

ЕРМАКОВ

Алексей Игоревич

**Р-СЕЛЕКТИН И МИКРОВЕЗИКУЛЫ ТРОМБОЦИТАРНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКЕ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ
У ПАЦИЕНТОВ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ
АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук доцент
доктор биологических наук доцент

Гайковая Лариса Борисовна
Сироткина Ольга Васильевна

Официальные оппоненты:

Луговская Светлана Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии, профессор;

Мазуров Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии, главный научный сотрудник.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 16 июня 2026 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197345, г. Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте www.nrserm.ru.

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В России сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) - одна из главных причин смерти, уносящая жизни 56,4% населения. Ежегодные затраты на борьбу с ССЗ составляют 1 триллион рублей, что эквивалентно 3% ВВП. Несмотря на огромные социальные и экономические потери, система профилактики ССЗ в России недостаточно эффективна. Эксперты считают, что необходимо уделить больше внимания изучению и коррекции факторов риска, совершенствовать методы лечения и улучшить контроль за эффективностью проводимой терапии [Алекян Б.Г., 2014].

Ключевой особенностью патогенеза большинства заболеваний сердечно-сосудистой системы является атеротромбоз, клиническая картина которого существенно зависит от глубины окклюзионно-стенотического процесса в артериях и пораженных органах, что проявляется в виде серьезных осложнений ишемической болезни сердца (инфаркт миокарда, острый коронарный синдром), острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу (инсульт) и критической ишемии нижних конечностей [Borissoff J.I., 2011].

Летальность пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей (ОЗАНК) повышена в 2-4 раза, чем в соответствующей популяции по возрасту и полу, и достигает 60% за 5-10 лет в течение медицинского сопровождения. Число ампутаций нижних конечностей по жизненным показаниям в Российской Федерации составляет 78,5% у больных ОЗАНК старше 75 лет, а летальность пациентов с ОЗАНК через год после радикальной ампутации составляет 48,3% [Поляков П.И., 2013].

Наиболее эффективным подходом в тактике ведения пациентов с атеросклеротическими изменениями является превентивное воздействие на развитие атеротромботических осложнений.

Тромбоциты выступают в качестве основного участника активации артериального тромбоза, а также выполняют роль ключевого агента в его поддержании. В связи с этим антиагрегантные лекарственные препараты, подавляющие функцию тромбоцитов, выступают в качестве ведущего агента в патогенетической терапии сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклеротические поражения периферических артерий. Монотерапия с использованием ацетилсалициловой кислоты (АСК) в настоящее время представляет собой основу обеспечения антиагрегантной протекции при симптоматических поражениях артерий нижних конечностей или ранее проведенной процедуры реваскуляризации.

В случае высоких рисков атеротромбоза при неблагоприятном течении заболевания может быть использован ингибитор P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов – клопидогрел, а после проведенного стентирования – двойная антиагрегантная терапия (ДААТ), включающая сочетание ацетилсалициловой кислоты и одного из широко

используемых ингибиторов P2Y₁₂, блокирующих рецепторы тромбоцитов, например, клопидогрела [Dake M.D., 2016; Laird J.R., 2015; Franzone A., 2016; Bonaca M.P., 2016].

По некоторым литературным данным от 25% до 50% пациентов, получающих клопидогрел, имеют недостаточный фармакологический ответ, который проявляется в виде высокой остаточной реактивности тромбоцитов (ВОРТ). Как следствие, такие пациенты имеют высокий риск развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий тромботического характера или тромбоза стента [Tantry U.S., 2013; Siller-Matula J.M., 2013; Giorgi M.A., 2010; Trenk D., 2012].

Преодоление высокой остаточной реактивности тромбоцитов подразумевает замену ацетилсалициловой кислоты на другой антиагрегантный препарат или добавление к АСК любого блокатора P2Y₁₂-тромбоцитарных рецепторов. Повышение антиагрегантного эффекта может послужить возникновению кровотечений. Поэтому для достижения наилучшего терапевтического эффекта и безопасности применяемого лечения была предложена концепция «терапевтического окна», которая оценивается по данным тестирования функциональной активности тромбоцитов при использовании различных лабораторных методов [Bonello L., 2012; Campo G., 2011; Sibbing D., 2010].

Согласно клиническим исследованиям, проводимым в соответствии с национальными и международными стандартами оказания медицинской помощи, а также клиническим рекомендациям, существует перечень показаний для нормализации функциональной активности тромбоцитов – это риск развития тромбоза стента, риск развития кровотечения, подозрение на резистентность к одному из препаратов, приверженность пациента к проводимой терапии, перед подготовкой к операции, а также при назначении аналогов оригинального препарата [Aradi D., 2014; Windecker S., 2014; Ferraris V.A., 2012; Kristensen S.D., 2014].

Сложность реализации таких рекомендаций и определения нахождения пациента в «терапевтическом окне» определяется особенностями лабораторных методов оценки функции тромбоцитов, среди которых наибольшее распространение получили следующие: оптическая агрегатометрия, световая трансмиссионная агрегатометрия, импедансная агрегатометрия. Однако основными факторами, лимитирующими широкое применение данных методов в повседневной клинической практике, является сложность стандартизации, их недостаточная аналитическая точность, определенные требования к количеству тромбоцитов в образце, отсутствие четких и единых подходов в интерпретации конечного результата по полученным данным, а также высокая стоимость некоторых из них [Favaloro E.J., 2010].

Альтернативой вышеуказанным методам может выступать цитометрический анализ функциональной активности тромбоцитов в цельной крови. Этот метод позволяет анализировать две специфические, зависимые от активации, модификации мембраны тромбоцитов - количество рецепторов GP IIb-IIIa и экспонирование Р-селектина на

клеточной мембране, что соответствует степени активации тромбоцитов и «реакциям выброса» собственных гранул хранения, соответственно [McEver R.P., 1994; Karpelmayer J. et al, 2004; Shattil S.J. et al; 1985].

Клинические и фундаментальные биохимические исследования последних лет открыли роль внеклеточных микрочастиц (синоним – везикулы, микровезикулы). Во многих физиологических реакциях и, в том числе, процессах свертывания крови участвуют все без исключения внеклеточные везикулы. Изучается роль везикул различного клеточного происхождения, но считается, что наиболее высокой прокоагулянтной активностью обладают именно везикулы тромбоцитарного происхождения, которые одновременно являются и самыми многочисленными в плазме крови [Пантелеев М.А., 2017; Кубатиев А.А., 2017; Curry N., 2014]. Уникальные характеристики, постоянство и доступность тромбоцитарных внеклеточных микрочастиц делают их перспективными биомаркерами для применения в клинических лабораторных исследованиях. Количественное исследование содержания тромбоцитарных микрочастиц может выступать в качестве новой биоаналитической методологии, пригодной, как для разработки лабораторных тестов, позволяющих оценивать активацию системы гемостаза, так и для установления терапевтической эффективности антиагрегантных лекарственных препаратов у больных с атеросклеротическими поражениями сосудов нижних конечностей.

Таким образом, в настоящее время недостаточно изученной и актуальной областью биохимии коагуляционных реакций является характеристика микровезикул тромбоцитов, их клиническое значение, лабораторная идентификация и прикладное использование для оценки эффекта антиагрегантных препаратов. Изучение Р-селектина и микровезикул тромбоцитарного происхождения в лабораторной оценке функциональной активности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей открывает новые возможности контроля антиагрегантной терапии с помощью быстрого, воспроизводимого и высокочувствительного лабораторного теста [Orme R, 2017].

