов / С. Бутенас, К.Г. Мяни // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 1. – С. 5-13.

25. Бышевский, А.Ш. Связь гемостаза с перекисным окислением липидов: монография / А.Ш. Бышевский, М.К. Умутбаева, Р.Г. Алборов. – М.: Мед. кн.; Тюмень: Академия, 2003. – 95 с.

26. Бышевский, А.Ш. Гемостатические сдвиги при аортобедренном шунтировании у больных с атеросклерозом сосудов нижних конечностей / А.Ш. Бышевский, С.Л. Галян, К.В. Гобатиков // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2004. – № 10. – С. 30-34.

27. Бялик, Е.И. Особенности лечения открытых переломов длинных костей у пострадавших с политравмой / Е.И. Бялик, В.А. Соколов, М.Н. Семенова, Н.В. Евдокимова // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2002. – № 4. – С. 3-8.

28. Вавилова, Т.В. Лабораторные исследования системы гемостаза в поиске причин тромбоэмболических осложнений / Т.В. Вавилова // Новости хирургии. – 2010. – Т. 18, № 2. – С. 146-155.

29. Варданян, А.В. Клинико-экономический анализ профилактики послеоперационных венозных тромбоэмболических осложнений / А.В. Варданян, Р.Б. Мумладзе, Д.Ю. Белоусов, Е.В. Ройтман // Качественная клиническая практика. – 2006. – № 1. – С. 51-63.

30. Варшавец, Н.П. Определение степени вреда, причиненного здоровью в результате оказания некачественной медицинской помощи / Н.П. Варшавец, В.А. Породенко, О.Б. Шилоносков // Актуальные вопросы судебно-медицинской экспертизы потерпевших, подозреваемых, обвиняемых и других лиц: сб. тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф., Рязань, 15–16 марта 2007 г. – М.; Рязань: РГМУ им. И.П. Павлова Росздрава; РЦСМЭ Росздрава, 2007. – С. 43-46.

31. Вермель, И.Г. Вопросы теории судебно-медицинского заключения / И.Г. Вермель. – М.: Медицина, 1979. – 74 с.

32. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биомембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

33. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
34. Возгомент, О.В. Трудности диагностики тромбоэмболических осложнений по данным экспертной оценки качества интенсивной терапии / О.В. Возгомент // Трудный пациент. – 2012. – Т. 10, № 6. – С. 6-10.
35. Волков, Г.Л. Современные представления о системе гемостаза / Г.Л. Волков, Т.Н. Платонова, А.Н. Савчук [и др.] – Киев: Наукова думка, 2005. – 295 с.
36. Воробьева, Н.А. Венозный тромбоэмболизм – мифы и реальность / Н.А. Воробьева, И.А. Пономарева // Трудный пациент. – 2009. – № 6-7. – С. 36-42.
37. Гаас, Г.Н. Особенности заболеваемости населения трудоспособного возраста болезнями системы кровообращения по данным ОМС / Г.Н. Гаас, А.А. Модестов // Социальные аспекты здоровья населения: электронный научный журнал [Электронный ресурс]. – 2011. – Т. 17, № 1. – Режим доступа: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/259/27/> (29.01.15).
38. Габитова, Д.М. Антиоксидантная защитная система организма / Д.М. Габитова, В.О. Рыжикова, М.А. Рыжикова // Башкирский химический журнал. – 2006 – Т. 13, № 2. – С. 94-96.
39. Глова, С.Е. Скрининг сердечно-сосудистой патологии и ассоциированных поведенческих факторов у жителей г. Ростова-на-Дону / С.Е. Глова, Л.И. Кательницкая, Л.А. Хаишева [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2006. – № 3(59). – С. 1-5.
40. Горбачева, Л.Р. Модуляция тромбином и фактором Ха гиппокампальных нейронов / Л.Р. Горбачева, Т.П. Сторожевых, В.Г. Пинелис [и др.] // Биохимия. – 2006. – № 71(10). – С. 1338-1346.
41. Горожанская, Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях / Э.Г. Горожанская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 6 – С. 28-41.

42. Гриневич, Т.Н. Ротационная тромбоэластометрия rotem как новый перспективный метод оценки системы гемостаза у пациентов травматологического профиля / Т.Н. Гриневич // Новости хирургии. – 2010. – Т.18, № 2. – С. 115-122.

43. Гусейнов, Г.М. Участие селена в регуляции перекисного окисления липидов биомембран и активность глутатионпероксидазы / Г.М. Гусейнов, Э.М. Насибов, А.И. Джафаров // Биохимия. – 1990. – Т. 55, № 3. – С. 499-507.

44. Данковцева, Е.Н. Ассоциация генов факторов гемостаза с ранним развитием ишемической болезни сердца и манифестацией инфаркта миокарда в молодом возрасте / Е.Н. Данковцева, Д.А. Затейщиков, Д.А. Чудакова [и др.] // Кардиология. – 2005. – № 45(12). – С. 17-24.

45. Джанджгава, Ж.Г. Неудачи ЭКО и материнская тромбофилия / Ж.Г. Джанджгава, В.О. Бицадзе // Проблемы репродукции. – 2005. – № 5. – С. 41-43.

46. Елфимов, П.В. Организация специализированной травматологической помощи в условиях многопрофильного стационара / П.В. Елфимов, Н.Л. Кузнецова, А.В. Рыбин // Бюллетень НИИ социальной гигиены, экономики, управления здравоохранения им. Н. А. Семашко. – 2000. – С. 225-229.

47. Ермолаев, А.А. Острейший период тромбоэмболии легочной артерии: Проблемы диагностики на догоспитальном этапе / А.А. Ермолаев, Н.Ф. Плавунов, Е.А. Спиридонова [и др.] // Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь. – 2012. – № 1. – С. 13-19.

48. Жаров, В.В. Судебно-медицинские аспекты летальных исходов от тромбоэмболических осложнений травм, заболеваний и некоторых патологических состояний / В.В. Жаров, И.Е. Панов, С.В. Шигеев // Судебно-медицинская экспертиза. – 2003. – Т. 46, № 4. – С. 3-6.

49. Жернов, А.В. Профилактика тромбогенных осложнений в онкоурологии / А.В. Жернов, А.А. Качмазов, Д.В. Перепечин // Экспериментальная и клиническая урология. – 2010. – № 3. – С. 86-90.

50. Жирова, Т.А. Профилактика венозных тромбозов в ортопедии. Рекомендации и реальная практика / Т.А. Жирова, Е.А. Зубков, Е.В. Рейно [и др.] // Гений ортопедии. – 2012. – № 3. – С. 142-144.

51. Жук, С.И. Современные аспекты патогенеза, диагностики и лечения гипергомоцистеинемии у женщин с невынашиванием беременности / С.И. Жук // Жіночий лікар. – 2008. – № 5. – С. 14.

52. Залуцкий, И.В. Риск развития летальной послеоперационной тромбоэмболии легочной артерии у онкологических больных / И.В. Залуцкий, А.А. Касюк, И.С. Прудывус // Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57, № 4. – С. 454-457.

53. Зенков, Н.К. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.

54. Зербино, Д.Д. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови: факты и концепции / Д.Д. Зербино, Л.Л. Лукасевич. – М.: Медицина, 1998. – 255 с.

55. Зербино, Д.Д. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови как основное морфологическое проявление шока / Д.Д. Зербино, Л.Л. Лукасевич // Архив патологии. – 1983. – № 12. – С. 13-19.

56. Зубаиров, Д.М. Врожденная тромбофилия / Д.М. Зубаиров // Соровский образовательный журнал. – 1997. – № 8. – С. 33-37.

57. Зубаиров, Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Д.М. Зубаиров. – Казань: ФЭН, 2000. – 367 с.

58. Кавалерский, Г.М. Тактические аспекты диагностики и комплексного лечения сосудистых осложнений после переломов конечностей / Г.М. Кавалерский, О.Л. Зорахович, Д.А. Клименко [и др.] // Вестник лимфологии. – 2009. – № 1. – С. 4-8.

59. Калашникова, Е.А. Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции /

Е.А. Калашникова, С.Н. Кокаровцева // Медицинская генетика. – 2005. – Т. 8, № 4. – С. 386-390.

60. Калинин, Р.Е. Проблема перекисного окисления липидов в сосудистой хирургии / Р.Е. Калинин // Российский медико-биологический вестник им. Академика И.П. Павлова. – 2006. – № 3. – С. 84-90.

61. Кашежева, А.З. Лекарственное происхождение гипергомоцистеинемии / А.З. Кашежева, В.С. Ефимов // Тромбоз, гемостаз, реология. – 2001. – № 3. – С. 14-18.

