

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГБОУ ВО СамГМУ

Минздрава России,

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН, заслуженный

деятель науки Российской Федерации



А.В. Колсанов

2026 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы

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», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы выполненной работы

Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения Российской Федерации и большинства стран мира. Согласно приведенным в диссертации данным, ежегодные затраты на борьбу с сердечно-сосудистыми заболеваниями в России составляют около 1 триллиона рублей, что эквивалентно 3% ВВП. При этом летальность пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей (ОЗАНК) в 2–4 раза выше, чем в соответствующей популяции по возрасту и полу, и достигает 60% за 5–10 лет наблюдения. Число ампутаций нижних конечностей по жизненным показаниям у больных ОЗАНК

старше 75 лет составляет 78,5%, а годовая летальность после радикальной ампутации - 48,3%.

Ключевым патогенетическим механизмом прогрессирования ОЗАНК является атеротромбоз, в формировании которого центральная роль принадлежит тромбоцитам. Именно поэтому антиагрегантная терапия, в частности, двойная антиагрегантная терапия (ДААТ) составляет основу патогенетического лечения этой категории пациентов. Однако, как убедительно показывает автор в обзоре литературы, от 25% до 50% пациентов, принимающих клопидогрел, демонстрируют феномен высокой остаточной реактивности тромбоцитов (ВОРТ), что ассоциируется с повышенным риском тромбоза стента, инфаркта миокарда и смерти. С другой стороны, интенсификация терапии увеличивает риск геморрагических осложнений.

В связи с этим возникает острая необходимость в надежных, воспроизводимых и стандартизованных лабораторных методах оценки функциональной активности тромбоцитов, позволяющих индивидуализировать антиагрегантную терапию и удерживать пациента в «терапевтическом окне». Традиционно используемые методы - оптическая и трансмиссионная агрегатометрия - имеют ряд существенных недостатков: высокая вариабельность результатов, сложность стандартизации, зависимость от количества тромбоцитов, отсутствие единых подходов к интерпретации.

Альтернативой выступает проточная цитометрия цельной крови, позволяющая оценивать экспрессию активационных маркеров, в первую очередь Р-селектина, и количество тромбоцитарных микровезикул. Однако до настоящего времени отсутствовали стандартизованные протоколы преаналитического и аналитического этапов, референтные интервалы и пороговые значения («cut-off») для оценки эффективности ДААТ именно у пациентов с ОЗАНК.

Таким образом, диссертационная работа Ермакова А.И., направленная на разработку и внедрение в клиническую практику метода проточной цитометрии для оценки функциональной активности тромбоцитов у пациентов с ОЗАНК, принимающих ДААТ, является безусловно актуальной и имеет высокую научно-практическую значимость.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Ермакова А.И. содержит ряд положений, которые следует признать новыми для медицинской науки и практики. Впервые стандартизованы преаналитический и аналитический этапы определения относительного количества Р-селектина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитометрии. В частности, показано, что разведение цельной крови до концентрации тромбоцитов 4-8 тыс. кл/мкл является оптимальным для достижения насыщения антител и максимальной интенсивности флуоресценции. Также установлено, что использование цельной крови, а не богатой тромбоцитами плазмы позволяет избежать артефактной активации тромбоцитов, наблюдаемой у 8% образцов после центрифугирования.

Установлены референтные интервалы для относительного количества Р-селектина на поверхности тромбоцитов в соответствии с Руководством CLSI C28-A3. Важно, что интервалы дифференцированы по полу и возрасту: для женщин репродуктивного возраста и для мужчин и женщин старше 55 лет. Рассчитаны коэффициенты внутри индивидуальной и межиндивидуальной биологической вариации.

Определена клиническая информативность исследования экспрессии Р-селектина с чувствительностью 97,8%, специфичностью - 95,0%, точностью - 96,9%. Установлена точка «cut-off» для оценки эффективности ДААТ – ею является снижение относительного количества CD62P+ тромбоцитов после

индукции АДФ менее 12,0%.

Проведена комплексная лабораторная оценка функциональной активности тромбоцитов у пациентов с ОЗАНК на фоне разных схем ДААТ с демонстрацией того, что метод проточной цитометрии выявляет адекватный фармакологический ответ уже на 5-е сутки у 65% пациентов, тогда как оптическая агрегатометрия - только у 52%. Это доказывает более высокую чувствительность цитометрического метода. Исследованы тромбоцитарные микровезикулы CD9+CD41+ у пациентов с ОЗАНК на фоне ДААТ. Показано, что их количество не отличается от здоровых лиц, но достоверно ниже, чем у пациентов с активацией системы гемостаза, например, при COVID-19. Это подтверждает, что подавление активации тромбоцитов ДААТ сопровождается снижением процессов микровезикуляции.