Степень разработанности темы

На сегодняшний день в крупных медицинских учреждениях при наличии централизованной лаборатории стала активно применяться технология проточной цитометрии для фенотипической характеристики клеток крови. Цитометрический анализ позволяет исследовать микровезикулы тромбоцитов, их агрегаты как между собой, так и с другими клетками крови, экспонирование различных тромбоцитарных рецепторов – это в совокупности лабораторные показатели, которые могут характеризовать агрегационный потенциал тромбоцитов и напрямую оценивают терапевтический эффект от антиагрегантов [Enjeti A.K., 2007; Storey R., 2002].

Также, проточная цитометрия в течение короткого времени измеряет специфические характеристики большого количества (например, 5000 или 10000) отдельных тромбоцитов, поэтому может использоваться у пациентов с тромбоцитопенией [Frelinger A.Lr., 2015; Kicken С.Н., 2017]. Поскольку для анализа требуются только минимальные объемы (5-10 мкл) цельной крови, данный метод подходит для исследований педиатрических образцов [Bednarek F.J., 2009]. Кроме того, тромбоциты анализируются в их физиологической среде - цельной крови с полным клеточным составом, без какой-либо предварительной обработки. Это позволяет оценивать работу тромбоцитов вместе с их естественным окружением – эритроцитами и лейкоцитами, измерять как базовое состояние циркулирующих тромбоцитов, так и их реактивность в ответ на различные агонисты без влияния артефактной активации «in vitro» вследствие предварительной обработки крови [LaRosa C.A., 1994].

Особое значение приобретает технология выделения и собственно детектирование внеклеточных везикул, которые балансируют между количеством выделенных микрочастиц и их специфичностью. Одним из методов анализа внеклеточных везикул с их возможным количественным определением также является проточная цитометрия. При всей привлекательности проточной цитометрии, в связи с ее высокой производительностью и специфичностью, остаются нерешенными вопросы влияния преаналитических и аналитических факторов на процесс измерения и результат анализа. Отсутствуют референтные интервалы для оценки функциональной активности тромбоцитов, а также значение уровня «cut-off» для оценки эффективности двойной антиагрегантной терапии у пациентов с облитерирующим атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей.

Цель исследования

Определить клинико-лабораторное значение измерения количества Р-селектина и микровезикул тромбоцитарного происхождения методом проточной цитометрии в оценке функциональной активности тромбоцитов на фоне приема двойной антиагрегантной терапии у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей.

Задачи исследования

1. Исследовать относительное количество микрочастиц тромбоцитарного происхождения, как функциональных молекул, характеризующих активность тромбоцитов у здоровых лиц.
2. Провести сравнительное исследование относительного количества Р-селектина, микрочастиц тромбоцитарного происхождения и параметров агрегации тромбоцитов у здоровых лиц и пациентов с ОЗАНК на фоне приема ДААТ.
3. Оптимизировать преаналитический и аналитический этапы определения количества поверхностного Р-селектина тромбоцитов с использованием метода проточной цитометрии.

4. Определить референтные интервалы содержания поверхностного Р-селектина тромбоцитов, измеренного с использованием проточной цитометрии.

5. Проанализировать результаты измерения остаточной реактивности тромбоцитов и определить критерии эффективности двойной антиагрегантной терапии у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей с использованием двух методов: оптической агрегатометрии и проточной цитометрии.

6. Выполнить клинико-экономический анализ использования метода проточной цитометрии и оптической агрегатометрии в оценке остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, которым назначена двойная антиагрегантная терапия.

Научная новизна

Впервые стандартизованы преаналитический и аналитический этапы для оценки функциональной активности тромбоцитов с использованием проточной цитометрии. Установлены референтные интервалы для оценки функциональной активности тромбоцитов по уровню экспонирования поверхностного Р-селектина методом проточной цитометрии в соответствии с Руководством CLSI C28-A3: «Определение, утверждение и проверка референтных интервалов в клинической лаборатории».

Впервые определена клиническая информативность для исследования экспонирования Р-селектина на тромбоцитах методом проточной цитометрии (чувствительность, специфичность, точность, уровень «cut-off»).

Впервые проведена комплексная лабораторная оценка функциональной активности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, принимающих ДААТ.

Впервые проведен клинико-экономический анализ 2-х технологий по оценке функции тромбоцитов методом проточной цитометрии и агрегатометрии у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, принимающих ДААТ.

Впервые методом проточной цитометрии исследованы тромбоцитарные микровезикулы у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, принимающих ДААТ.

Теоретическая и практическая значимость

Анализ изменения уровня экспонирования Р-селектина на поверхности активированных тромбоцитов и оценка микровезикул плазмы крови позволит дополнить знания о патогенетических механизмах активации тромбоцитов, а также о процессах микровезикуляции, которые сопровождают активацию клеток крови.

Оценка функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии позволяет индивидуально подойти к принятию решения об эффективности терапии или необходимости смены ДААТ у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей.

Определение Р-селектина методом проточной цитометрии может быть включено в перечень исследований по функциональной активности тромбоцитов в клинико-диагностических лабораториях.

Разработанные критерии эффективности ДААТ могут быть использованы и при оценке эффективности терапии заболеваний, связанных с атеросклерозом артерий других бассейнов.

Результаты диссертационной работы внедрены в лечебную практику отделения сердечно-сосудистой хирургии больницы Петра Великого ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова и ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа основана на обследовании 65 пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, принимающих различные схемы ДААТ; контрольной группы, состоящей из 120 условно здоровых добровольцев; группы сравнения – 15 человек с COVID-19. Для реализации цели исследования были использованы методы проточной цитометрии, оптической и трансмиссионной агрегатометрии, проведен статистический анализ полученных результатов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Функциональная молекула Р-селектин на поверхности тромбоцитов и количество надмолекулярных комплексов – микровезикул тромбоцитарного происхождения – отражают функциональное состояние тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей.

2. Стандартизация технологии лабораторного определения Р-селектина и валидация референтных интервалов его относительного количества на поверхности тромбоцитов позволяет повысить клиническую информативность метода и определить значение уровня «cut-off» для оценки эффективности антиагрегантной терапии.

3. Количественное содержание Р-селектина и тромбоцитарных микровезикул, измеренные методом проточной цитометрии, выступают в качестве не менее информативными, более стандартизованными и сопоставимыми по экономическим затратам показателями оценки остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, принимающих двойную антиагрегантную терапию, по сравнению с оптической агрегатометрией.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом материала, использованием высокотехнологического оборудования, современных методов исследования и статистической обработки полученных результатов.

Материалы диссертационного исследования представлены на 3-м Всемирном конгрессе "Controversies in Thrombosis and Haemostasis (COiTH) совместно с 8-й Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Москва,

2016 г.), VIV Всероссийской конференции с международным участием «Противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы» (Самара, 2020 г.), международном конгрессе International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2020 Virtual Congress, 2020 г.), международном симпозиуме XXXIV International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (ISLH2021 Virtual Meeting, 2021 г.), Форуме анти тромботической терапии с международным участием (Москва, 2021 г.), на III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021 г.).

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01142А «Функциональная активность тромбоцитов и передача сигналов межклеточного взаимодействия - роль микрочастиц, содержащих микроРНК» (рук. Сироткина О.В.).

Разработанный метод «Исследование функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии» внедрен в практику работы отделения клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова», а также в образовательную программу кафедры лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

По теме диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, 3 из которых в изданиях, определенных ВАК для опубликования основных научных результатов диссертации. Издано 1 учебное пособие.

