

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Ермакова Алексея Игоревича на тему «Р-селектин и микровезикулы тромбоцитарного происхождения в лабораторной оценке функциональной активности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей», представленную к защите в диссертационный совет 04.1.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8.

Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Ермакова Алексея Игоревича посвящена изучению новых методов для оценки функциональной активности тромбоцитов и контроля антиагрегантной терапии. Стандартно для анализа активности тромбоцитов используют различные варианты измерения агрегации тромбоцитов. Однако эти тесты обладают рядом недостатков. Для проведения классической световой агрегатометрии «по Борну» требуется достаточно большие объемы крови (около 10 мл), предварительное получение обогащенной тромбоцитами плазмы и участие квалифицированного персонала. Метод не стандартизован и референсные значения могут различаться в разных лабораториях. В системе «Verify Now» проводятся измерения агрегации тромбоцитов друг с другом и с частицами, покрытыми фибриногеном. В отличие от агрегатометрии «по Борну» измерения проводятся в небольших объемах цельной крови, метод автоматизирован и стандартизован, но высокая стоимость картриджей ограничивает его применение в широкой клинической практике. Импедансный метод измерения агрегации достаточно удобен, но его результаты существенно зависят от вариаций концентрации тромбоцитов и других клеток крови. В связи с этим внедрение новых методов для оценки функции тромбоцитов и эффектов антиагрегантных препаратов является актуальной клинической и лабораторной задачей. В настоящей работе автором предлагается использовать для этих целей проточную цитометрию. Этот метод позволяет проводить исследования в минимальных объемах и анализировать сигналы, получаемые от отдельных клеток или внеклеточных частиц. Автором рассматриваются два подхода – измерение экспонирования на поверхности тромбоцитов белка мембран альфа-гранул Р-селектина и измерение в плазме крови мембранных везикул, образующихся при активации тромбоцитов. Апробация обоих тестов выполнялась при обследовании больных с облитерирующим заболеванием артерий нижних

конечностей (ОЗАНК), для лечения которых показано применение антиагрегантных препаратов.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Основные результаты были получены автором при использовании для оценки функциональной активности тромбоцитов двух методов. С помощью проточной цитометрии проводились: (1) измерения экспонирования Р-селектина на поверхности тромбоцитов и (2) измерения содержания в плазме крови мембранных везикул тромбоцитов. Апробацию возможностей клинического применения обоих тестов проводили в группе больных ОЗАНК, получающих двойную антиагрегантную терапию, аспирин в сочетании с клопидогрелом. Группу сравнения составили здоровые добровольцы, а при изучении тромбоцитарных везикул еще и пациенты с COVID-19. Результаты, полученные с помощью разрабатываемых методов, сравнивали с результатами измерения агрегации тромбоцитов с помощью световой агрегатометрии или системы «Verify Now».

В работе проведен подробнейший анализ метода измерения Р-селектина на поверхности тромбоцитов. Подобраны условия подготовки проб, «гейтирования» фракции тромбоцитов в цельной крови с использованием специфического маркера тромбоцитов CD41, оптимальные концентрации антител и разведения крови. Были выверены референсные значения экспонирования Р-селектина в различных группах здоровых добровольцев (мужчины и женщины разных возрастных групп), как в контрольных образцах тромбоцитов без добавления индукторов, так и при активации тромбоцитов 20 мкМ АДФ, индуктором стандартно используемым для оценки эффективности антиагрегантной терапии (в первую очередь клопидогрела и других антагонистов P2Y₁₂ рецепторов АДФ). Сравнение этого метода со световой агрегатометрией показало его более высокую чувствительность к действию антиагрегантных препаратов в группе ОЗАНК. Показатель экспонирования Р-селектина (процент Р-селектин положительных тромбоцитов) при активации тромбоцитов 20 мкМ АДФ на 5 день от начала двойной антиагрегантной терапии был достоверно снижен, в отличие от показателя агрегации тромбоцитов (максимальный уровень светопропускания), снижение которого не достигало достоверного уровня, хотя к 10 дню от начала терапии оба показателя были значимо снижены. Таким образом было установлено, что измерение экспонирования Р-селектина позволяет регистрировать эффекты терапии на более ранней стадии, чем измерение агрегации. Принципиально важный результат был получен при сравнительной оценке экспонирования Р-селектина и агрегации тромбоцитов, как предикторов неблагоприятных исходов и соответственно неэффективности антиагрегантной терапии у больных с ОЗАНК. Проведенный ROC анализ показал, что измерение Р-селектина с помощью проточной

цитометрии позволяет более эффективно выявлять пациентов с риском неблагоприятных исходов, чем измерение агрегации тромбоцитов с помощью оптической агрегатометрии (более высокая чувствительность и специфичность).