62. Кизилова, Н.С. Клинико-лабораторная диагностика системы гемостаза, принципы и схемы исследования / Н.С. Кизилова. – Новосибирск, 2007 // ООО «Лабораторная диагностика ИНВИТРО» [Электронный ресурс]. – 2004 – 2011 – Режим доступа: <http://www.labdiagnostic.ru/docs/gemostazz.shtml> (29.01.15).

63. Ковалев, А.В. Анализ тематики диссертационных работ, защищенных в 2012-2013 гг. по специальности 14.03.05 «судебная медицина» / А.В. Ковалев, В.А. Фетисов, О.А. Панфиленко // Судебно-медицинская экспертиза. - 2014. - Т. 57, № 3. - С. 44-51.

64. Колб, В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.

65. Копёнкин, С.С. Профилактика венозных тромбоэмболических осложнений в травматологии и ортопедии / С.С. Копенкин // Consilium medicum. Хирургия. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 1-7.

66. Копёнкин, С.С. Эксанта. Новые возможности профилактики венозных тромбоэмболических осложнений при операциях у травматолого-ортопедических больных / С.С. Копёнкин // Русский медицинский журнал. – 2005. – № 25. – С. 1653-1657.

67. Королёва, И.М. ТЭЛА – История диагностики и развития технологий / И.М. Королёва // Российский электронный журнал лучевой диагностики. – 2012. – Т. 2, № 4. – С. 17-29.

68. Королев, А.В. Лечение пациентов с переломами лодыжек. Применение препарата ксарелто для профилактики тромбоэмболических

осложнений / А.В. Королев, А.В. Фролов, Д.О. Герасимов [и др.] // Медицинский совет. - 2014. - № 7. - С. 72-76.

69. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. - 1988. - №1. – С.16-19.

70. Костюченко, Г.И. Гипергомоцистеинемия и коронарная болезнь сердца как проблема пожилого возраста / Г.И. Костюченко, З.С. Баркаган // Клиническая геронтология. – 2003. – Т. 9, № 5. – С. 9-12.

71. Косырев, А.Б. Современное решение диагностики синдрома «гепарининдуцированной тромбоцитопении» // Медицинский Алфавит. – 2011. – Т. 1, № 1. – С. 44-46.

72. Кравченко, К.Л. Связь динамики дорожно-транспортных происшествий в Иркутске с уровнем геомагнитной активности / К.Л. Кравченко, С.А. Язев, Г.В. Гречаный // Солнечно-земная физика. – 2005. – № 8. – С. 187-189.

73. Кузьмина, Л.А. Гематология детского возраста / Л.А. Кузьмина. – М.: МЕДпресс, 2001. – 400 с.

74. Кунгурцев, Е.В. Тромболизис при эмболии легочной артерии у больных с тромбозом глубоких вен нижних конечностей / Е.В. Кунгурцев, И.П. Михайлов, О.В. Никитина [и др.] // Флебология. – 2012. – Т. 6, № 1. – С. 48-51.

75. Лю, Б.Н. Роль митохондрий в развитии и регуляции уровня окислительного стресса в норме, при клеточных патологиях и реверсии опухолевых клеток / Б.Н. Лю, М.Б. Лю, Б.И. Исмаилов // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126, № 4. – С. 388-398.

76. Лянг, О.В. Концентрация фибриногена в оценке безопасности и эффективности тромболитической терапии у больных ишемическим инсультом / О.В. Лянг, А.Г. Кочетов, Н.А. Шамалов // Терапевтический архив. – 2012. – Т. 84, № 10. – С. 42-47.

77. Майданник, В.Т. Роль активных форм кислорода в повреждении сосудов в эксперименте и клинике / В.Т. Майданник, Н.В. Хайтович,

Е.А. Бурлака: (X Конгресс педиатров России) // Вопросы современной педиатрии. – 2006. – Прил. - С. 352-353.

78. Макацария, А.Д. Антифосфолипидный синдром, генетические тромбофилии в патогенезе основных форм акушерской патологии / А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе // Русский медицинский журнал. Тромбофилии в акушерской и гинекологической практике. – 2006. – Спец. вып. – С.2 – 10.

79. Мамаев, А.Н. Способ диагностики тромбофилии вследствие гиперпродукции фактора VIII / А.Н. Мамаев, Е.В. Петрова, З.С. Баркаган // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 5. – С. 26-28.

80. Маслякова, Г.Н. О сущности и значении диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови в патологии / Г.Н. Маслякова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005. – № 1 (21). – С. 8-12.

81. Матвеева, И.И. Оксид азота и эндогенная интоксикация у онкологических больных / И.И. Матвеева, Г.Н. Зубрихина, Э.Г. Горожанская // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19, № 4. – С. 55-60.

82. Матейкович, Е.А. Влияние изменений липопероксидации на непрерывное внутрисосудистое свертывание / Е.А. Матейкович // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 12 – С. 59-60.

83. Меньшикова, Е.Б. Проксиданты и оксиданты / Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

84. Меньшикова, Е.Б. Окислительный стресс. Патологические состояния заболевания / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин. – Новосибирск: Арта, 2008. – 284 с.

85. Микко, П.Д. Риск развития тромбофилии у пациентов онкологического профиля, связанный с повышенным уровнем фрагмента 1+2 протромбина и D-димера в плазме крови / П.Д. Микко, Д.Д. Лючия, Ф.Д. Вита [и др.] // Экспериментальная онкология. – 2002. – № 24: – С. 108-111.

86. Мишина, Н.А. Особенности формирования окислительного стресса в эритроцитах крови у больных хронической обструктивной болезнью лёгких / Н.А. Мишина // Аспирантский вестник Поволжья [Электронный ресурс]. – 2009.

– № 7-8. – С. 42-46. – Режим доступа: http://aspvestnik.com/issues/2009_7-8/09_mishina.html (11.03.15).

87. Моин, В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лабораторное дело. – 1986, № 12. – С.724-727.

88. Моисеев, С.В. Профилактика тромбоэмболических осложнений при эндопротезировании суставов / С.В. Моисеев, С.С. Копёнкин // Consilium medicum. Хирургия. – 2006. – №1. – С. 36-39.

89. Моисеев, С.В. Профилактика тромбоэмболических осложнений при эндопротезировании суставов / С.В. Моисеев, С.С. Копёнкин // Consilium medicum. Хирургия. – 2006. – №1. – С. 36-39.

90. Момот, А.П. Методика и клиническое значение паракоагуляционного фенантролинового теста / А.П. Момот, В.А. Елыкомов, З.С. Баркаган // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – № 4. – С. 17-20.

91. Мухамедова, У.М. Параметры системы гемостаза у больных ишемической болезнью сердца, подвергшихся аортокоронарному шунтированию в плановом порядке, и оценка объема кровопотерь / У.М. Мухамедова, М.А. Карпенко, Е.Г. Шацкая // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2011. – Т. 36, № 4. – С. 48-55.

92. Небылицин, Ю.С. Острый тромбоз глубоких вен нижних конечностей: современное состояние проблемы / Ю.С. Небылицин // Новости хирургии. – 2006. – Т. 14, № 4. – С. 107-116.

93. Падеров, Ю.М. К вопросу о танатогенезе / Ю.М. Падеров // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 1-2. – С. 8-10.

94. Пантелеев, М.А. Практическая коагулология / М.А. Пантелеев, С.А. Васильев, Е.И. Синауридзе [и др.]; под ред. А.И. Воробьева. - М.: Практическая медицина, 2011. – 192 с.

95. Парфенов, В.А. Лечение и профилактика ишемического инсульта / В.А. Парфенов// Consilium Medicum. – 2002. – № 2. – С. 66-71.

96. Первушин, Ю.В. Лабораторные методы исследования системы гемостаза и диагностика нарушений системы гемокоагуляции / Ю.В. Первушин, С.Ш. Рогова, Н.И. Ковалевич. – М.; Ставрополь: СГМА, 2009. – С. 38-39.

97. Петриков, А.С. Гипергомоцистеинемия – фактор риска развития тромбоза глубоких вен / А.С. Петриков, Я.Н. Шойхет, В.И. Белых [и др.] // Медицина и образование в Сибири: сетевое научное издание [Электронный ресурс]. – 2011. – № 4. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=508 (29.01.15).

98. Петриков, А.С. Фармакологическая коррекция гипергомоцистеинемии у больных с венозными тромбозомболическими осложнениями / А.С. Петриков, Я.И. Шохейт, В.И. Белых, Г.И. Костюченко // Флебология. – 2012. – № 4. – С. 24-28.