Личный вклад автора

Автор лично сформулировал цель и задачи исследования, самостоятельно собрал данные литературы, составил дизайн исследования. Автор самостоятельно выполнил исследование функциональной активности тромбоцитов различными аналитическими методами, включая проточную цитометрию и стандартную агрегатометрию. Экспериментальные данные, приведенные в диссертации, получены, статистически обработаны, обобщены и проанализированы лично автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тема работы, использованные материалы и методы, полученные результаты, их обсуждение, выводы и практические рекомендации соответствуют паспорту специальности 3.3.8 – клиническая лабораторная диагностика (пункты 1, 2, 3) и 1.5.4 – биохимия (пункты 1, 10).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 122 страницах, содержит 19 таблиц и 29 рисунков. Диссертация включает введение, обзор литературы, главу материалы и методы исследования, главу собственных результатов и их обсуждения, заключение с выводами, практическими рекомендациями и списка цитированной литературы. Список литературы включает 157 источников (30 отечественных и 127 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

План научно-диссертационного исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ. Получено информированное согласие пациентов и здоровых добровольцев на участие в данном исследовании.

В клинико-лабораторное исследование были включены 65 пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей (ОЗАНК), которые проходили эндоваскулярное лечение в отделении сосудистой хирургии СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Эти пациенты составили основную группу.

Критериями включения больных с ОЗАНК в исследование являлись:

1. Мужчины или женщины в возрасте старше 45 лет.
2. Наличие информированного согласия на участие в исследовании.
3. Наличие у пациента подтвержденного диагноза: «I74.3 Эмболия и тромбоз артерий».

Критерии исключения из исследования включали следующие параметры:

1. Психиатрические или другие состояния, не позволяющие проведение исследования
2. Коагулопатия или заболевания с неконтролируемым кровотечением.
3. ХПН, уровень креатинина крови выше 110 мкмоль/л.
4. Наличие патологии со стороны органов ЖКТ и гепатобилиарной системы.
5. Тяжёлое общее состояние пациента, не позволяющее проведение хирургического вмешательства.
6. Отказ пациента от участия в исследовании.

По демографическим признакам основная группа состояла из 17 женщин и 48 мужчин, в возрасте $56,3 \pm 6,2$ года, которые находились на различных схемах двойной антиагрегантной терапии.

В зависимости от получаемой антиагрегантной терапии все 65 пациентов были разделены на подгруппы. Пациенты в первой подгруппе (N=55) получали двойную антиагрегантную терапию, включающую 75 мг Клопидогрела и 100 мг Ацетилсалициловой кислоты, кратность приема - 1 раз в сутки; пациенты во второй подгруппе (N=10) принимали 150 мг Клопидогрела и 100 мг Ацетилсалициловой кислоты, кратность приема - 1 раз в сутки.

Всем пациентам в основной группе с ОЗАНК проводилась трехкратная оценка функциональной активности тромбоцитов по уровню экспонирования Р-селектина – исходно (без приема антиагрегантных препаратов), на 5 и 10 сутки терапии антиагрегантными препаратами.

Оценка количества циркулирующих микрочастиц тромбоцитарного происхождения в периферической крови проводилась однократно:

- 1) у 15 пациентов (8 мужчин и 7 женщин) в возрасте $54,5 \pm 5,1$ лет из основной группы с ОЗАНК на фоне длительного (более 10 суток) приема ДААТ;

2) в группе пациентов с коагулопатией на фоне тяжелого инфекционного заболевания (Covid-19), как модели активации системы гемостаза и процессов везикуляции клеток крови. Всего в группу сравнения вошли 15 пациентов, 7 мужчин и 8 женщин, средний возраст $52,5 \pm 6,8$ лет, госпитализированных в ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова. Все пациенты данной группы имели высокие значения маркеров воспаления и повреждения тканей, а также маркеров активации системы гемостаза.

3) у 20 здоровых лиц, которые составили контрольную группу и были сопоставимы по полу (11 мужчин и 9 женщин) и возрасту ($57,5 \pm 3,9$ лет) как с группой пациентов с ОЗАНК, так и с пациентами с Covid-19.

При определении референтных интервалов для оценки функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии была набрана контрольная группа из 120 добровольцев (60 мужчин и 60 женщин) в возрасте от 18 до 75 лет.

Забор крови для лабораторных исследований у всех обследуемых осуществлялся в утренние часы, строго натощак (после 8-10 часового голодания) из кубитальной вены в вакуумные пробирки типа Vacuette с соответствующим антикоагулянтом согласно лабораторному исследованию.

Анализ агрегации тромбоцитов, индуцированной 20 мкМоль/л АДФ, выполнялся стандартным фотометрическим методом [Born G.V.R., 1962; Born G.V.R., 1964; O'Brien D.K. et al, 1966] на оптическом анализаторе агрегации тромбоцитов AP 2110 SOLAR (НПФ "SOLAR", Белоруссия).

В качестве дополнительного метода оценки эффективности ДААТ, использовалась тест-система «закрытого типа» VerifyNow P₂Y₁₂® (Accumetrics, США). Результат теста выражался в единицах PRU, которые показывают уровень АДФ-индуцированной агрегации, характерной для P₂Y₁₂-рецепторов тромбоцитов. Высокая остаточная реактивность тромбоцитов определялась как PRU ≥ 230 .

Для анализа функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии за основу был взят оригинальный метод оценки функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии [Сироткина О.В. и соавт., номер патента RU2442167C1, утверждение 2012 г.]. Цитометрическое исследование проводили в цельной венозной крови. Количественно экспонирование Р-селектина на поверхности тромбоцитов до и после индукции АДФ оценивали, как процент CD61/41/CD62P-позитивных клеток. В качестве индуктора активации тромбоцитов использовали раствор АДФ в конечной концентрации 20 мкМоль/л. Весь цитометрический анализ осуществлялся на 5-ти цветном проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

Для анализа тромбоцитарных микровезикул использовалась венозная кровь, содержащая консервант ЭДТА-К₂ в качестве антикоагулянта. Образцы центрифугировали

для получения бестромбоцитарной плазмы при 3500 g в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее, для анализа тромбоцитарных микровезикул в бестромбоцитарной плазме крови пациентов был использован набор Eхо-FACS (HansaBioMed Life Sciences, Эстония). Содержание тромбоцитарных микровезикул в исследуемых образцах оценивали, как процент позитивных частиц с фенотипом CD61/41+CD9+.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы STATISTICA 13.3 (разработчик - StatSoft.Inc), MedCalc 18.2 (разработчик - MedCalc Software Ltd.), используя методы параметрической (критерий Стьюдента) и непараметрической (критерий Манна-Уитни) статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование относительного количества микрочастиц тромбоцитарного происхождения, как функциональных молекулы, характеризующих активность тромбоцитов у здоровых лиц

При сравнительном анализе уровня Р-селектина с количеством микрочастиц тромбоцитарного происхождения, измеренных методом проточной цитометрии вне индукции 20 мкМоль/л АДФ, было выявлено их соотношение между собой: в контрольной группе наблюдалась положительная и статистически значимая зависимость данных показателей - $R = 0,93$; $p < 0,00001$ (Рис. 1).

