

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента доктора медицинских наук  
Шабалиной Аллы Анатольевны  
на диссертационную работу Муравлева Ивана Андреевича  
«Прокоагулянтные реакции активированных тромбоцитов. Эффекты  
антитромбоцитарных препаратов», представленной на соискание ученой  
степени кандидата медицинских наук по специальности  
1.5.4 – «Биохимия (медицинские науки)».**

### **Актуальность диссертационного исследования.**

Нарушения в системе гемостаза являются одними из основных элементов патогенеза многих сердечно-сосудистых, цереброваскулярных и других заболеваний. Проблемы диагностики нарушений профилактики и лечения протромбогенных состояний обуславливают необходимость исследований молекулярных основ активации системы гемостаза и новых возможностей их коррекции. Тромбоциты являются основным звеном первичного гемостаза и играют важную роль в остановке кровотечения при повреждении сосудов, а также в патологическом тромбообразовании.

Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний остается актуальной проблемой во всем мире. На долю таких заболеваний в России приходится около половины смертельных случаев. В настоящее время антитромботическая и, в первую очередь, антитромбоцитарная терапия является основой лечения и профилактики прогрессирования сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, а также развития тромботических осложнений. Используются антитромбоцитарные препараты с различным механизмом действия, которые назначаются как по отдельности, так и в виде сочетанной терапии в зависимости от тяжести тромботического события. Имеющийся арсенал современных препаратов не всегда обеспечивает полноценную профилактику тромботических состояний. Так, резистентность к антиагрегантным препаратам по данным различных авторов оценивается от 5 до 45%. Эффективность таких препаратов чаще всего исследуют по их способности блокировать агрегацию тромбоцитов, однако их

влияние на коагуляционные свойства тромбоцитов остается малоисследованными, а полученные результаты порой противоречивы.

Недостаточная эффективность применяемых в настоящее время антиагрегантов обуславливает необходимость исследования механизмов активации системы гемостаза при протромботических состояниях и поиск новых потенциальных мишеней воздействия для коррекции этих нарушений. Проблема резистентности к антиагрегантным препаратам является фундаментальной и создает предпосылки для разработки новых тестов и тест-систем персонализированной оценки коагуляционных свойств тромбоцитов и эффективности антитромбоцитарных препаратов, что позволит более точно охарактеризовать протромботический потенциал и подобрать соответствующие профилактические мероприятия.

Работа Муравлева Ивана Андреевича посвящена разработке модификации теста рекальцификации плазмы для оценки прокоагулянтных свойств тромбоцитов, изучению влияния различных агонистов на эти свойства, исследованию способности тромбоцитов ускорять тромбогенные реакции, а также влиянию на эти реакции ряда антитромбоцитарных препаратов (ингибитора ЦОГ, обратимого антагониста P2Y<sub>12</sub> рецептора к аденозиндифосфату, блокатора гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa и активатора аденилатциклазы ПГЕ<sub>1</sub>) на различных моделях.

Все вышесказанное определяет своевременность и актуальность проведенной научно – исследовательской работы, которая имеет важное научно-практическое значение как для лучшего понимания механизмов свертывания крови и роли различных тромбоцитарных рецепторов в этих процессах, так и для создания и введения в рутинную практику новых диагностических лабораторных тестов оценки тромбогенного потенциала крови.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов.**

Автор разработал и апробировал комплекс оригинальных лабораторных методов оценки прокоагулянтных эффектов тромбоцитов на образование фибрина, генерацию тромбина и экспонирование на их поверхности фосфатидилсерина.

В работе Муравлева Ивана Андреевича впервые продемонстрирована способность активированных и не активированных тромбоцитов ускорять коагуляционные реакции, а также влияние на эти реакции антитромбоцитарных препаратов с различным механизмом действия.

В работе показано, что уровень экспонирования фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов определяет их способность ускорять образование тромбина и фибрина. Эти реакции частично ингибируются такими антитромбоцитарными препаратами как тикагрелор, руциромаб и простагландин E1, при отсутствии значимого эффекта ацетилсалициловой кислоты (аспирина). Однако, в исследовании *in vivo* у пациентов с острым коронарным синдромом прием двойной антитромбоцитарной терапии (тикагрелор + ацетилсалициловая кислота) достоверно снижал уровень презентации фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов. Изучение тромбоцитарных микрочастиц показало, что при активации различными индукторами тромбоциты высвобождают разное количество микрочастиц, но качественно эти микрочастицы не различаются.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, результатов и выводов.**

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне современными биохимическими методами с проведением экспериментов в нескольких повторах с использованием высокотехнологичного лабораторного оборудования, рационально и адекватно подобранных реактивов и расходных материалов.