99. Пиголкин, Ю.И. Новая рабочая классификация следов крови / Ю.И. Пиголкин, Е.Н. Леонова, И.А. Дубровин [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. - 2014. - Т. 57, № 1. - С. 11-15.

100. Пиктевич, Ю.Э. Возможности оптимизации лечения больных с внутрисуставными переломами проксимального метаэпифиза большеберцовой кости / Ю.Э. Пиктевич, Д.А. Маланин, Л.Л. Черезов, О.Г. Тегерин // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2006. – № 1. – С. 52.

101. Писарев, В.В. Особенности антеградного кровотока и венозные тромбозомболические осложнения у больных с переломами костей голени и бедра / В.В. Писарев, С.Е. Львов, О.И. Кутырева, О.С. Молчанов // Травматология и ортопедия России. – 2009. – Т. 2, № 52. – С. 33-38.

102. Покровский, А. А. Биохимические методы исследования в клинике / А.А. Покровский - М.: Медицина, 1969. – 652с.

103. Порсуков, Э. А. Современные морфологические критерии внезапной сердечной смерти / Э.А. Порсуков // Судебно-медицинская экспертиза. – 2009. – № 4. – С. 7-11.

104. Приказ Минздрава РФ от 09.7.2003 № 233 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Профилактика

тромбоэмболии легочной артерии при хирургических и иных инвазивных вмешательствах»»: зарег. в Минюсте РФ 02.06.2003; регистр. № 4616 // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2003. – № 7.

105. Приказ Минздрава РФ от 24.04.2003 № 161 «Об утверждении инструкции по организации и производству экспертных исследований Бюро судебно-медицинской экспертизы»: зарег. в Минюсте РФ 02.06.2003; регистр. № 4616 // Российская газета. – 2010. – 23 августа. – № 5266.

106. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 24.04.2008 № 194н «Об утверждении медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека»: зарег. в Минюсте РФ 13.08.2008; регистр. № 12118; вступил в силу 31.08.2008 // Российская газета. – 2008. – 5 апреля. – № 5265.

107. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 12.05.2010 № 346Н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации»: зарег. в Минюсте РФ 10.08.2010 г.; регистр. № 181; вступил в силу 31.08.2010 // Российская газета. – 2010. – 20 августа. – № 5265.

108. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва "Об утверждении Правил лабораторной практики": зарег. в Минюсте РФ 13.10.2010; регистр. № 18713; вступил в силу 02.11.2010 // Российская газета. – 2010. – 22 октября. – № 5319

109. Прогноз развития медицинской науки на период до 2025 года: утвержден президиумом РАМН 31 января 2007 года, протокол №2, §1 / РАМН; НИИ общественного здоровья РАМН; Минздравсоцразвития России по комплексным проблемам медицины. – М.: Изд-во РАМН, 2007. – Режим доступа: https://www.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fstgmu.ru%2Fuserfiles%2Fdepts%2Fpublic_health%2Ffolder%2Fprognoz2025.doc&ei=HpVcVPL_A4XWPeqfgZgG&usg=AFQjCNFE XwqT3ImWbjEjhoRh3ExssLVsXQ&bvm=bv.79184187,d.ZWU&cad=rjt (29.01.15).

110. Профилактика венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений в травматологии и ортопедии: российские клинические рекомендации, утверждены на совещании экспертов 25.06.2011 / руководители проекта академик РАН и РАМН проф. С.П. Миронов, акад. РАМН проф. А.И. Кириенко, проф. А.В. Скороглядов // Травматология и ортопедия России. – 2012. – Т. 63, № 1. – 25 с.

111. Румянцев, А.Г. Профилактика тромбоза глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии: пособие для врачей / А.Г. Румянцев, Е.Д. Пашанов. – М., [2008]. – 32 с.

112. Пустынников, А.В. Взаимодействие тромбин-фибриноген, толерантность к тромбину и липопероксидация зависят от обеспеченности витамином Е / А.В. Пустынников, Е.М. Шаповалова, М.К. Умутбаева // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – № 11 – С. 98-99.

113. Распоряжение правительства РФ от 28 декабря 2012 года № 2580-р «Стратегия развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года» // Собрание законодательства Российской Федерации. – 14.01.2013. – № 2. – Ст. 111.

114. Рахматуллин, Э.В. Смертность населения Республики Башкортостан от дорожно-транспортных происшествий: уровень, динамика, потери здоровья // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – С. 1215.

115. Репина, М.А. Заместительная гормональная терапия препаратом Анжелик: состояние углеводного обмена и гемостаза / М.А. Репина, Т.А. Зинина, С.Р. Кузьмина-Крутецкая // Журнал акушерства и женских болезней. – 2006. – Т. 55, № 1. – С. 70-74.

116. Реутов, В.П. Возможная роль диоксида азота, образующегося вместе с бифуркации сосудов, в процессах их повреждения при геморрагических инсультах и образовании атеросклеротических бляшек / В.П. Реутов, Е.Г. Соркина, В.Н. Швалев [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2012. – Т. 43, № 4. – С. 73-93.

117. Родюкова, И.С. «Молчащая эпидемия»: Тромбоэмболия легочной артерии в практике клинициста / И.С. Родюкова, Е.А. Прохорович, А.В. Носова // Врач скорой помощи. – 2012. – № 4. – С. 55-62.

118. Савельев, В.С. Послеоперационные венозные тромбоэмболические осложнения: фатальная неизбежность или контролируемая опасность? / В.С. Савельев // Хирургия. – 1999. – № 6. – С. 60-63.

119. Савельев, В.С. Флебология: руководство для врачей / В.С. Савельев, В.А. Гологорский, А.И. Кириенко, Б.Р. Гельфанд; под ред. С.В. Савельева. – М.: Медицина, 2001. – С. 390-408.

120. Савин, И.А. Тяжелые тромботические осложнения в послеоперационном периоде у ребенка после удаления краниофарингеомы / И.А. Савин, А.Ю. Лубнин, К.М. Горшков [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2011. – № 1. – С. 62-66.

121. Савчук, А.Н. Роль продуктов расщепления фибриногена\фибрина и растворимых фибрин-мономерных комплексов в развитии тромбофилии / А.Н. Савчук // Лабораторная диагностика. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 15-19.

122. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) утвержденные Главным Государственным санитарным врачом СССР П.Н.Бургасовым от 6 апреля 1973 г. N 1045-73. – Режим доступа: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/182.html> (15.03.15)

123. Сирота, Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // Вопросы медицинской химии. – 1999. – № 3. – С. 14-15.

124. Скороглядов, А.В. Профилактика тромбоэмболических осложнений у травматологических больных в остром периоде травмы / А.В. Скороглядов, С.С. Копенкин // Материалы городского симпозиума, Москва, 10 дек. 2002 г. – М., 2003. – С. 11-20.

125. Скулачев, В.П. Эволюция, митохондрии и кислород / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 4-10.

126. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. – М.: АстраФармСервис, 2010. – 1728 с. – Б660 – Б661.
127. Стальная, И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная. – М.: Медицина, 1977. – С. 63-64.
128. Станиченко, Н.С. Современные возможности диагностики и лечения тромбоэмболии легочной артерии / Н.С. Станиченко, Б.И. Загидуллин, Р.А. Якубов // Практическая медицина. – 2012. – № 60. – С. 128-132.
129. Струкова, С.М. Роль тромбоцитов и сериновых протеаз в сопряжении свертывания крови и воспаления / С.М. Струкова // Биохимия. – 2004. – № 69(10). – С. 1314–1331.
130. Турпаев, К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К.Т. Турпаев // Биохимия. – 2002. – Т. 61. – С. 339-352.
131. Фетисова И.Н. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека / И.Н. Фетисова // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2006. – Т. 11, № 1-2. – С. 77-83.
132. Черемисина, З.П. Хемилюминесцентное определение активности супероксиддисмутазы / З.П. Черемисина, Т.Б. Сулова, Л.Г. Коркина // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. – № 1. – С. 22-23.
133. Чернышев, И.В. Комплексная профилактика тромбоэмболических осложнений у урологических больных / И.В. Чернышев, Д.В. Перепечин // Экспериментальная и клиническая урология. – 2012. – № 1. – С. 57-62.
134. Шаповалов, В.М. Дифференцированный подход к выбору способа репозиции и метода фиксации при переломах мыщелков большеберцовой кости / В.М. Шаповалов, В.В. Хоминец, О.В. Рикун [и др.] // Профилактическая и клиническая медицина. - 2011. - Т.38, № 1. — С. 133-140.
135. Шепелев, А.П. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопапов // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561-581.