Еще один метод, протестированный автором – измерение с помощью проточной цитометрии количества тромбоцитарных мембранных везикул в плазме крови. В качестве таких везикул были выбраны экзосомы, которые выявляли с помощью маркера CD9, а их тромбоцитарное происхождение верифицировали с помощью маркера CD41. В предварительных экспериментах автором была продемонстрирована взаимосвязь образования тромбоцитарных экзосом с уровнем активности тромбоцитов. Было установлено, что количество CD9+/CD41+ везикул в крови здоровых добровольцев коррелирует с количеством Р-селектин положительных тромбоцитов, и, что активация тромбоцитов АДФ сопровождается увеличением количества таких везикул в супернатанте. Однако при сравнении уровня CD9+/CD41+ везикул у пациентов с ОЗАНК, получающих антиагрегантную терапию, и здоровых добровольцев не было получено достоверных различий. Таким образом полученные результаты показали, что, хотя активация тромбоцитов и влияет на образование экзосом, их измерение является недостаточно чувствительным методом для оценки эффектов антиагрегантных препаратов по сравнению с измерением экспонирования Р-селектина и агрегации тромбоцитов. В то же время, автором было установлено, что количество CD9+/CD41+ было существенно повышено у больных с COVID-19, еще одной группой пациентов проанализированной в этой части работы. Эти данные указывают на высокую степень активации тромбоцитов при развитии COVID-19.

Совокупность результатов, полученных автором при измерении функциональной активности тромбоцитов у пациентов и здоровых добровольцев, с помощью новых методических подходов с использованием проточной цитометрии, безусловно являются достаточными для диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Проведенная в работе апробация новых лабораторных тестов - измерение экспонирования Р-селектина и тромбоцитарных экзосом, и выполненные с их помощью исследования перераспределения Р-селектина и образования экзосом при активации тромбоцитов и действии антиагрегантных препаратов соответствуют заявленным специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.4. Биохимия.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Автором был предложен логичный дизайн исследования, соответствующим поставленным в работе задачам: тщательный анализ новых методов оценки

функциональной активности тромбоцитов, связанных с применением проточной цитометрии, и их сравнение со стандартными агрегатометрическими тестами. Во всех разделах исследования автором применялись корректные методы статистической обработки и было обследовано достаточное количество пациентов и здоровых добровольцев для получения статистически достоверных результатов.

Научная новизна полученных результатов

Автором впервые были стандартизованы преаналитический и аналитический этапы, а также 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». Также, впервые методом проточной цитометрии исследованы тромбоцитарные микровезикулы у пациентов с ОЗАНК, получающих двойную антиагрегантную терапию.

В работе было впервые продемонстрировано, что: (1) измерение экспонирования Р-селектина с помощью проточной цитометрии является более чувствительным методом для оценки эффектов антиагрегантных препаратов, чем стандартная агрегатометрия, (2) образование тромбоцитарных экзосом, хотя и связано с активацией тромбоцитов, но их измерение в плазме крови менее информативно для оценки эффектов антиагрегантных препаратов по сравнению с измерением экспонирования Р-селектина и агрегации тромбоцитов, (3) содержание в плазме крови тромбоцитарных экзосом резко повышено у больных с COVID-19.

Диссертантом впервые проведен клинико-экономический анализ 2-х технологий по оценке функции тромбоцитов методом проточной цитометрии и агрегатометрии у пациентов с ОЗАНК, принимающих двойную антиагрегантную терапию, показывающий клинико-экономический эффект при использовании проточной цитометрии.

Общая характеристика, структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах, содержит 19 таблиц и 28 рисунков, и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы» (глава 1), «Материалы и методы исследования» (глава 2), «Результаты исследования и их обсуждения» (глава 3), «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Перспективы дальнейшей разработки темы», «Список сокращений» и «Список литературы».

Обзор литературы полностью соответствует тематике работы. Материал, представленный в обзоре, свидетельствует о хорошем знании автором, как физиологии и биохимии тромбоцитов, так и специальных методов, применяемых для их изучения. Отдельные разделы обзора посвящены вопросам антиагрегантной терапии и физиологии и