Проведен клинико-экономический анализ двух технологий проточной цитометрии и оптической агрегатометрии. Показано, что, несмотря на более высокую прямую себестоимость цитометрического исследования, с учетом сокращения сроков госпитализации на 5 дней и снижения выплат по листам нетрудоспособности, показатель «затраты-эффективность» CER для проточной цитометрии оказывается ниже, а показатель приращения эффективности затрат ICER составляет всего 14,62 руб. на 1% прироста точности. Все перечисленные положения являются оригинальными и не были ранее представлены в отечественной и зарубежной литературе.

Достоверность научных результатов, выводов и рекомендаций

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается прежде всего комплексным подходом к решению поставленных задач. Исследование выполнено с использованием современных лабораторных технологий, соответствующих международным стандартам. Проточная цитометрия проведена на сертифицированном приборе Cytomics FC500 с

использованием валидированных моноклональных антител. Агрегатометрия выполнена с соблюдением стандартных протоколов. Контроль качества обеспечен использованием изотипических антител и калибровочных стандартов.

Объем выборки для определения референтных интервалов -120 человек соответствует рекомендациям CLSI (не менее 120 наблюдений для непараметрического метода). Группы сопоставимы по возрасту и полу, что подтверждено статистически. Рассчитанный коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации является приемлемым для биологических тестов. Автором подробно описаны и стандартизованы все этапы анализа крови - от взятия до оформления заключения. Анализ полученных результатов проводился при очень низких и низких значениях ($p < 0,0001$, $p = 0,001$, $p = 0,0009$ и др.). Для основных показателей приведены и доверительные интервалы. Кроме того, полученные автором результаты согласуются с мировыми исследованиями в части распространенности ВОРТ и эффективности ДААТ. В то же время новые данные о референтных интервалах и «cut-off» расширяют существующие представления.

Таким образом, достоверность результатов не вызывает сомнений и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Значимость полученных результатов для научной и практической деятельности

Теоретическая значимость работы заключается прежде всего в углублении знаний о патогенетических механизмах активации тромбоцитов при атеротромбозе, в частности о роли экспрессии Р-селектина как маркера «реакции выброса» а-гранул. Расширены представления о процессах микровезикуляции тромбоцитов: показано, что подавление активации тромбоцитов ДААТ сопровождается снижением образования тромбоцитарных

микровезикул до показателей крови у здоровых лиц. Выявлены половые и возрастные особенности базальной (фоновой) активации тромбоцитов: у женщин репродуктивного возраста уровень CD62P+ вне индукции выше, чем у мужчин и женщин в постменопаузе, что, очевидно, связано с гормональным статусом. Рассчитанные коэффициенты биологической вариации могут быть использованы для оценки достоверности изменений лабораторных показателей при динамическом наблюдении.

Практическая значимость подтверждена внедрением результатов в работу двух крупных медицинских учреждений - больницы Петра Великого ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова и ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Разработанный метод позволяет индивидуализировать антиагрегантную терапию у пациентов с ОЗАНК, сократить длительность стационарного лечения и снизить риск повторных тромботических осложнений. Своевременное выявление ВОРТ и коррекция терапии позволяют предотвратить тромбоз стента, инфаркт миокарда и другие сердечно-сосудистые события. По данным автора, профилактика одного случая острого тромбоза артерий нижних конечностей экономит около 370 000 рублей на диагностику и лечение.

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

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 122 страницах, содержит 19 таблиц и 29 рисунков. Диссертация написана научным языком, логически выстроена, хорошо иллюстрирована. Работа построена по классическому типу и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, главу собственных результатов и их обсуждения, заключение с выводами, практическими рекомендациями, список цитированной литературы.

Обзор литературы написан на высоком научном уровне, охватывает современные представления об ОЗАНК, антиагрегантной терапии, молекулярных механизмах активации тромбоцитов, биологии внеклеточных везикул и методах лабораторной диагностики. Обзор критически осмыслен, содержит анализ существующих на данный момент противоречий и обосновывает необходимость проведения собственного исследования. Цитирование актуальное, использованы как классические работы, так и новейшие публикации.

Глава материалы и методы. Представлен дизайн исследования, дана клиническая характеристика групп обследованных, критерии включения и исключения. Методики проточной цитометрии (определение Р-селектина и микровезикул), оптической и трансмиссионной агрегатометрии, клинического анализа крови изложены с достаточной детализацией для воспроизведения. Статистические методы описаны полно и корректно.

Глава три является центральной и состоит из 6 подглав, каждая из которых соответствует одной из задач исследования, которые последовательно решаются. Результаты обсуждаются в сравнении с данными литературы, что придает работе дополнительную убедительность. Заключение кратко резюмирует основные итоги. Выводы сформулированы четко, лаконично, отражают решение всех поставленных задач. Практические рекомендации адресованы конкретным специалистам и содержат цифровые критерии.