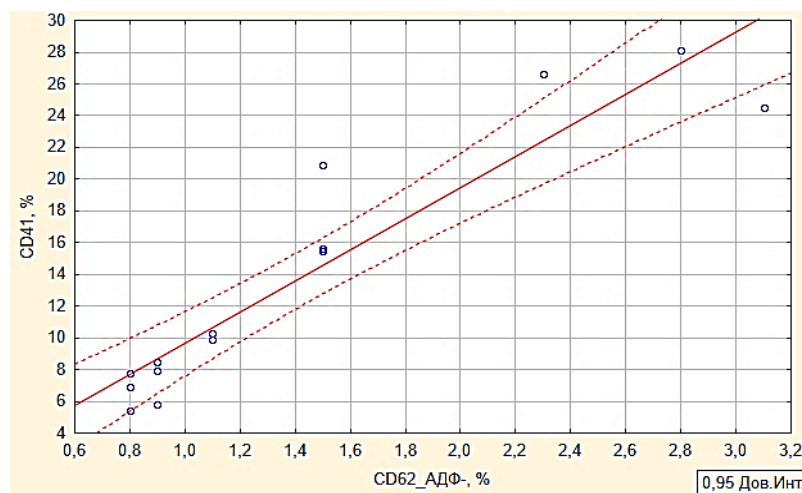


Рисунок 1. Зависимость уровня Р-селектина (CD62+; метод проточной цитометрии) и количества микрочастиц тромбоцитарного происхождения (CD9/41+; метод проточной цитометрии) вне индукции 20 мкМоль/л АДФ в контрольной группе.

Также в контрольной группе при стимуляции тромбоцитов индуктором АДФ в концентрации 20 мкМоль/л отмечались статистически значимое увеличение относительного содержания микрочастиц тромбоцитарного происхождения, одновременно экспонирующих маркеры CD9/CD41 – 40,8% [31,1 – 67,4] против 10,1% [7,8 – 20,9] для аналогичного показателя вне стимуляции, $p=0,001$; и увеличение количества тромбоцитов, экспонирующих Р-селектин – 57,3% [49,8 – 67,2] против 1,1% [0,9 – 1,5] соответственно, $p=0,001$.

Таким образом, выполненная на контрольной группе количественная оценка и сравнительный анализ микрочастиц тромбоцитарного происхождения с экспонированием Р-селектина на поверхности клеток наглядно демонстрируют, что процессы везикуляции адекватно отражают активацию тромбоцитов.

Исследование относительного количества Р-селектина, микрочастиц тромбоцитарного происхождения и параметров агрегации тромбоцитов у здоровых лиц и пациентов с ОЗАНК на фоне приема ДААТ

При сравнительном анализе процентного содержания тромбоцитарных микровезикул с фенотипом CD9+CD41+ было выявлено, что в группе пациентов с тяжелым воспалительным процессом на фоне инфекционного заболевания (Covid-19) их оказалось статистически значимо выше, чем у пациентов с ОЗАНК на фоне приема ДААТ (ДААТ+) – 41,7% [25,6 – 58,4] против 10,4% [4,5 – 14,3] соответственно, $p < 0,001$; а также достоверно выше по сравнению с группой здоровых добровольцев (ДААТ-) – 41,7% [25,6 – 58,4] против 10,1% [7,8 – 20,9] соответственно, $p < 0,001$ (Рис. 2).

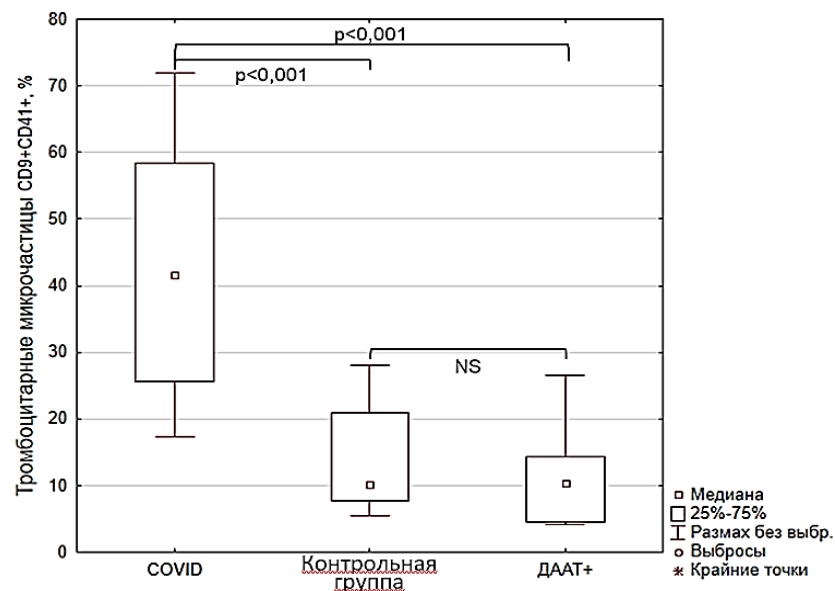


Рисунок 2. Сравнительный анализ микровезикул тромбоцитарного происхождения (CD9+CD41+) без использования индуктора.

Однако обращает на себя внимание тот факт, что количество тромбоцитарных микровезикул с фенотипом CD9+CD41+ у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, получающих эффективную двойную антиагрегантную терапию, статистически значимо не отличалось от аналогичного показателя в контрольной группе здоровых добровольцев – 10,4% [4,5 – 14,3] против 10,1% [7,8 – 20,9] соответственно, $p = 0,55$.

Одновременно у пациентов в основной группе, длительно получающих двойную антиагрегантную терапию, были выполнены оценка уровня Р-селектина методом проточной цитометрии и исследование агрегации тромбоцитов, которые показали

статистически значимое снижение функциональной активности тромбоцитов, что также указывало на эффективность проводимой терапии (Таблица 1).

Таблица 1

Сравнительный анализ функциональной активности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей, длительно принимающих ДААТ (на 10 суток)

Показатель	Ме исходно (Q1-Q3)	Ме на ДААТ (Q1-Q3)	р-уров.
Количество тромбоцитов с фенотипом CD62P+ (позитивных по Р-селектину) в присутствии АДФ 20 мкМоль/л, %	48,3 (41,4-58,1)	10,1 (9,1-11,5)	0,0009
Степень агрегации, %	84,9 (71,5-92,8)	51,3 (34,4-64,3)	0,001

Таким образом, проведенное исследование подтверждает терапевтический эффект применения антиагрегантных препаратов у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей на клеточном и молекулярном уровне и отражает согласованность результатов различных лабораторных тестов при оценке функциональной активности тромбоцитов в разных клинических ситуациях.

При сравнении индивидуальных показателей функциональной активности тромбоцитов с референтными интервалами было выявлено, что суммарно на 5 сутки от начала терапии методом проточной цитометрии положительный фармакологический эффект был достигнут у 42 пациентов, что на 20% выше, чем при использовании метода оптической агрегатометрии (34 пациента).

Суммарные результаты параллельного лабораторного тестирования с использованием двух различных методов для различных схем двойной антиагрегантной терапии представлены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели функциональной активности тромбоцитов, выполненные двумя лабораторными методами для двух схем ДААТ (на 5 сутки от начала терапии)

Название лабораторного теста (метод, индуктор)	Схема «K75+A100» /55 пациентов/		Схема «K150+A100» /10 пациентов/		ИТОГО:
	«+» эффект по РИ	«-» эффект по РИ	«+» эффект по РИ	«-» эффект по РИ	
Оценка количества тромбоцитов, экспонирующих Р-селектин (проточная цитометрия, 20 мкМ АДФ), %	33	22	9	1	«+» эффект 42 «-» эффект 23
Оценка степени агрегации тромбоцитов (оптическая агрегатометрия, 20 мкМ АДФ), %	27	28	7	3	«+» эффект 34 «-» эффект 31

РИ – референтные интервалы

Таким образом, исследование относительного количества Р-селектина, как молекулярного маркера активации клеток, адекватно отражает функциональную активность тромбоцитов и может быть использовано в более ранние сроки (на 5 сутки)

при оценке эффективности двойной антиагрегантной терапии у пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

Оптимизация преаналитического и аналитического этапов определения относительного количества Р-селектина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитометрии

Одной из задач данного диссертационного исследования явилось оценка влияния пре- и аналитических факторов на функциональную активность тромбоцитов методом проточной цитометрии по уровню Р-селектина.