136. Шепелев, А.П. Перекисное окисление липидов и система антиоксидантов в норме и при патологии / А.П. Шепелев, Л.А. Шовкун. – Ростов н/Д: РостГМУ, 2012. – 363 с.
137. Шмаков, А.Н. Профилактика гиперфузии мозговых капилляров при тяжелой черепно-мозговой травме / А.Н. Шмаков, Г.А. Окладников, А.В. Марков // Нейроанестезиология, 2 - 4 июня 2002 г. – СПб., 2002. – С. 449-450.
138. Шор, Г.В. О смерти человека (введение в танатологию) / Г.В. Шор. – СПб: Изд-во СПбГМУ, 2002. – 272 с.
139. Эделева, Н.В. Антиоксиданты церулоплазмин и лактоферрин в профилактике и лечении послеоперационных осложнений у онкологических больных / Н.В. Эделева, Т.В. Сергеева, Е.Р. Немцова [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2001. – № 5. – С. 61-64.
140. Abe, M. International normalized ratio decreases after hemodialysis treatment in patients treated with warfarin / M. Abe, N. Maruyama, H. Suzuki [et al.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2012. – Vol. 60, N 6. – P. 502-507.
141. Adnot, S. NO in the lung / S. Adnot, B. Raffestin, S. Eddahibi // Respir. Physiology. – 1995. – Vol. 114, N 6. – P. 109-120.
142. Akar, N. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke / N. Akar, E. Akar, D. Ozel [et al.] // Thromb. Res. – 2001. – Vol. 102, N 2. – P. 115-120.
143. Alderton, W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles // Biochem. J. – 2001. – Vol. 357, Pt. 3. – P. 596-615.
144. Ali, Z. Recurrent cerebral venous thrombosis associated with heterozygote methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and sickle cell trait without homocysteinemia: an autopsy case report and review of literature / Z. Ali, J.C. Troncoso, D.R. Fowler // Forensic Sci Int. – 2014. – Vol. 242. – P. e52-55.
145. Alikhan, R. Epidemiology of venous thromboembolism in cardiorespiratory and infectious disease / R. Alikhan, A.C. Spyropoulos // Am. J. Med. – 2008. – Vol. 121. – P. 935-942.

146. Angela, M. Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice / M. Angela, A.M. Devlin, E. Arning [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol.103. – P. 2624-2629.

147. Asselbergs, F.W. Effects of lymphotoxin-alpha gene and galectin-2 gene polymorphisms on inflammatory biomarkers, cellular adhesion molecules and risk of coronary heart disease / F.W. Asselbergs, J.K. Pai, K.M. Rexrode [et al.] // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2007. – Vol. 112, N 5. – P. 291-298.

148. Bagot, C.N. Virchow and his triad: a question of attribution / C.N. Bagot, R. Arya // *Br. J. Haematol.* – 2008. – Vol. 143, N 2. – P. 180-190.

149. Balta, G. PAI-1 gene 4G/5G genotype: A risk factor for thrombosis in vessels of internal organs / G. Balta, C. Altay, A. Gurgey // *Am. J. Hematol.* – 2002. – Vol. 71, N 2. – P. 89-93.

150. Bertina, R.M. The 46C→T polymorphism in the factor XII gene (F12) and the risk of venous thrombosis / R.M. Bertina, S.R. Poort, H.L. Vos, F.R. Rosendaal // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 3, N 3. – P. 597-599.

151. Bidlack, W.R. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation / W.R. Bidlack, A.L. Tappel // *Lipids*. – 1973. – Vol. 68, N 4. – P. 203-209.

152. Bölükbas, S. Drug-eluting stents: implications for surgery patients / S. Bölükbas, J. Jähne, J. Schirren // *Chirurg*. – 2009. – Vol. 80, N 6. – P. 502-507.

153. Briviba, K. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems / K. Briviba, I-O. Klorz, H. Sics // *Bio. Chem.* – 1997. – Vol. 378. – P. 1259-1265.

154. Brothers, T.E. Is duplex venous surveillance worthwhile after arthroplasty? / T.E. Brothers, C.E. Frank, B. Frank [et al.] // *Surg Res*. – 1997. – Vol. 67, N 1. – P. 72-78.

155. Butt, C. Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction / C. Butt, H. Zheng, E. Randell [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 101, N 8. – P. 3037-3041.

156. Candore, G. Association between platelet glycoprotein Ib-alpha and myocardial infarction: results of a pilot study performed in male and female patients from Sicily / G. Candore, G. Piazza, A. Crivello [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol.1089. – P. 502-508.
157. Canepa, A. Homocysteine, folate, vitamin B12, and C677T MTHFR mutation in children with renal failure / A. Canepa, A. Carrera // *Pediatr nephrol.* – 2003. – Vol. 18 – P. 225-229.
158. Castaman, G. Association of protein S p.Pro667Pro dimorphism with plasma protein S levels in normal individuals and patients with inherited protein S deficiency / G. Castaman, E. Biguzzi., C. Razzari [et al.] // *Thromb. Res.* – 2007. – Vol. 120, N 3. – P. 421-426.
159. Cattaneo, M. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism / M. Cattaneo // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2006. – Vol. 32. – P. 716-723.
160. Cervantes, J. Virchow's Legacy: deep vein thrombosis and pulmonary embolism / J. Cervantes, G. Rojas // *World J Surg.* – 2005. – Vol. 29. – P. S30-34.
161. Chambers, J.C. Acute hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction / J.C. Chambers, A. Mc Gregor, J. Jean-Marie, J.S. Kooner // *Lancet.* – 1998. – Vol. 351, N 9095 – P. 36-37.
162. Chen, F.Y. Effect of hyperhomocysteinemia on cardiac remodeling in rats Beijing / F.Y. Chen, Y.H. Guo, W. Gao [et al.] // *Da Xue Xue Bao.* – 2006. – Vol. 38, N 2. – P. 179-183.
163. Chen, Z. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition / Z. Chen, A.C. Karaplis, S.L. Ackerman [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2001 – Vol. 10 – P. 433-443.
164. Cheng, D.M. Polymorphism of MTHFR C677T, serum vitamin levels and cognition in subjects with hyperhomocysteinemia in China / D.M. Cheng, Y.G. Jiang, C.Y. Huang [et al.] // *Nutr Neurosci.* – 2010. – Vol. 13, N 4. – P. 175-182.

165. Chenlong, L. Nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue / L. Chenlong, J. Anmin, Z. Chusong, C. Bin // *Chin. Med. J.* – 2002. – Vol. 115, N 5. – P. 740-742.

166. Chitlur, M. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group / M. Chitlur, B. Sorensen, G.E. Rivard [et al.] // *Haemophilia.* – 2011. – Vol. 17, N 3. – P. 532-537.

167. Clarke, R. Homocysteine lowering trialists collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomized trials / R. Clarke // *BMJ.* – 1998. – Vol. 316, N 5. – P. 894-898.

168. Cohen, W. ABO Blood Group and von Willebrand Factor Levels Partially Explained the Incomplete Penetrance of Congenital Thrombophilia / W. Cohen, C. Castelli, M.C. Alessi [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32, N 8. – P. 2021-2028.

169. Cooke, J.P. Cellular mechanisms of atherogenesis and the effects of nitric oxide / J.P. Cooke, P. Tsao // *Curr Opin Cardiol.* – 1992. – Vol. 7. – P. 799-804.

170. Dager, W.E. Dabigatran effects on the international normalized ratio, activated partial thromboplastin time, thrombin time, and fibrinogen: a multicenter, in vitro study / W.E. Dager, R.C. Gosselin, S. Kitchen, D. Dwyre // *Ann Pharmacother.* – 2012. – Vol. 46, N 12. – P. 1627-1636.

171. Davie, E.W. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting / E.W. Davie, O.D. Ratnoff // *Science.* – 1964. – Vol. 145. – P. 1310-1312.

172. Davis, G.K. Molecular genetics of the renin-angiotensin system: implications for angiotensin II receptor blockade / G.K. Davis, D.H. Roberts // *Pharmacol Ther.* – 1997. – Vol. 75. – P. 43-50.

173. Davison, A.M. Fatal thromboembolic complications following assault in a subject with an abdominal aortic aneurysm / A.M. Davison // *Forensic Sci Med Pathol.* – 2009. – Vol. 5, N 2. – P. 90-94.