Исходя из актуальности проблемы, диссертантом сформулирована цель работы и четыре задачи, которые соответствуют заявленной специальности.

Содержание автореферата и печатных работ соответствует материалам диссертации. Материал автореферата изложен научным языком, подробно иллюстрирован и оформлен в соответствии с требованиями высшей аттестационной комиссии. Обоснованность научных положений обеспечена тщательной теоретической проработкой проблемы и подкрепляется анализом 128 публикаций, большая часть которых представлена международными изданиями. Достоверность подтверждается тремя публикациями результатов исследования в высокорейтинговых рецензируемых международных научных журналах, шестью докладами на научно-практических конференциях, достаточным объемом материала и адекватной статистической обработкой полученных данных.

Положения, выносимые на защиту, и выводы логичны, аргументированы и соответствуют поставленным задачам. Полученные автором результаты обобщены и отражены в выводах.

Соблюдены все требуемые этические нормы научного исследования с участием человека.

### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

Теоретическая значимость исследования заключается в установленном эффекте ускорения образования фибрина и генерации тромбина активированными тромбоцитами. Наиболее значимый эффект достигается при активации тромбоцитов кальциевым ионофором A23187, наименее значимый - при активации коллагеном и арахидоновой кислотой, минимальный - при активации АДФ. Определено, что пептид, активирующий рецептор тромбина не влияет на прокоагулянтные реакции тромбоцитов, предположительно, вследствие конкуренции с эндогенным тромбином, образующимся в плазме при запуске коагуляционных реакций. Эффекты тромбоцитов на образование фибрина и генерацию тромбина при активации разными агонистами коррелируют друг с другом и определяются уровнем экспонирования фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов.

Разработан и апробирован простой и доступный метод оценки способности тромбоцитов ускорять образование фибрина, основанный на тесте рекальцификации плазмы. Использование в методике иммобилизованных на пластике тромбоцитов позволяет избегать влияния агрегации тромбоцитов на процесс образования фибрина и участия в этом процессе тромбоцитарных микрочастиц.

Установлен эффект ряда антитромбоцитарных препаратов не только на классические функциональные реакции тромбоцитов (агрегацию, адгезию, секрецию из гранул), но и на ингибирование способности тромбоцитов ускорять образование фибрина, генерацию тромбина и экспонирование фосфатидилсерина. Это необходимо учитывать при оценке риска не только тромботических, но и геморрагических осложнений. Данный способ может являться дополнительным методом персонифицированного контроля антитромботической терапии.

Основные результаты исследования, методики по оценке прокоагулянтных свойств тромбоцитов и оценке действия антитромбоцитарных препаратов внедрены в практику лаборатории клеточной адгезии НИИЭК ФГБУ «НМИЦК им. Ак. Е.И. Чазова» и в ФГБУН центре теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.

### **Оценка структуры и содержания работы**

Диссертация Муравлева Ивана Андреевича изложена в традиционном стиле на 105 страницах машинописного текста, работа иллюстрирована 8 таблицами и 18 рисунками. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав и выводов, в которых логично за счет решения поставленных задач складывается комплекс знаний по данной проблеме. Список литературы содержит 128 источников из журналов и учебных изданий, как отечественных, так и зарубежных. Название вытекает из сути самой работы и является ее отражением.

Введение посвящено обоснованию актуальности выполненного исследования, автор излагает цель и ставит задачи, за счет решения которых

цель логично достигается, формирует научную новизну, определяет методологию и методы исследования. Также обоснована практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, характеризуется степень новизны и практического применения полученных новых сведений.

Далее в работе представлен обзор литературы, который содержит систематизированное отражение современных представлений о биологии тромбоцитов и механизмах свертывания крови. Особое внимание уделяется участию тромбоцитов в коагуляционных реакциях, действию антитромбоцитарных препаратов, а также тромбоцитарным микрочастицам, которые также обладают прокоагулянтными свойствами. Обзор состоит из разделов, которые органично составляют единый информационный блок, отличающийся информативностью и логикой изложения материала. Автор анализирует приводимые данные через призму собственного видения проблемы. Обзор литературы аргументирует необходимость проведения данной работы и логично связан с материалом собственных исследований.