Для оценки влияния центробежной силы на функциональную активность тромбоцитов при получении плазмы нами были проанализированы 74 образца цельной крови параллельно с образцами плазмы богатой тромбоцитами от условно здоровых добровольцев, приготовленные из одной пробирки. Сравнительный анализ показал, что для 6 образцов плазмы богатой тромбоцитами (8%) показатель спонтанной активации тромбоцитов – количество тромбоцитов, экспонирующих Р-селектин (CD62P) вне индукции, был статистически значимо выше по сравнению с таковым для цельной крови – 12,6% [8,3; 13,5] и 0,8% [0,5; 1,7] соответственно, $p=0,00002$ (Рис. 3).

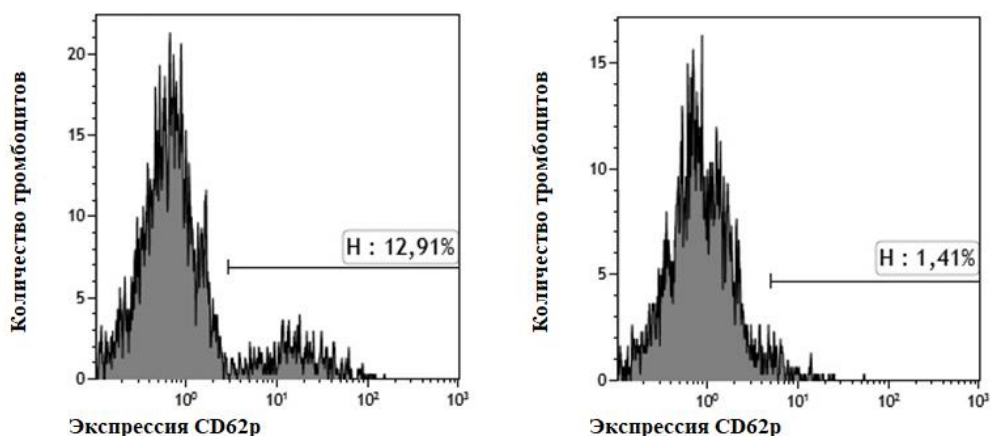


Рисунок 3. Гистограммы богатой тромбоцитами плазмы (слева) – 12,9% позитивных клеток и цельной крови (справа) – 1,4% позитивных клеток.

Таким образом, процесс получения богатой тромбоцитами плазмы может приводить к спонтанной активации тромбоцитов, что в дальнейшем не позволяет использовать часть образцов для оценки функциональной активности тромбоцитов как методом проточной цитометрии, так и методом оптической агрегатометрии. Такие образцы не пригодны для дальнейшего анализа и требуют повторного взятия биологического материала у пациента, что связано с дополнительными манипуляциями и финансовыми затратами.

Для определения оптимального количества тромбоцитов при оценке их функциональной активности методом проточной цитометрии нами была выполнена серия исследований с разной концентрацией тромбоцитов в исследуемом образце при фиксированном объеме используемых антител – аналогично процедуре титрования антител только в качестве титруемого материала использовался образец цельной крови.

Непосредственно перед анализом, цельную кровь с концентрацией тромбоцитов равной 350-450 тыс. клеток/мкл разводили в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 раз однократным фосфатно-солевым буфером (1×PBS) подогретым до температуры 37°C (Таблица 3).

Таблица 3

Исследование зависимости индуцированного уровня Р-селектина от количества тромбоцитов в клиническом образце

Параметр	Исходный образец	Фактор разведения						
		2	4	8	16	32	64	128
Объем образца, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100
Количество тромбоцитов в образце, кл/мкл	380	190	95	48	24	12	6	3
Объем моноклональных антител (CD41+CD62p), мкл	10+10	10+10	10+10	10+10	10+10	10+10	10+10	10+10
Объем АДФ (20 мкмоль/л), мкл	50	50	50	50	50	50	50	50
Средняя интенсивность флуоресценции по CD62p (Р-селектин), MFI	0,18	2,92	4,88	14,58	25,28	31,36	44,00	44,24

В результате данного эксперимента было показано, что одновременно с увеличением степени разведения образцов цельной крови и уменьшением количества тромбоцитов происходило увеличение средней интенсивности флуоресцентного сигнала для уровня Р-селектина (CD62P-PE) на тромбоцитах. При достижении в исследуемых образцах концентрации тромбоцитов в пределах 4-8 тыс. клеток в 1 микролитре данная зависимость исчезала, и уровень флуоресценции выходил на плато, что означало эквивалентное связывание антител с антигенами на поверхности клеток (Рис. 4).

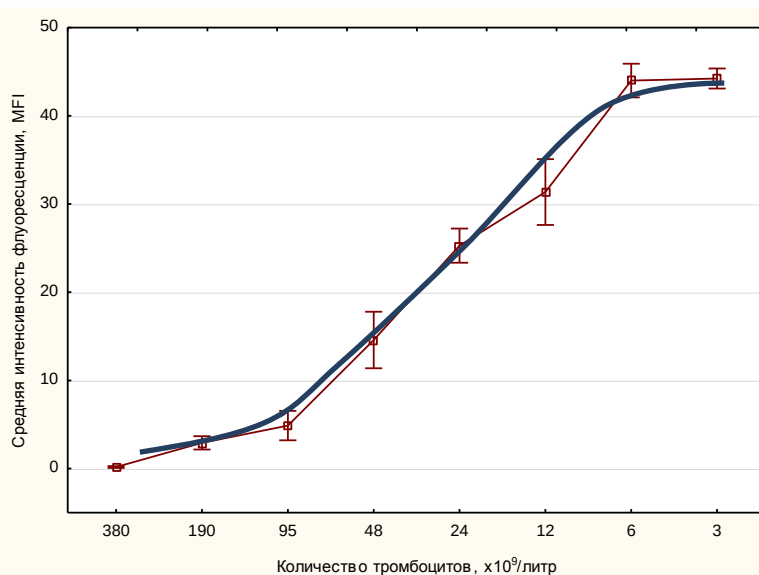


Рисунок 4. График зависимости средней интенсивности флуоресценции (MFI) для Р-селектина (CD62P-PE) от количества клеток, полученный в эксперименте на активированных (20 мкмоль/л АДФ) тромбоцитах, без фиксации. Квадрат – средняя интенсивность флуоресценции, отрезок – 95% ДИ.

Таким образом, оптимальным для оценки уровня Р-селектина на поверхности тромбоцитов, является разведение образца цельной крови в 50 раз при изначальном уровне тромбоцитов – 200-400 тыс. клеток/мкл, то есть до оптимального уровня в 4-8 тыс.

клеток/мкл. При исходно низком или высоком количестве тромбоцитов в исследуемом образце фактор разведения должен быть соответственно уменьшен или увеличен для достижения необходимой концентрации тромбоцитов и эквивалентного связывания антител с поверхностными антигенами.

Поскольку количество Р-селектина на поверхности тромбоцита изначально меньше, чем его линейных CD-рецепторов, а уровень Р-селектина будет зависеть от степени активации тромбоцита, то для обнаружения столь редких молекул возникает необходимость в использовании относительно более ярких флуорохромов, чаще всего таких, как PE (фикоэритрин).

Согласно действующим рекомендациям Европейской рабочей группы по клиническому клеточному анализу (ESCCA) для идентификации популяции тромбоцитов проводят комбинированное использование специфичных для тромбоцитов антигенов (например, CD41 или CD61) и характеристик светорассеяния для определения четких границ, отличающих тромбоциты от других клеток крови и дебриса [Schmitz G., 1998].