174. Dayal, S. ADMA and hyperhomocysteinemia / S. Dayal, S.R. Lentz // *Vasc Med.* – 2005. – Vol. 10, N 1. – P. S27-33.

175. Dayal, S. Murine Models of Hyperhomocysteinemia and Their Vascular Phenotypes *Arterioscler Thromb / S. Dayal, S.R. Lentz // Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 1596-1605.
176. De Marco, P. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk / P. De Marco, E. Merello, M.G. Calevo [et al.] // *J Hum Genet.* – 2005 – Vol. 51, N 2. – P. 98-103.
177. de Visser, M.C. Factor X levels, polymorphisms in the promoter region of factor X, and the risk of venous thrombosis / M.C. de Visser, S.R. Poort, H.L. Vos [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2001. – Vol. 85, N 6. – P. 1011-1017.
178. den Heijer, M. Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial / M. den Heijer, H.P. Willems, H.J. Blom [et al.] // *Blood.* – 2007 – Vol. 109. – P. 139-144.
179. Dentali, F. Seasonal and monthly variability in the incidence of venous thromboembolism. A systematic review and a meta-analysis of the literature / F. Dentali, W. Ageno, E. Rancan [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2011. – Vol. 106, N 3. – P. 439-447.
180. Di Benedetto, P. Thrombelastography. Present and future perspectives in clinical practice / P. Di Benedetto, M. Baciarello, L. Cabetti [et al.] // *Minerva Anesthesiol.* – 2003. – Vol. 69, N 6. – P. 501-509, 509-515.
181. Dickson, B.C. Fatal thromboembolic disease: a risk in physically restrained psychiatric patients / B.C. Dickson, M.S. Pollanen // *J. Forensic. Leg. Med.* – 2009. – Vol. 16, N 5. – P. 284-286.
182. Doix, S. Factor V Leiden and myocardial infarction: a case, review of the literature with a meta-analysis / S. Doix, M. Mahrousseh, M. Jolak [et al.] // *Ann. Cardiol. Angeiol (Paris).* – 2003. – Vol. 52, N 3. – P. 143-149.
183. Donahue, B.S. Tissue factor and platelet glycoprotein Ib-alpha alleles are associated with age at first coronary bypass operation / B.S. Donahue, D.W. Byrne, D. Gailani, A.L. George // *Anesthesiology.* – 2003. – Vol. 99. - P. 1287–1294.

184. Dordević, V. Vojnosanit factor V Leiden, FII G20210A, MTHFR C677T mutations as risk factors for venous thrombosis during pregnancy and puerperium / V. Dordević, L. Rakićević, M. Spasić [et al.] // *Pregl.* – 2005. – Vol. 62, N 3. – P. 201-205.
185. Dossenbach-Glaninger, A. Coagulation factor XI: a database of mutations and polymorphisms associated with factor XI deficiency / A. Dossenbach-Glaninger, P. Hopmeier // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 2005. – Vol. 16, N 4. – P. 231-238.
186. Durmazlar, S.P. Hyperhomocysteinemia in patients with stasis dermatitis and ulcer: a novel finding with important therapeutic implications / S.P. Durmazlar, A. Akgul, F. Eskioglu // *J. Dermatolog. Treat.* – 2009. – Vol. 20, N 6. – P. 336-339.
187. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch. Biochem.* – 1959. – Vol. 82, N 1. – P. 70-77.
188. Eom, M. Three cases of pulmonary thromboembolism and extensive prayer (invocation) activity as a new possible risk factor / M. Eom, S.C. Lim, Y. Shin Kim // *Am. J. Forensic Med. Pathol.* – 2009. – Vol. 30, N 2. – P. 191-194.
189. Ferrara, F. The association between the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and extension of postsurgical calf vein thrombosis / F. Ferrara, F. Meli, F. Raimondi [et al.] // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 2013. – Vol. 24, N 3. – P. 237-242.
190. Fineschi, V. Histological age determination of venous thrombosis: a neglected forensic task in fatal pulmonary thrombo-embolism / V. Fineschi, E. Turillazzi, M. Neri [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2009. – Vol. 186, N 1-3. – P. 22-28.
191. Fineschi, V. Fatal pulmonary thromboembolism. A retrospective autopsy study: Searching for genetic thrombophilias (Factor V Leiden (G1691A) and FII (G20210A) gene variants) and dating the thrombus / V. Fineschi, V. Bafunno, S. Bello [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 214. – P. 152-158.
192. Finkel, T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing / T. Finkel, N.J. Holbrook // *Nature.* – 2000 – Vol. 408. – P. 239-247.
193. Franchis, R. Elevated total plasma homocysteine and 677C-->T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombotic vascular disease /

R. Franchis, F.P. Mancini, A. D'Angelo [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1996. – Vol. 59. – P. 262-264.

194. Franco, R.F. Gene polymorphism of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease / R.F. Franco, P.H. Reitsma // *Br. J. Haematol.* – 2001. – Vol. 115. – P. 491-506.

195. Fridovich, I Superoxide anion radical (O_2^*) superoxide dismutases and related matter / I Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1997 – Vol. 272. – P. 18515-18517.

196. Fried, R. Enzymatic & non-enzymatic assay of superoxidedismutase / R. Fried // *Biochem.* – 1975. – Vol. 57, N 5. – P. 657-660.

197. Fromovich-Amit, Y. Characterization of mutations causing factor VII deficiency in 61 unrelated Israeli patients / Y. Fromovich-Amit, A. Zivelin, N. Rosenberg [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2004 – Vol. 2, N 10. – P. 1774-1781.

198. Fukasawa, M. The methyltetrahydrofolate reductase C677T point mutation is a risk factor for vascular access thrombosis in hemodialysis patients / M. Fukasawa, K. Matsushita, M. Kamiyama [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2003. – Vol. 41, N 3. – P. 637-642.

199. Furie, B. Molecular and cellular biology of blood coagulation / B. Furie, B.C. Furie // *N. Engl. J. Med.* – 1992. – Vol. 326. – P.800-806.

200. Furie, B. Pathogenesis of thrombosis / B. Furie // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* – 2009. – P.255-258.

201. Gallerani, M. Seasonal variation in the occurrence of deep vein thrombosis / M. Gallerani, B. Boari, D. de Toma [et al.] // *Med Sci Monit.* – 2004. – Vol. 10, N 5. – P. CR191-196.

202. Garagiola, I. Pitfalls in molecular diagnosis in a family with severe factor VII (FVII) deficiency--misdiagnosis by direct sequence analysis using a PCR product / I. Garagiola, R. Palla, F. Peyvandi // *Prenat Diagn.* – 2003. – Vol. 23, N 9. – P. 731-734.

203. Gaunt, T.R. A gene-centric analysis of activated partial thromboplastin time and activated protein C resistance using the HumanCVD focused genotyping array / T.R. Gaunt, G.D. Lowe, D.A. Lawlor [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 21, N 7. – P. 779-783.

204. Geerts, W.H. Prevention of venous thromboembolism / W.H. Geerts, J.A. Heit, G.P. Clagett [et al.] // *Chest*. – 2001. – Vol. 119, 1 Suppl. – P. 132S-175S.

205. Geerts, W. Prevention of venous thromboembolism. Seventh American College of Chest Physicians Consensus Conference on antithrombotic therapy / W. Geerts, G. Pineo, J. Heit [et al.]. // *Chest*. – 2004. – Vol. 126. – P. 338-400.

206. Ginnan, R. Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases / R. Ginnan, B.J. Guikema, K.E. Halligan [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 44. – P. 1232-1245.

207. Goodeve, A. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD) / A. Goodeve, J. Eikenboom, G. Castaman [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, N 1. – P. 112-121.

208. Grünbacher, G. The fibrinogen gamma (FGG) 10034C→T polymorphism is associated with venous thrombosis / G. Grünbacher, W. Weger, E. Marx-Neuhold [et al.] // *Thromb. Res.* – 2007. – Vol. 121, N 1. – P. 33-36.

209. Gupta, A. High homocysteine, low folate, and low vitamin B6 concentrations: prevalent risk factors for vascular disease in heart transplant recipients / A. Gupta, A. Moustapha, D.W. Jacobsen // *Transplantation*. – 1998. – Vol. 65, N 4. – P. 544-550.

210. Guttormsen, A.B. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. / A.B. Guttormsen, P.M. Ueland, I. Nesthus [et al.] // *Refsum. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98, N 9. – P. 2174-2183.

211. Haas, S. Deep vein thrombosis. Beyond the operating table / S. Haas // *Orthopedics*. – 2000. – Vol. 23, N 6. – P. 629-632.

212. Hagen, W. Effect of MTHFR genotypes and hyperhomocysteinemia on patients / W. Hagen, M. Fodinberg, G. Heinz [et al.] // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 59, Suppl. 78. – P. 253-257.