биохимии мембранных микрочастиц тромбоцитов. Список цитируемой литературы содержит 157 источников и включает основные работы по теме, как отечественных, так и зарубежных авторов. Материалы и методы изложены достаточно подробно, так что большинство методик может быть воспроизведено по представленному описанию. Результаты структурированы по отдельным направлениям, представлены логично и хорошо иллюстрированы. В ходе изложения результатов по каждому направлению, автор, обсуждает их, сравнивая с ранее опубликованными работами. Разделы «Заключение» и «Практические рекомендации» подводит общие итоги диссертационного исследования, а раздел «Перспективы дальнейшей разработки темы» представляет возможности дальнейшего, пост диссертационного развития работы. Выводы и практические рекомендации в целом соответствуют полученным результатам. Диссертация написана хорошим языком и содержит допустимое количество стилистических неточностей и опечаток.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 статей, включая 3 в изданиях из списка ВАК, и 1 учебное пособие. Результаты диссертации неоднократно представлялись на отечественных и международных научных конференциях

Замечания и вопросы

По данной работе имеются замечания, которые носят дискуссионный или формальный характер и не снижают научную ценность и достоверность полученных результатов:

1. Тромбоцитарные микрочастицы несколько раз обозначаются в тексте как «функциональные молекулы», хотя все мембранные частицы, включая изучаемые в работе экзосомы, представляют собой крупные надмолекулярные структуры с набором разнообразных белков, нуклеиновых кислот и других биологически активных молекул.

2. В Таблице 9 не представлены результаты статистической обработки данных и поэтому не ясно отличаются ли достоверно два сравниваемых метода оценки функциональной активности тромбоцитов по представленным в таблице результатам.

3. Разделы 3.3. «Оптимизация преаналитического и аналитического этапов определения относительного количества Р-селектина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитометрии» и 3.4. «Определение референтных интервалов для относительного количества Р-селектина на поверхности тромбоцитов, измеренного методом проточной цитометрии» было бы логично представить не после, а до описания результатов, полученных с помощью этого метода, значительная часть которых присутствует в предшествующих разделах 3.1. и 3.2.

Имеются вопросы дискуссионного характера:

1. На рисунке 22 представлены результаты определения Р-селектина с помощью проточной цитометрии при титровании образцов крови и делается вывод, что нужно использовать очень высокие разведения крови (в 50 раз и выше), чтобы получить насыщение по окраске. Но очевидно, что это связано с добавлением заведомо низких концентраций антител, которых просто не хватает для окраски тромбоцитов при меньших разведениях. Был ли какой-то еще смысл, кроме экономического (сокращение расхода антител) для использования столь высоких разведений крови и столь низких концентраций антител? Не могли ли слишком высокие разведения крови приводит к значимому увеличению времени накопления на проточном цитометре необходимого для статистического анализа количества тромбоцитов, особенно у лиц с умеренным снижением содержания тромбоцитов и тем более со значимой тромбоцитопенией? И не могло ли использование слишком низких концентраций антител приводить к занижению результатов у лиц с умеренно повышенным содержанием тромбоцитов и тем более с тромбоцитозом?

2. Получали ли пациенты с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей по протоколу лечения нагрузочную дозу клопидогрела, что крайне важно для скорости развития эффектов этого препарата?

3. В диссертации не представлено ни одного оригинального рисунка с проточного цитометра по анализу тромбоцитарных везикул с графическим обозначением «гейтирования» везикул по размеру, областей положительными по CD9 и CD41 и т.д. Этот метод является одним из основных и такие рисунки необходимы для оценки его информативности и корректности. От чего выражали относительное содержание тромбоцитарных микрочастиц с фенотипом CD9+/CD41+?

Заключение

Диссертация Ермакова Алексея Игоревича на тему «Р-селектин и микровезикулы тромбоцитарного происхождения в лабораторной оценке функциональной активности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой была решена актуальная научная и практическая, клинически ориентированная задача по апробации новых методов измерения функциональной активности тромбоцитов и эффектов антиагрегантных препаратов с использованием проточной цитометрии: измерение экспонирования Р-селектина на поверхности тромбоцитов и определение тромбоцитарных мембранных везикул в плазме крови, что позволит в дальнейшем персонафицировать подход к антиагрегантной терапии и реализовать принципы персонализированной

медицины, что отвечает стратегическим задачам развития здравоохранения Российской Федерации и имеет существенное значение для медицинской отрасли.

По своей актуальности, новизне, практической и теоретической значимости, методическому уровню и объему выполненных исследований работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (со всеми действующими изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор, Ермаков Алексей Игоревич, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник

Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
профессор



Мазуров Алексей Владимирович

«17» апреля 2026 г.

Адрес: 121552 Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

Контактные телефоны: +7 (916) 6270543 (моб); +7 (495) 4146735 (раб)

Электронный адрес: avmazurov@list.ru

Подпись Мазурова Алексея Владимировича заверяю.

Ученый секретарь Института экспериментальной кардиологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
д.м.н.



Плеханова Ольга Сергеевна