Список литературы включает 157 источников, из которых 127 зарубежных за последние 20 лет, что свидетельствует о хорошей осведомленности автора в современной научной литературе.

Принципиальных недостатков в оформлении и изложении диссертационного исследования не выявлено.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе в рецензируемых научных журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы Ермакова Алексея Игоревича могут быть использованы при ведении пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей для превентивного воздействия на развитие атеротромботических осложнений. Разработанные диссертантом критерии могут быть применены и для оценки эффективности антиагрегантной терапии при атеросклерозе других бассейнов: коронарного и церебрального, а также для диагностики наследственных тромбоцитопатий.

Выводы диссертационной работы открывают широкие перспективы для дальнейших научных исследований в области биохимии и клинической лабораторной диагностики, касающихся разработки клинической информативности исследования экспрессии Р-селектина и исследования тромбоцитарных микровезикул с оценкой их стабильности при воздействии различных преаналитических факторов. Разработанные методические подходы и алгоритмы оценки могут быть использованы сосудистыми хирургами и врачами клинической лабораторной диагностики при исследовании эффективности антиагрегантной терапии.

Разработанная автором методика может быть включена в образовательные программы при подготовке специалистов клинической лабораторной диагностики, что обеспечит подготовку кадров по данному направлению.

Соответствие темы и содержания работы научным специальностям

По объему и новизне полученных автором данных, разработанных теоретических положений диссертационная работа 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» полностью соответствует паспортам заявленных специальностей 3.3.8. — Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.4. - Биохимия.

Замечания по работе

Принципиальных замечаний по дизайну и структуре диссертационного исследования Ермакова Алексея Игоревича нет. В работе имеются единичные стилистические ошибки, которые не влияют на общую оценку научной и практической ценности проведенного исследования.

В порядке дискуссии и для уточнения отдельных аспектов работы хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. При оптимизации преаналитического этапа Вы показали, что центрифугирование для получения богатой тромбоцитами плазмы приводит к ложной активации тромбоцитов у 8% образцов. Однако в клинической практике многие лаборатории продолжают использовать именно БТП для агрегатометрии. Не могли бы вы подробнее пояснить, каковы конкретные критерии отбраковки таких образцов? И рекомендуете ли вы при подозрении на артефактную активацию использовать альтернативные методы?
2. В работе вы установили пороговое значение CD62P+ <12,0% после индукции АДФ как критерий эффективности ДААТ. При этом в контрольной группе нижняя граница референтного интервала для стимулированных тромбоцитов составила 11,44% для мужчин и женщин старше 55 лет и 13,88% для женщин репродуктивного возраста. То есть,

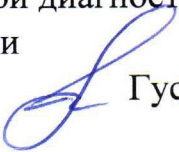
предложенный вами «cut-off» практически совпадает с нижней границей нормы. Не приведет ли это к тому, что пациенты с изначально низкой реактивностью тромбоцитов, например, при некоторых наследственных формах тромбоцитопении, будут ошибочно расценены как «хорошо отвечающие на терапию», тогда как на самом деле они просто имеют низкий базальный уровень активации?

Заключение

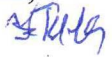
Диссертационная работа Ермакова Алексея Игоревича на тему «Р-селектин и микровезикулы тромбоцитарного происхождения в лабораторной оценке функциональной активности тромбоцитов у пациентов с облитерирующим заболеванием артерий нижних конечностей» по специальностям 3.3.8. - Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.4. - Биохимия, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований решена актуальная задача по повышению эффективности лабораторного контроля антиагрегантной терапии у пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей, что имеет колоссальное значение для биологии и лабораторной медицины поскольку позволяет реализовать принципы персонализированной медицины и раскрыть фундаментальные основы межклеточных коммуникаций в норме и при развитии патологий.

По актуальности, научной новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационное исследование соответствует требованиям, установленным пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018 № 1168 с изменениями от 26.05.2020), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. - Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.4. - Биохимия.

Отзыв о научно-практической значимости диссертационной работы Ермакова Алексея Игоревича заслушан, обсужден и одобрен на заседании кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (протокол от «16» апреля 2026 г. № 6).

Заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России доктор медицинских наук, профессор  Гусякова Оксана Анатольевна

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

З.д.н. РФ, профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор  Гильмиярова Фрида Насыровна

1.5.4. Биохимия

Подписи доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России Гусяковой Оксаны Анатольевны и з.д.н, доктора медицинских наук, профессора, РФ, профессора кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России Гильмияровой Фриды Насыровны

заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России доктор медицинских наук, профессор



 Борисова Ольга Вячеславовна

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, тел. +7 (846) 374-10-01,
info@samsmu.ru