213. Hainaut, P. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism: a risk factor more prevalent in the elderly and in idiopathic cases / P. Hainaut, C. Jaumotte, D. Verhelst [et al.] // *Thromb. Res.* – 2002. – Vol. 106, N 2. – P. 121-125.
214. Hajat, C. Ethnic differences in risk factors for ischemic stroke: a European case-control study / C. Hajat, K. Tilling, J.A. N. Stewart Lemic-Stojcevic, C.D. Wolfe // *Stroke.* – 2004. – Vol. 35. – P. 1562-1567.
215. Hamsten, A. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction / A. Hamsten, B. Wiman, U. de Faire, M. Blomback // *N. Engl. J. Med.* – 1985. – Vol. 313. – P. 1557-1563.
216. Hancer, V.S. The association between factor XIII Val34Leu polymorphism and early myocardial infarction / V.S. Hancer, R. Diz-Kucukkaya., A.K. Bilge [et al.] // *Circ. J.* – 2006. – Vol. 70. – P. 239-242.
217. Hart, C.M. Nitric oxide in adult lung disease / C.M. Hart // *Chest.* – 1999. – Vol. 115, N 5. – P. 1407-1417.
218. Henkel, A.S. Homocysteine Supplementation Attenuates the Unfolded Protein Response in a Murine Nutritional Model of Steatohepatitis / A.S. Henkel, M.S. Elias, R.M. Green // *J. Biol. Chem.* – 2009 – Vol. 284, N 46. – P. 31807-31816.
219. Herrmann, M. Experimental Hyperhomocysteinemia Reduces Bone Quality in Rats / M. Herrmann, B. Wildemann, L. Claes [et al.] // *Clinical Chemistry.* – 2007. – Vol. 53, N 8. – P. 1455-1461.
220. Homans, J. Thrombosis of the deep leg veins due to prolonged sitting / J. Homans // *N. Engl. J. Med.* – 1954. – Vol. 250, N 4. – P. 148-149.
221. Hultqvist, M. Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde is markers of oxygen free radical production during hemodialysis / M. Hultqvist, J. Hegbrant // *Clin. Nephrol.* – 1997. – Vol. 47, N 1. – P. 37-46.
222. Isaacman, D.J. Closed head injury in children / D.J. Isaacman, M.P. Poirier, J.M. Loiselle // *Pediatr. Emerg. Care.* – 2002. – Vol. 18, N 1. – P. 48-52.

223. Ishikawa, T. An autopsy case of internal jugular vein thrombophlebitis involving sepsis following blunt neck injury / T. Ishikawa, B.L. Zhu, D.R. Li [et al.] // *J. Forensic Leg. Med.* – 2008. – Vol. 15, N 2. – P. 114-117.
224. Jabłoński, C. Thromboembolic complications in orthopedic surgery-medico-legal assessment in evaluation of correctness of medical treatment in selected cases / C. Jabłoński, M. Kobek, C. Chowaniec, M. Chowaniec // *Arch. Med. Sadowej. Kryminol.* – 2008. – Vol. 58, N 2-3. – P. 93-95.
225. Jamaluddin, M.S. Hyperhomocysteinemia, DNA methylation and vascular disease / M.S. Jamaluddin, X. Yang, H. Wang // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2007. – Vol. 45, N 12. – P. 1660-1666.
226. Jordan, F.L. The familial tendency in thrombo-embolic disease / F.L. Jordan, A. Nandorff // *Acta Med. Scand.* – 1956. – Vol. 156, N 4. – P. 267-275.
227. Kakkos, S.K. Economy class stroke syndrome: case report and review of the literature / S.K. Kakkos, G. Gerovlacos // *Eur J. Vase Endovasc Surg.* – 2004. – Vol. 27. – P. 239-243.
228. Keenan, H.T. Epidemiology and outcomes of pediatric traumatic brain injury / H.T. Keenan, S.L. Bratton // *Dev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 28, N 4-5. – P. 256-263.
229. Keijzer, M.B. Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis / M.B. Keijzer, M. den Heijer, H.J. Blom [et al.] // *Thromb. Hemost.* – 2002. – Vol. 88. – P. 723-728.
230. Kim, H. Significant associations of PAI-1 genetic polymorphisms with osteonecrosis of the femoral head / H. Kim, C-H. Cho, Y-J. Cho [et al.] // *BMC Musculoskeletal Disorders.* – 2011. – Vol. 12. – P. 160.
231. Kim, J.S. The Optimal Range of International Normalized Ratio for Radiofrequency Catheter Ablation of Atrial Fibrillation during Therapeutic Anticoagulation with Warfarin / J.S. Kim, K. Jongnarangsin, R. Latchamsetty [et al.] // *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* – 2013. – Vol. 6, N 2. – P. 302-309.

232. Kim, R.J. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies / R.J. Kim, R.C. Becker // *Am. Heart J.* – 2003. – Vol. 146, N 6. – P. 948-957.

233. Klemm, T. Impact of the Thr789Ala variant of the von Willebrand factor levels, on ristocetin co-factor and collagen binding capacity and its association with coronary heart disease in patients with diabetes mellitus type 2 / T. Klemm, A.K. Mehnert, A. Siegemund [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2005. – Vol. 113, N 10. – P. 568-572.

234. Klerk, M. MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis / M. Klerk, P. Verhoef, R. Clarke [et al.] // *JAMA.* – 2002. – Vol. 288, N 16. – P. 2023-2031.

235. Knowles, R.G. S. Nitric oxide synthases in mammals / R.G. Knowles, S. Moncada // *Biochem. J.* – 1994. – Vol. 298. – P. 249-258.

236. Korte, W. Short Activated Partial Thromboplastin Times Are Related to Increased Thrombin Generation and an Increased Risk for Thromboembolism / W. Korte, S. Clarke, J.B. Lefkowitz // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2000. – Vol. 113. – P. 123-127.

237. Koster, T. John Hageman's factor and deep-vein thrombosis: Leiden thrombophilia study / T. Koster, F.R. Rosendaal, T.E. Brie, J.P. Vandenbroucke // *Br. J. Haematol.* – 1994. – Vol. 87. – P. 422-424.

238. Kreidy, R. Lower extremity venous thrombosis in patients younger than 50 years of age / R. Kreidy, P. Salameh, M. Waked // *Vasc. Health Risk. Manag.* – 2012. – Vol. 8. – P. 161-167.

239. Kumar, D.R. Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology / D.R. Kumar, E. Hanlin, I. Glurich [et al.] // *Clin Med Res.* – 2010. – Vol. 8, N 3-4. - P. 168-172.

240. Lapidus, L.J. Symptomatic venous thromboembolism and mortality in orthopaedic surgery - an observational study of 45 968 consecutive procedures /

L.J. Lapidus, S. Ponzer, H. Pettersson, E. de Bri // BMC Musculoskelet Disord. – 2013. – Vol. 14, N 1. – P. 177.

241. Lee, H. A new case of fatal pulmonary thromboembolism associated with prolonged sitting at computer in Korea / H. Lee // Yonsei Med J. – 2004. – Vol. 45, N 2. – P. 349-351.

242. Lindman, A.S. Association between the factor VII haplotype containing the -402A allele and myocardial infarction in a population of elderly men at high risk for coronary heart disease / A.S. Lindman, J.I. Pedersen, H. Arnesen [et al.] // Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 94, N 1. – P. 226-227.

243. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.

244. Lucena, J. Pulmonary embolism and sudden-unexpected death: prospective study on 2477 forensic autopsies performed at the Institute of Legal Medicine in Seville / J. Lucena, A. Rico, R. Vázquez [et al.] // J. Forensic Leg. Med. – 2009. – Vol. 16, N 4. – P. 196-201.

245. Macfarlane, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier / R. G. Macfarlane // Nature. – 1964. – Vol. 202. – P. 498-499.

246. Makris, M. Factor V Leiden: to test or not to test, that is the debate / M. Makris // Blood Transfus. – 2012. – Vol. 10, N 3. – P. 255-256.

247. Margaglione, M. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease / M. Margaglione, G. Cappucci, D. Colaizzo [et al.] // Minno Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1998. – Vol. 18, N 2. – P. 152-156.

248. Masek, T. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels / T. Masek, V. Vopalensky, P. Suchomelova, M. Pospisek // Anal. Biochem. – 2005. – Vol. 336, N 1. – P. 46-50.

249. McGrath, J. The impact of nonlinear exposure-risk relationships on seasonal time-series data: modelling Danish neonatal birth anthropometric data /

J. McGrath, A. Barnett, D. Eyles [et al.] // BMC Med. Res. Methodol. – 2007. – N 7. – P. 45.

250. McMillan, C.W. Evolution of modern concepts of hemostasis. A backward glance at the discoveries that made modern practice possible / C.W. McMillan // Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 1981. – Vol. 3, N 1. –P. 97-103.