В итоге, правильно подобранные условия цитометрического анализа позволяют комбинировать морфологические и фенотипические характеристики тромбоцитов, что способствует более специфичной и точной идентификации региона тромбоцитов.

С этой целью мы разработали протокол, который позволил при использовании логических ограничений и морфологических параметров выделять четкую популяцию тромбоцитов для дальнейшего анализа. Среди всех данных собранных цитометром тромбоциты отличали по небольшим размерам, низкой гранулярности и экспонированию линейно-ассоциированного тромбоцитарного маркера CD61/41-FITC, который детектировали на канале FL1 (Рис. 5).

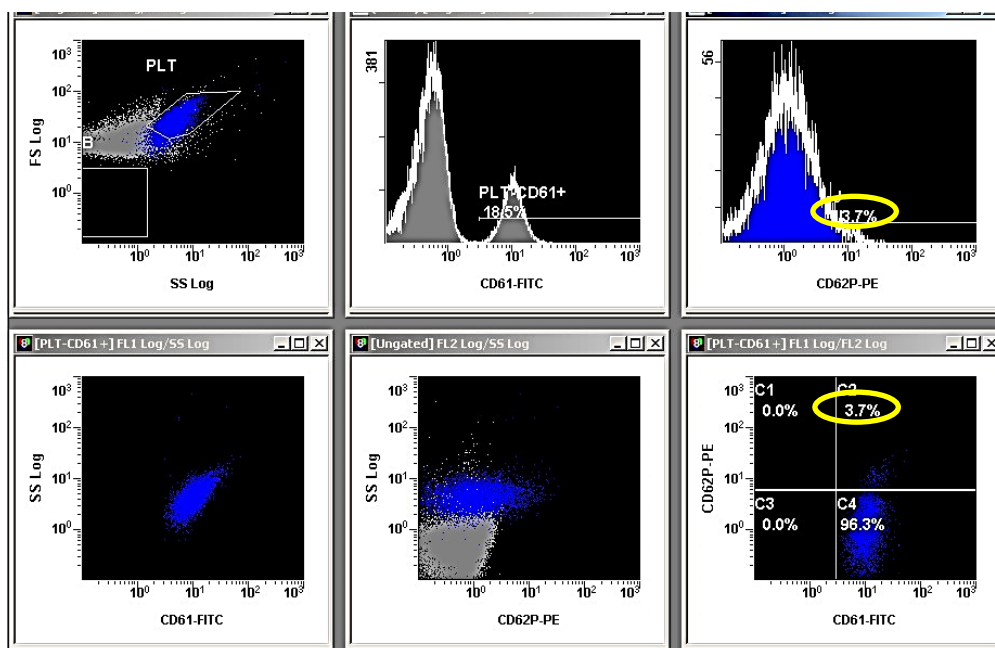


Рисунок 5. Алгоритм выбора зоны анализа тромбоцитов при использовании логических ограничений по CD61/41 и морфологическим параметрам с последующей оценкой уровня Р-селектина

Дальнейший уровень Р-селектина на поверхности тромбоцитов измеряли по интенсивности флуоресценции CD62P-PE на канале FL2 и численно оценивали, как процент клеток с фенотипом CD61/41+CD62P+ в соответствующем регионе на двухпараметрическом точечном графике или однопараметрической гистограмме.

Для дополнительной стандартизации и автоматизации метода произвели настройку протокола таким образом, чтобы тромбоциты в каждом анализируемом образце подвергались фиксированному и достаточному по количеству клеток (не менее 20 000) подсчету, что улучшило воспроизводимость полученного результата и снизило случайную погрешность в 2 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что при оценке функциональной активности тромбоцитов необходимо стандартизировать определение Р-селектина методом проточной цитометрии как на преаналитическом, так и аналитическом этапах.

Определение референтных интервалов относительного количества Р-селектина на поверхности тромбоцитов, измеренного методом проточной цитометрии

Для оценки эффективности использования антиагрегантных препаратов, а также для выявления пациентов с некоторыми наследственными тромбоцитопатиями важно интерпретировать отклонения в показателях функциональной активности тромбоцитов по отношению к референтными интервалам. Это поставило перед нами задачу впервые определить референтные интервалы для уровня Р-селектина на поверхности тромбоцитов в разных возрастных и гендерных группах на выборке здоровой популяции.

При статистической обработке данных и по результатам одномерного двухфакторного дисперсионного анализа для уровня Р-селектина на поверхности тромбоцитов вне индукции было выявлено, что у женщин репродуктивного возраста наблюдается более высокое содержание относительного количества тромбоцитов, позитивных по CD62 (Р-селектину), по сравнению с аналогичным показателем у мужчин – 0,70% [0,63; 1,42] и 0,23% [0,10; 0,54] соответственно, $p=0,01$.

В более старшей возрастной группе между мужчинами и женщинами в постменопаузальном периоде, который согласно клинико-гормональной характеристике этапов старения репродуктивной системы (STRAW+10) начинается с 55 лет [Мирзаев К.Б., 2013], показатель «фоновой» активации тромбоцитов, вне индукции, выравнивается и не достигает статистической значимости. Однако, в сравнении с женщинами более молодого, репродуктивного возраста, различия в данных показателях сохраняются на статистически достоверном уровне.

Экспонирование Р-селектина на поверхности тромбоцитов в присутствии высоких доз аденозиндифосфорной кислоты также оценивалось по относительному количеству тромбоцитов, позитивных по CD62P (Р-селектину) и не было статистически значимо различимо у лиц контрольной группы в зависимости от пола и возраста.

В связи с этим каждый полученный результат по уровню Р-селектина на поверхности тромбоцитов вне активации должен интерпретироваться с учетом гендерной принадлежности обследуемых лиц (Таблица 4).

Таблица 4

Референтные интервалы для уровня Р-селектина на поверхности тромбоцитов при исследовании функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии

	Референтные интервалы (2.5%-97.5%)	
	% CD62+ Тромбоцитов вне активации	% CD62+ Тромбоцитов после активации АДФ (20 мкмоль/л)
Вся группа (N=120)	0,07 - 6,64	11,44 - 78,30
Мужчины; женщины старше 55 лет (N=85)	0,07 - 4,00	11,44 - 74,40
Женщины репродуктивного возраста (N=35)	0,10 - 6,64	13,88 - 78,30

Таким образом, установленные референтные интервалы для уровня Р-селектина на поверхности тромбоцитов вне активации могут быть использованы для выявления преаналитических ошибок, приводящих к спонтанной активации тромбоцитов, а при индукции активации – для диагностики некоторых форм тромбоцитопатий и оценки эффективности терапии антиагрегантными препаратами.

Измерение остаточной реактивности тромбоцитов и определение критериев эффективности двойной антиагрегантной терапии у пациентов с ОЗАНК при использовании двух методов: оптической агрегатометрии и проточной цитометрии

Для оценки клинической информативности теста функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии был проведен сравнительный анализ результатов, выполненных методом оптической агрегатометрии. В качестве модели «золотого стандарта» при сравнении двух аналитических тестов нами были использованы результаты лабораторного метода на основе оптической трансмиссионной агрегатометрии с использованием анализатора VerifyNow® (Accumetrics, USA). Также, для построения четырехпольной таблицы, проводился проспективный анализ клинических исходов по конечной точке (повторный тромбоз артерий или стента) у пациентов с ОЗАНК, принимающих двойную антиагрегантную терапию (Таблица 5).