Глава вторая посвящена описанию материалов и методов. В ней представлены данные об использовании высокотехнологичных лабораторных методов, позволяющих получить достоверные результаты на достаточном количестве исследуемых образцов. В процессе подготовки работы автор освоил и применил множество методик для оценки свойств тромбоцитов, а также использовал оригинальный подход для изучения эффектов тромбоцитов на финальные стадии коагуляционного каскада – образование тромбина и фибрина. Осаждение тромбоцитов после активации на поверхность пластика позволило избежать нежелательных эффектов неконтролируемой агрегации, а также влияние тромбоцитарных микрочастиц. Прокоагулянтная активность тромбоцитов оценивалась по их способности ускорять образование фибрина и тромбина в плазме, а также исследовалось экспонирование на поверхности тромбоцитов фосфатидилсерина (фосфолипида, который в десятки раз ускоряет работу коагуляционных комплексов).

Применение современных методов статистической обработки и аналитики с использованием пакетов компьютерных программ позволило автору всесторонне оценить и проанализировать полученные результаты.

В третьей главе приведены результаты исследования, где автор четко и конкретно описывает подбор условий проведения и схему модифицированного теста рекальцификации плазмы, а также влияние различных агонистов и антитромбоцитарных препаратов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов.

Все разделы, посвященные результатам собственных наблюдений логично изложены, подробно и доказательно обсуждены, подкрепляются расчетами и статистической обработкой полученных данных. Четвертая глава диссертации представляет собой развернутое обсуждение полученных результатов.

Диссертационную работу завершают 6 выводов, основанных на фактическом материале работы и соответствующих цели и задачам исследования.

Основные результаты отражены в достаточном количестве публикаций: опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в журналах (Q-1 квартиль) и 5 тезисных работ.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

Принципиальные замечания по диссертационной работе отсутствуют. В тексте встречаются стилистические погрешности, однако они не оказывают существенного влияния на восприятие текста в целом и не уменьшают научной и практической значимости проведенного исследования. В порядке обсуждения и организации дискуссии хотелось обсудить следующие вопросы:

1. В Вашей работе в исследованиях «in vitro» было обнаружено отсутствие эффектов ацетилсалициловой кислоты на прокоагулянтные свойства тромбоцитов. Как с Вашей точки зрения это можно объяснить?

В исследованиях «in vivo» был показан положительный эффект сочетанной терапии антагониста P2Y<sub>12</sub> рецепторов АДФ - тикагрелора с ацетилсалициловой кислотой. Проводили ли сравнение эффекта сочетанной терапии на прокоагулянтные реакции тромбоцитов по сравнению с монотерапией тикагрелором и ацетилсалициловой кислотой?

2. Каковы возможности внедрения в разных лабораториях РФ данных методов оценки и какова предположительная стоимость этих исследований?
3. Как предложение: в качестве реализации принципов персонализированной медицины в лабораторной диагностике оформить методические рекомендации по определению прокоагулянтных реакций тромбоцитов и метода оценки эффектов исследованных антитромбоцитарных препаратов.

### **Заключение**

Диссертационная работа Муравлева Ивана Андреевича «Прокоагулянтные реакции активированных тромбоцитов. Эффекты антитромбоцитарных препаратов», выполненная под руководством доктора медицинских наук Мазурова Алексея Владимировича и представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача по исследованию прокоагулянтных реакций активированных тромбоцитов и оценке эффекта антитромбоцитарных препаратов с различным механизмом действия, что имеет существенное значение в лабораторной диагностике, кардиологии и медицине в целом. Сформулированные автором выводы соответствуют поставленным задачам и хорошо обоснованы. Выносимые на защиту положения отражают наиболее значимые результаты исследования. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о

присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г., №426 от 20.03.2021 г.), а ее автор, Муравлев Иван Андреевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия (медицинские науки)».

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник, руководитель  
отдела лабораторной диагностики  
Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Научный центр неврологии»  
Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации

доктор медицинских наук

Шабалина Алла Анатольевна

Подпись Шабалиной А.А. заверяю  
Ученый секретарь Федерального  
государственного бюджетного научного  
учреждения «Научный центр неврологии»  
Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации

кандидат медицинских наук



Сергеев Дмитрий Владимирович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 80

Тел./факс: 8 (495) 374-77-76

e-mail: center@neurology.ru

« 7 » Февраль 2024 г.