251. Meigs, J.B. Biomarkers of endothelial dysfunction / J.B. Meigs, N. Rifai // JAMA. – 2004 – Vol. 297. – P. 1978-1986.

252. Miao, C.Y. Chronic mild hyperhomocysteinemia induces aortic endothelial dysfunction but does not elevate arterial pressure in rats / C.Y. Miao, N. Villeneuve, C. Brunel-Jacquemin [et al.] // J. Vasc. Res. – 2005. – Vol. 42, N 2. – P. 148-156.

253. Mimasaka, S, A rare case of sudden death due to thrombus from the internal iliac vein / S. Mimasaka, T. Oshima, S. Tsunenari // J. Forensic Leg. Med. – 2008. – Vol. 15, N 2. – P. 101-103.

254. Miranda-Vilela, A.L. Mini Rev Role of polymorphisms in factor V (FV Leiden), prothrombin, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and Cystathionine β -synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias / A.L. Miranda-Vilela // Med. Chem. – 2012. – Vol. 12, N 10. – P. 997-1006.

255. Mobilia, F. Lethal pulmonary thromboembolism: an autopsy-based study on a rare but legally relevant event / F. Mobilia, M.B. Casali, M. Gallieni [et al.] // Med. Sci Law. – 2014 – Vol. 54, N 2. – P. 78-83.

256. Molina, J.A. Venous thromboembolism at the National Healthcare Group, Singapore / J.A. Molina, Z.G. Jiang, B.H. Heng, B.K. Ong // Ann. Acad. Med. Singapore. – 2009. – Vol. 38, N 6. – P. 470-478.

257. Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs // Pharmacol Rev. – 1991. – Vol. 43. – P. 109–142.

258. Morishita, E. One missense mutation in the factor X gene causing factor X deficiency – factor X Kanazawa / E. Morishita, K. Yamaguchi, H. Asakurab [et al.] // Int. J. Hematol. – 2001. – Vol. 73, N 3. – P.390-392.

259. Myerburg, R.J. Sudden cardiac death: epidemiology, transient risk and intervention assessment / R.J. Myerburg, K.M. Kassler, A. Castellanos // *Ann. Intern. Med.* – 1993. – Vol. 119, N 12. – P. 1187-1197.

260. Nadaud, S. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene / S. Nadaud, A. Bonnardeaux, M. Lathrop, F. Soubrier // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – Vol. 198. – P. 1027-1033.

261. Nielsen, V.G. Evaluation of the Contribution of Platelets to Clot Strength by Thromboelastography in Rabbits: The Role of Tissue Factor and Cytochalasin D / V.G. Nielsen, B.T. Geary, M.S. Baird // *Anesthesia & Analgesia.* – 2000. – Vol. 91, N 1. – P. 35-39.

262. Norlund, L. A common thrombomodulin amino acid dimorphism is associated with myocardial infarction / L. Norlund, J. Holm, B. Zuller, A.K. Ohlin // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 77, N 2. – P. 248-251.

263. Nosaka, M. Time-dependent appearance of intrathrombus neutrophils and macrophages in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age determination / M. Nosaka, Y. Ishida, A. Kimura, T. Kondo // *Int. J. Legal. Med.* – 2009. – Vol. 123, N 3. – P. 235-240.

264. Nutrient requirement of the mouse // *Nutrient Requirements of Laboratory Animals Fourth Revised Edition, 1995 / Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture National Research Council National Academy Press.* – Washington, D.C.: National Academy Press, 1995. – P. 80–102.

265. Nygard, O. Total homocysteine and cardiovascular disease / O. Nygard, S. Vollset, H. Refsum [et al.] // *J. Intern. Med.* – 1999. – Vol. 246 – P. 425-454.

266. Ogawa, M. R353Q polymorphism, activated factor VII, and risk of premature myocardial infarction in Japanese men / M. Ogawa, S. Abe, S. Biro [et al.] // *Circ. J.* – 2004. – Vol. 68, N 6. – P. 520-525.

267. Opdal, S.H. The sudden infant death syndrome gene: does it exist? / S.H. Opdal, T.O. Rognum // *Pediatrics.* – 2004. – Vol. 114, N 4. – P. 506-512.

268. Palmer, R.M. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor / R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada // *Nature*. – 1987. – Vol. 327. – P. 524-526.

269. Palmer, R.M. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation / R.M. Palmer, D.D. Rees, D.S. Ashton, S. Moncada // *Biochem. Biophys. Res Commun.* – 1988. – Vol. 153. – P. 1251-1256.

270. Perry, D.J. *Methods in molecular medicine. Hemostasis and Thrombosis Protocols* / D.J. Perry, K.J. Pasi. – Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1999. – 384 p.

271. Poort, S.R. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis / S.R. Poort, F.R. Rosendaal, P.H. Reitsma, R. M. Bertina // *Blood*. – 1996. – Vol. 88, N 10. – P. 3698-3703.

272. Prandoni, P. Optimal duration of anticoagulation in patients with venous thromboembolism / P. Prandoni, C. Piovella, L. Spiezia [et al.] // *Indian J. Med. Research*. – 2011. – Vol. 134. – P.15-21.

273. Prenskey, C. Symptomatic venous thrombo-embolism in low-energy isolated fractures in hospitalised patients / C. Prenskey, A. Urruela, M.S. Guss [et al.] // *Injury*. – 2013. – Vol. 44, N 8. – P. 1135-1139.

274. Rapaport, S. I. The tissue factor pathway: how it has become a “prima ballerina” / S. I. Rapaport, L.V. Rao // *Thromb. Haemostasis*. – 1995. – Vol. 74. – P. 7-17.

275. Reiner, A.P. Coagulation factor VII gene haplotypes, obesity-related traits, and cardiovascular risk in young women / A.P. Reiner, C.S. Carlson, M.J. Rieder [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5, N 1. – P. 42-49.

276. Reitsma, P.H. Procoagulant protein levels are differentially increased during human endotoxemia / P.H. Reitsma, J. Branger, B. van den Blink [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2003. – Vol. 1, N 5. – P. 1019-1023.

277. Reitsma, P.H. Past and future of genetic research in thrombosis / P.H. Reitsma, F.R. Rosendaal // *J. Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5, N 1. – P. 264-269.

278. Reitsma, P.H. Genetics in thrombophilia. An update / P.H. Reitsma // *Hamostaseologie*. – 2015. – Vol. 35, N 1. – P. 47-51.
279. Ridker, P.M. Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous thromboembolism / P.M. Ridker, J.P. Miletich, M.J. Stampfer [et al.] // *Circulation*. – 1995. – Vol. 92, N 10. – P. 2800-2802.
280. Ro, A. Pulmonary thromboembolism: overview and update from medicolegal aspects / A. Ro, N. Kageyama, T. Tanifuji, T. Fukunaga // *Leg. Med. (Tokyo)*. – 2008. – Vol. 10, N 2. – P. 57-71.
281. Rosendaal, F.R. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women / F.R. Rosendaal, D.S. Siscovick, S.M. Schwartz [et al.] // *Blood*. – 1997. – Vol. 90, N 5. – P. 1747-1750.
282. Rugeri, L. Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography / L. Rugeri, A. Levrat, J.S. David [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5, N 2. – P. 289-295.
283. Ruggeri, Z.M. Von Willebrand factor: looking back and looking forward / Z.M. Ruggeri // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 98, N 1. – P. 55-62.
284. Rutty, G.N. The PIVKA II test: the first reliable coagulation test for autopsy investigations / G.N. Rutty, A. Woolley, C. Brookfield [et al.] // *Int. J. Legal. Med.* – 2003. – Vol. 117, N 3. – P. 143-148.
285. Salooja, N. Thrombelastography / N. Salooja, D.J. Perry // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. – 2001. – Vol. 12. – P. 327-337.
286. Samama, Ch. Prevention of venous thromboembolism / Ch. Samama, M. Samama // *Congress of European Society of Anaesthesiology*. – Amsterdam, 1999. – P. 39-43.
287. Sass, C. Association between factor VII polymorphisms and blood pressure: the Stanislas Cohort / C. Sass, C. Blanquart, P.E. Morange [et al.] // *Hypertension*. – 2004. – Vol. 44, N 5. – P. 674-680.
288. Schindhelm, R.K. A patient with a prolonged activated partial thromboplastin time and a deep intracerebral haemorrhage / R.K. Schindhelm,

M.J. Wondergem, J. Admiraal [et al.] // Case Rep. Neurol. – 2012. – Vol. 4, N 2. – P. 131-136.

289. Schutgens, R.E. The role of fibrin monomers in optimizing the diagnostic work-up of deep vein thrombosis / R.E. Schutgens, F.J. Haas, M.J. Agterof [et al.] // Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 97, N 5. – P. 807-813.