Таблица 5

Показатели клинической информативности лабораторных тестов для определения функциональной активности тромбоцитов у пациентов с атеросклерозом сосудов нижних конечностей, принимающих ДААТ

Название лабораторного теста (метод, индуктор)	Чувствительность (Se), %	Специфичность (Sp), %	Диагностическая эффективность (De), %
Оценка количества тромбоцитов, экспонирующих Р-селектин (проточная цитометрия, 20 мкМ АДФ), %	97,8	95,0	96,9
Оценка степени агрегации тромбоцитов (оптическая агрегатометрия, 20 мкМ АДФ), %	82,2	85,0	83,1

При сравнении ROC-кривых для двух лабораторных методов, используемых при оценке эффективности ДААТ наглядно видно, что обе кривые удовлетворяют требованиям информативности: обе ROC-кривые стремятся в левый верхний угол графика, имеют достаточно большую площадь под кривой, высокий индекс Юдена и статистически значимо отличаются от диагональной линии (Рис. 6).

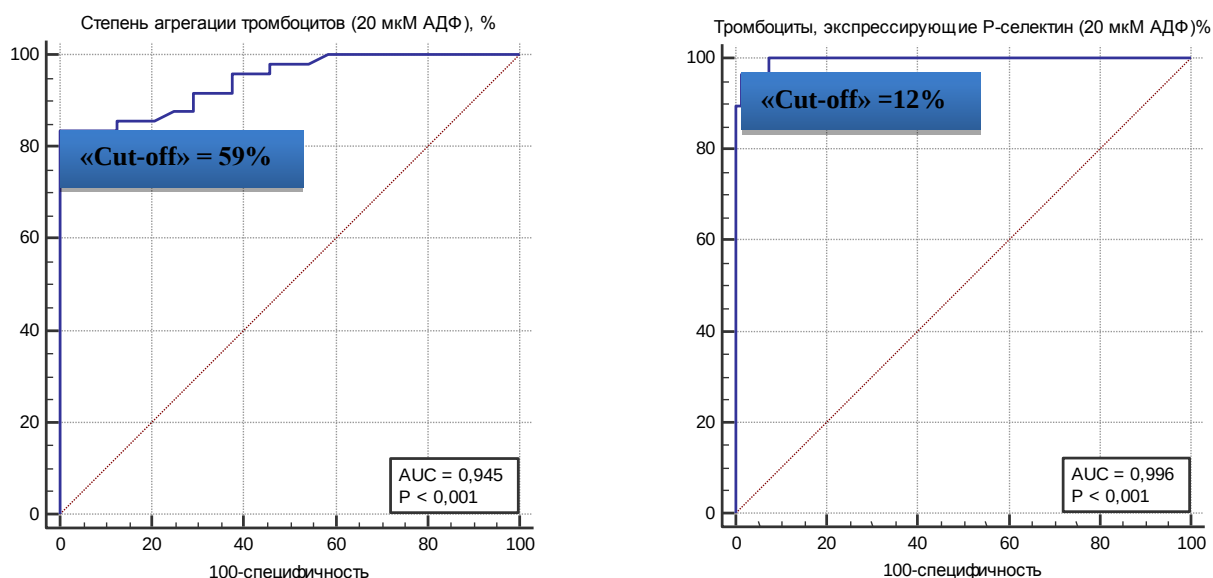


Рисунок 6. Графическое изображение ROC-кривой для оптической агрегатометрии (слева) и проточной цитометрии (справа).

Однако метод проточной цитометрии показал наилучшую клиническую информативность: чувствительность метода составила 97,8%, специфичность – 95,0%, диагностическая эффективность – 96,9%. При этом показателем положительного эффекта от двойной антиагрегантной терапии будет снижение относительного количества тромбоцитов, позитивных по Р-селектину, менее 12,0%.

Клинико-экономический анализ использования метода проточной цитометрии и оптической агрегатометрии в оценке остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с ОЗАНК на фоне двойной антиагрегантной терапией

При проведении клинико-экономического анализа в качестве критерия эффективности медицинского вмешательства из прямых клинических эффектов нами был выбран лабораторный показатель – диагностическая эффективность лабораторного теста.

Диагностическая эффективность – доля правильных результатов теста (т.е. сумма истинно положительных и истинно отрицательных результатов) среди всех обследованных пациентов. Для метода проточной цитометрии данный показатель составил 96,9%. Диагностическая эффективность для метода оптической агрегатометрии оказалась равной 83,1%.

После выбора критерия эффективности, вторым важнейшим элементом клинико-экономического анализа является тщательный учет и оценка финансовых затрат. При

клинико-экономическом анализе необходимо стремиться оценивать все возможные затраты: прямые, косвенные и неосязаемые.

Прямые затраты на выполнение одного исследования функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии составили в 2019 году 1540,00 рублей, а для оптической агрегатометрии – 900,00 рублей.

При анализе структуры распределения пациентов относительно трудоспособного возраста было установлено, что практически половина (45%) среди госпитализированных пациентов с ОЗАНК приходится на трудоспособный возраст.

Учитывая высокую долю пациентов трудоспособного возраста нами были определены не прямые затраты, к которым относятся выплаты по листам нетрудоспособности. Для работающего населения размер пособия по временной нетрудоспособности в 2019 году составил 2150,68 рублей в день. Средняя продолжительность пребывания пациентов в отделении сердечно-сосудистой хирургии за 2019 год составила 16 койко-дней.

При исследовании функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии оценить положительный эффект от регулярного применения антиагрегантных препаратов по нашим исследованиям оказалось возможным на 5 сутки, а при использовании метода оптической агрегатометрии не ранее 10 дня от начала терапии. Это позволило сократить продолжительность пребывания пациента на стационарном лечении и, как следствие, привело к снижению не прямых затрат.

Таким образом, при анализе только прямых затрат разработанный метод оценки функциональной активности тромбоцитов у пациентов с ОЗАНК на фоне приема ДААТ с использованием проточного цитометра оказался несколько дороже, чем метод оптической агрегатометрии. Однако если провести полноценный клинико-экономический анализ и учесть в расчетах сокращение срока госпитализации и не прямых затрат, то данный метод оказался менее затратным и более эффективным (Таблица 6).

Таблица 6

Показатели эффективности, прямых и не прямых затрат при выполнении функциональной активности тромбоцитов методами проточной цитометрии и оптической агрегатометрии

Затраты и эффективность	Проточная цитометрия	Оптическая агрегатометрия
Прямые затраты (стоимость исследования и трудозатрат персонала). (По данным за 2019 г.)	1 540,00 Р	900,00 Р
Средняя продолжительность временной нетрудоспособности с учетом подбора эффективной ДААТ	21 день	26 дней
Не прямые затраты (выплаты по листам нетрудоспособности). Размер денежного пособия - 2150,68 рублей в день. (По данным за 2019 г.)	45 164,28 Р (21 день×2 150,68 Р)	55 917,68 Р (26 день×2 150,68 Р)
ИТОГО:	46 704,28 Р	56 817,68 Р
Эффективность (точность лабораторного метода), %	96,9	83,1

Последним этапом клинико-экономического анализа является расчет и анализ соответственно клинико-экономических показателей. На сегодняшний день в мировой практике для клинико-экономического анализа наиболее широко применяется метод «затраты-эффективность», который позволяет соотнести расходы и клиническую эффективность медицинских вмешательств. Чем меньше величина показателя «затраты-эффективность», тем менее значимых затрат требует достижение эффекта и тем более целесообразным можно считать применение медицинской технологии.

В случае, когда одна технология эффективнее другой и в то же время является более затратной необходимо дополнительно рассчитать коэффициент приращения эффективности затрат. Показатель «приращения эффективности затрат» (ICER) показывает отношение дополнительных затрат к дополнительному эффекту при использовании более дорогой, но более эффективной технологии по сравнению с более дешевой и менее эффективной.