290. Segal, J.B. Outcomes of genetic testing in adults with a history of venous thromboembolism / J.B. Segal, D.J. Brotman, A. Emadi [et al.] // Evid. Rep. Technol. Assess (Full Rep). – 2009. – Vol. 180. – P. 1-162.

291. Shen, Y.M. Rare deletion from the fibrinogen B β gene in a patient with a provoked venous thrombotic event / Y.M. Shen, R. Sarode, A. Bhogaraju, S. Brennan // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2011. – Vol. 22, N 7. – P. 613-615.

292. Sies, H. Antioxidant functions of vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids / H. Sies, W. Stahl // Am. J. Clin. Nutr. – 1995. – Vol. 62. – P. 1315S–1321S.

293. Signorelli, S.S. Thrombophilia in Patients With Lower Limbs Deep Veins Thrombosis (LDVT) Results of a Monocentric Survey on 103 Consecutive Outpatients / S.S. Signorelli, V. Fiore, G. Puccia [et al.] // Clin Appl Thromb Hemost. 2013. – Vol. 20, N 6. – P. 589-593.

294. Silverstein, M.D. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study / M.D. Silverstein, J.A. Heit, D.N. Mohr [et al.] // Arch. Intern. Med. – 1998. – Vol. 158. – P. 585-593.

295. Simpson, K. The pathology of sudden death / K. Simpson // Ann. R. Coll. Surg. Engl. – 1948. – Vol. 2, N 1. – P. 18-23.

296. Spiroski, I. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genotypes and haplotypes and plasma homocysteine levels in patients with occlusive artery disease and deep venous thrombosis / I. Spiroski¹, S. Kedev, S. Antov [et al.] // Acta biochimica Polonica. – 2008. – Vol. 55, N 3. – P. 587-594.

297. Stanger, O. DACH-LIGA Homocystein e.V. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and

thrombotic diseases: guidelines and recommendations / O. Stanger, W. Herrmann, R. Pietrzik [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2003. – Vol. 41, N 11. – P. 1392-1403.

298. Stanger, O. DACH-LIGA Homocystein e.V. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations / O. Stanger, W. Herrmann, R. Pietrzik [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2004. – Vol. 42, N 1. – P. 113-116.

299. Stikarová, J. Studies of structural and functional changes of fibrinogen // *Vnitr Lek.* – 2012. – Vol. 58, N 2. – P. 70-83.

300. Symington, I.S. Pulmonary thromboembolism after travel / I.S. Symington, B.H.R. Stack // *Br J. Chest.* – 1977. – Vol.17. – P.138-140.

301. Tadlock, M.D. The origin of fatal pulmonary emboli: a postmortem analysis of 500 deaths from pulmonary embolism in trauma, surgical, and medical patients / M.D. Tadlock, K. Chouliaras, M. Kennedy [et al.] // *Am J Surg.* – 2014 - Dec 18. pii: S0002-9610(14)00625-4. doi: 10.1016/j.amjsurg.2014.09.027. [Epub ahead of print].

302. Tajima, Y. A case of acute myocardial infarction after intracoronary stent implantation: demonstration of the stent location by postmortem X-ray examination / Y. Tajima, R. Takagi, Y. Kominato // *Leg. Med. (Tokyo).* – 2009. – Vol. 11, N 5. – P. 226-228.

303. Tanaka, K.A. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation / K.A. Tanaka, N.S. Key, J.H. Levy // *Anesth Analg.* – 2009. – Vol. 108, N 5. – P. 1433-1446.

304. Tang, L. Common genetic risk factors for venous thrombosis in the Chinese population / L. Tang, H.F. Wang, X. Lu [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 92, N 2. – P. 177-187.

305. Tapon-Bretonnière, J. Laboratory testing for venous thromboembolism / J. Tapon-Bretonnière // *Transfus. Clin. Biol.* – 2000. – Vol. 7, N 6. – P. 549-552.

306. Tarbox, A.K. Pulmonary embolism / A.K. Tarbox, M. Swaroop // *Int. J. Crit. Illn. Inj Sci.* – 2013. – Vol. 3, N 1. – P. 69-72.

307. Telci, A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients / A. Telci, U. Cakatay, S. Salman [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2000. – Vol. 50, N 3. – P. 213-223.
308. Thomassen, R. Antipsychotic medication and venous thrombosis / R. Thomassen, J.P. Vandenbroucke, F.R. Rosendaal // *Br. J. Psychiatry.* – 2001. – Vol. 179. – P. 63-66.
309. Thomsen, H. Aggregation of postmortem platelets after stimulation with collagen and arachidonic acid / H. Thomsen, K. Pueschel // *Leg. Med. (Tokyo).* – 1999. – Vol. 1, N 1. – P. 11-17.
310. Toulon, P. Fibrin polymerization defect in HIV-infected patients--evidence for a critical role of albumin in the prolongation of thrombin and reptilase clotting times / P. Toulon, E. Frere, C. Bachmeyer [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 1995. – Vol. 73, N 3. – P. 349-355.
311. Tran, R. Biomechanics of haemostasis and thrombosis in health and disease: from the macro- to molecular scale / R. Tran, D.R. Myers, J. Ciciliano [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2013. – Vol. 17, N 5. – P. 579-596.
312. Tsukada, T. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans / T. Tsukada, K. Yokoyama, T. Aral [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – Vol. 245. – P. 190-193.
313. Tu, C.Q. Novel double heterozygous mutations on Met306Val and Thr181Asn related to a hereditary coagulation factor VII deficiency / C.Q. Tu, C.Y. Deng, J.Z. Wu [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2006. – Vol. 86, N 2. – P. 124-127.
314. Tucker, K.L. Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study / K.L. Tucker, M.T. Hannan, N. Qiao [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* - 2005. – Vol. 20. – P. 152-158.
315. Ueland, P.M. MTHFR polymorphisms and disease / P.M. Ueland, R. Rozen. – Georgetown, TX: Landes Bioscience, 2005. – 224 p.

316. Vasan, R.S. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction / R.S. Vasan, A. Beiser, R.B. Agostino [et al.] // JAMA. – 2003. – Vol. 289, N 10. – P. 1251-1260.
317. Vellasco, A.P. Combined cysteine and homocysteine quantitation in plasma by trap and release membrane introduction mass spectrometry / A.P. Vellasco, R. Haddad, M.N. Eberlin [et al.] // Analyst. – 2002 – Vol. 127, N 8. – P. 1050-1053.
318. Vossen, C.Y. Linkage analysis for three coagulation factors clustering on chromosome 13q34: factor VII, factor X and protein Z / C.Y. Vossen, S.J. Hasstedt, C. Demers [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, N 6. – P. 1325-1327.
319. Wada, M. Effectiveness of deep vein thrombosis screening on admission to a rehabilitation hospital: a prospective study in 1043 consecutive patients / M. Wada, M. Iizuka, Y. Iwadate [et al.] // Thromb. Res. – 2013 – Vol. 131, N 6. – P. 487-492.
320. Wang, X.L. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene / X.L. Wang, A.S. Sim, R.F. Badenhop [et al.] // Nat. Med. – 1996. – Vol. 2. – P. 41-45.
321. Wang, X.L. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels / X.L. Wang, M.C. Mahaney, A.S. Sim [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vase Biol. – 1997. – Vol. 17. – P. 3147-3153.
322. Watanabe, M. Mice deficient in cystathionine-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia / M. Watanabe, J. Osada, Y. Aratani [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci U S A. – 1995 – Vol. 92. – P. 1585-1589.
323. Weiss, E.J. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis / E.J. Weiss, P.F. Bray, M. Tayback [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1996. – Vol. 334, N 17. – P. 1090-1094.
324. Winkler, U.H. Activated protein C resistance and deficiencies of antithrombin III, protein C or protein S and the risk of thromboembolic disease in users of oral contraceptives / U.H. Winkler // Eur J Contracept Reprod Health Care. – 1998. - Vol. 3, N 2. – P. 65-74.
325. White, J.G. Anatomy and structural organization of the platelet // Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice / Ed. by

R.W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, E.W. Salzman. – 3rd ed. – Philadelphia: Lippincott, 1994. – P. 397.

326. Wong, A. Hyperhomocysteinemia is associated with volumetric white matter change in patients with small vessel disease / A. Wong, V. Mok, Y.H. Fan [et al.] // J. Neurol. – 2006. – Vol. 253, N 4. – P. 441-447.

327. Zoller, B. Thrombophilia as a multigenic disease / B. Zoller, P. Garcia De Frutos, A. Hillarp, B. Dahlback // Haematologica. – 1999. – Vol. 84. – P. 59-70.