При определении соотношения «затраты-эффективность» для группы пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей данный показатель составил 481,98 рублей при использовании метода проточной цитометрии и 683,73 рублей при исследовании функциональной активности тромбоцитов с помощью оптической агрегатометрии. При расчете показателя, характеризующего добавочные затраты для достижения одного дополнительного процента эффективности – выявление одного дополнительного процента лиц с истинными результатами лабораторного исследования, составил 14,62 рублей.

Таким образом, результаты клинико-экономического анализа показали, что применение метода проточной цитометрии к оценке функциональной активности тромбоцитов на фоне приема ДААТ у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей дает значимые экономические преимущества при одновременном повышении качества оказания медицинской помощи.

ВЫВОДЫ

1. У здоровых лиц относительное количество Р-селектина до активации индуктором составило 0,8% [0,5-1,7], после активации 36,1% [26,6-59,2]. При этом у пациентов с ОЗАНК до терапии относительное количество Р-селектина после индукции составило 48,3% [41,4-58,1], а через 5 дней ДААТ данный показатель оказался достоверно снижен по сравнению с исходным уровнем – 10,1% [9,1-11,5]. Снижение относительного количества тромбоцитов, позитивных по Р-селектину, после индукции до 12,0% и менее является показателем эффективности двойной антиагрегантной терапии.

2. Количество тромбоцитарных микровезикул у пациентов с ОЗАНК на фоне ДААТ, измеренное методом проточной цитометрии, составило 10,4% [4,5-14,3], что оказалось сопоставимо с количеством тромбоцитарных микровезикул у условно здоровых добровольцев – 10,1% [7,8-20,9], и достоверно меньше, чем у больных с активацией

системы гемостаза вследствие тяжелого инфекционного заболевания – 41,7% [25,6-58,4] ($p<0,05$). Снижение количества тромбоцитарных микрочастиц у пациентов с ОЗАНК на фоне приема ДААТ подтверждает терапевтический эффект от применения антиагрегантных препаратов.

3. Разведение образца цельной крови в 50 раз наиболее оптимально для исследования Р-селектина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитометрии. Стандартизация процедуры определения Р-селектина тромбоцитов методом проточной цитометрии позволяет использовать его для оценки функциональной активности тромбоцитов с приемлемой вариабельностью внутри анализа – 13%.

4. Референтные интервалы для относительного количества Р-селектина на поверхности тромбоцитов, измеренного методом проточной цитометрии, составили: для женщин репродуктивного возраста – 0,10-6,64% и 13,88-78,30% до и после индукции АДФ, соответственно; для всех мужчин и женщин старше 55 лет – 0,07-4,00% и 11,40-74,40% до и после индукции АДФ, соответственно.

5. Метод проточной цитометрии показал наилучшие аналитические характеристики (чувствительность – 97,8%, специфичность – 95,0%, точность – 96,9%) по сравнению со стандартной агрегатометрией (82,2%; 85,0%; 83,1% соответственно). У пациентов, принимающих антиагрегантные препараты, в течение 5 дней снижение функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии было выявлено у 65% больных, тогда как методом стандартной агрегатометрии – у 52% больных.

6. Адекватно подобранная антиагрегантная терапия и лабораторный контроль эффективности антиагрегантной терапии с помощью проточной цитометрии приводит к сокращению пребывания пациента на стационарном лечении в среднем на 5 дней, а также профилактике повторных тромботических событий на 12,5%, что уменьшает финансовые затраты не только для медицинского учреждения, но и для системы здравоохранения в целом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Проведенное исследование и его результаты позволяют сформулировать ряд практических рекомендаций сосудистым хирургам и врачам клинической лабораторной диагностики:

1. С целью оценки эффективности антиагрегантной терапии у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей рекомендуется проводить исследование функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии на 5 сутки после начала терапии с оценкой экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов. Эффективность антиагрегантной терапии оценивать по показателям относительного количества тромбоцитов, позитивных по Р-селектину и расценивать, как эффективную, если данный показатель не превышает 12% после индукции 20 мкМ АДФ.

2. При исследовании функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии рекомендуется строго соблюдать правила пре- и аналитического этапов во избежание неверной трактовки результатов. Важными являются условия забора крови, хранения и транспортировки в лабораторию; разведение образца перед

окрашиванием моноклональными антителами; отсутствие этапа фиксации нативного образца; проведение анализа на проточном цитометре в первые 20-30 минут после инкубации с моноклональными антителами.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение оценки функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии является перспективным научным направлением. В данной связи также очевидна необходимость проведения клинической валидации представленных в настоящей работе результатов для пациентов, страдающих другими нозологическими формами поражения артерий нижних конечностей, а также артерий других анатомических локализаций с последующей оценкой эффективности терапии данных заболеваний.

Другим направлением дальнейшего научного поиска может явиться оценка стабильности тромбоцитарных микрочастиц, выделенных из венозной крови, при воздействии таких преаналитических факторов, как длительное хранение и транспортировка, что может быть востребовано в случае аутсорсинга биологического материала при назначении теста на функциональную активность тромбоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки) и 1.5.4. Биохимия.

1. Ермаков А.И. / Гендерные различия в функциональной активности тромбоцитов по данным проточной цитометрии / О.В. Сироткина, А.И. Ермаков, Л.Б. Гайковая, Т.В. Вавилова // Тромбоз, гемостаз и реология. 2016. № S3 (67). С. 387-388.

2. Ермаков А.И. / Определение референтных интервалов экспрессии Р-селектина на тромбоцитах методом проточной цитометрии / Л.Б. Гайковая, Т.В. Вавилова, О.В. Сироткина // Профилактическая и клиническая медицина. 2020. № 4 (77). С. 87-92.

3. Ермаков А.И. / Исследование уровня тромбоцитарных микрочастиц и экспрессии Р-селектина у пациентов с заболеваниями периферических артерий нижних конечностей / Л.Б. Гайковая, О.В. Сироткина, Т.В. Вавилова // Медицинский академический журнал. 2023. Т. 23. № 1. С. 107-114.

Научные издания, статьи, тезисы докладов и статей

4. Ермаков А.И. / Клинико-экономический анализ в оценке технологий здравоохранения в лечебно-профилактическом учреждении / Л.Б. Гайковая, А.Т. Бурбелло, А.И. Ермаков, А.С. Федоренко, Т.В. Вавилова, М.В. Комок // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2014. Т. 7. № 1. С. 8-12.

5. Сироткина О.В., Черныш Н.Ю., Гайковая Л.Б., Топанова А.А., Мельничникова О.С., Ермаков А.И., Замятина К.Н., Кищенко В.В., Вавилова Т.В. Оценка системы гемостаза лабораторными методами при тромботических состояниях. В сборнике: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск, 2018. С. 90-126.

6. Ермаков А.И. / Микрочастицы клеток крови у больных Covid-19 как маркер активации системы гемостаза / О.В. Сироткина, Л.Б. Гайковая, Д.А. Кудлай, Т.В. Вавилова // Тромбоз, гемостаз и реология. 2020. № 4. С. 35-40.

7. Вавилова Т.В., Сироткина О.В., Ермаков А.И., Жиленкова Ю.И., Гайковая Л.Б. Молекулярные механизмы активации гемостаза при covid-19 на госпитальном этапе. Лабораторная служба. 2021. Т. 10. № 4. С. 25-29.

8. Ермаков А.И. / Динамика образования микровезикул клеток крови у больных Covid-19 на разных стадиях заболевания / О.В. Сироткина, Ю.И. Жиленкова, Е.А. Золотова, Д.А. Кудлай, Т.В. Вавилова, Л.Б. Гайковая // Профилактическая и клиническая медицина. 2021. № 4 (81). С. 68-74.