«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина

ФМБА России

член-корр. РАН, д.б.н.

Лагарькова М.А.

_____

«21» января 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства» о научно-практической значимости диссертационной работы Мельниковой Евгении Александровны «Разработка микрофлюидной модели тромбоцитарного гемостаза для клинического применения и изучение влияния геометрии активатора на процессы тромбообразования», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2. Биофизика.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Мельниковой Евгении Александровны «Разработка микрофлюидной модели тромбоцитарного гемостаза для клинического применения и изучение влияния геометрии активатора на процессы тромбообразования» посвящена актуальной задаче создания интегрального теста тромбоцитарного гемостаза для применения в клинике и изучению механизмов первичного гемостаза, определяющих формирование тромбов на ориентированных фибриллах коллагена, применяемых в системе.

Тромбоциты — это небольшие, но крайне важные клетки крови, известные прежде всего своей критической ролью в образовании сгустков и заживлении ран. При повреждении кровеносных сосудов тромбоциты способны быстро формировать агрегат в месте повреждения, помогая остановить кровотечение. Это происходит за счет взаимодействия тромбоцитов с компонентами стенок сосудов, в первую очередь – с

фибриллярным коллагеном. Несмотря на десятилетия изучения свертывания крови, роль структуры эндотелиального матрикса в процессе тромбообразования до сих пор полностью не исследована. Также, многие механизмы тромбоцитарного гемостаза до сих пор остаются неизученными. Опубликованные данные подчеркивают, насколько важны активация, адгезия и агрегация тромбоцитов для остановки кровотечения, особенно в условиях высоких сдвиговых напряжений, характерных для поврежденных кровеносных сосудов, в особенности крупных. Однако, несмотря на важность этой функции в норме и патологии, ее оценка *in vitro* существенно затруднена. Существующие методы тестирования часто неэффективны, так как не могут в полной мере воспроизвести сложную среду, в которой функционируют тромбоциты, что приводит к непоследовательным или неполным результатам. Это ограничение затрудняет диагностику и лечение различных нарушений свертываемости крови и тромботических состояний. В связи с этим, разработка интегральных тестов, позволяющих оценить функцию тромбоцитов в условиях физиологического потока, имеет решающее значение для клинического применения.

Активно развивающиеся во всем мире микрофлюидные технологии позволяют создавать искуственные системы, с необходимой точностью воссоздающие сложные условия кровотока в организме человека, что делает их ценным инструментом для изучения гемостаза. Эти микромасштабные системы позволяют воспроизводить физиологические условия, что, в свою очередь, обеспечивает приближение *in vitro* систем к тому, что на самом деле происходит в сосудах пациента. Микрофлюидные модели широко используются в фундаментальных исследованиях, однако они также обладают большим потенциалом для клинического применения. Однако, несмотря на высокий потенциал таких систем, в настоящее время отсутствуют универсальные модели и рекомендации по применению микрофлюидных тестов для клинического исследования гемостаза, что подчеркивает актуальность представленной работы.

Оценка новизны исследования, достоверность и ценность полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформированных в диссертационной работе

Представленная диссертация вносит существенный вклад в изучение тромбоцитарного гемостаза, а также представляет новый интегральный тест на основе микрофлюидных технологий, адаптированный для клинического исследования

функции тромбоцитарного звена. Метод выделяется тем, что позволяет проводить прямой анализ с использованием цельной крови в контролируемых условиях, имитирующих физиологический кровоток. Примечательной особенностью является локализованная зона активации, которая повышает реалистичность и надежность наблюдений за образованием тромбов по сравнению с существующими проточными системами.

Исследование представлет новые результаты, полученные в результате изучения того, как ориентация коллагеновых фибрилл влияет на формирование тромбов при разных скоростях сдвига. Оно подчеркивает критическую роль коллагена III типа при высоких скоростях сдвига, бросая вызов устоявшимся представлениям о механизмах формирования тромбоцитарных агрегатов и открывая новые перспективы в изучении участия внеклеточного матрикса в процессах свертывания крови. Это открытие имеет значение как для фундаментальной науки, так и для клинической диагностики.

Достоверность полученных результатов была обеспечена использованием современных технологий и методов исследования – микрофлюидных технологий, иммунофлуоресцентного анализа и высокоскоростной эпифлуореспроточной микроскопии. Также качество результатов обеспечивалось строгими преаналитическими требованиями и сотрудничеством со специалистами ведущего педиатрического гематологического центра в России – ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Обработка данных производилась с использованием профессионального программного обеспечения, разработанного для научных исследований. Все полученные данные прошли строгий отбор и были проанализированы корректными статистическими методами с высокой достоверностью.

Полученные результаты и сформулированные выводы представляют как фундаментальную, так и прикладную ценность для исследования гемостаза. Результаты, связанные с ролью ориентации и состава коллагеновых волокон в формировании тромбов позволяют по-новому интерпретировать накопленные данные о росте тромбов в проточных камерах при высоких скоростях сдвига, указывают на возможность создания систем тестирования различных аспектов тромбоцитарного гемостаза за счет варьирования параметров активатора и открывают перспективы исследования механизмов остановки кровотечения при проникающих повреждениях крупных сосудов. Практическая значимость значимость заключается в создании интегрального теста для клинического применения, показавшего чувствительность к гемостатическим

нарушениям и их тяжести. Дальнейшее развитие и применение такого теста может позволить не только дигностировать нарушения, но и персонализировать лечение.

Практические рекомендации, предложенные автором, актуальны и соответствуют ведущим мировым стандартам в области исследования тромбоцитарного гемостаза. Положения, выносимые на защиту, отражают представленные в работе результаты и убедительно обоснованы. Список литературы полон и составлен в соответствии с правилами оформления библиографических ссылок.

Личный вклад автора

Анализ литературы был проведен лично автором. Также автором был разработан и отработан протокол исследования, а также спланированы и проведены эксперименты, необходимые для исследования. Также автор самостоятельно обработала и проанализировала экспериментальные данные, сформулировала выводы и практические рекомендации на основании полученных результатов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Для анализа функции тромбоцарного гемостаза предложен тест на основе поскопараллельной проточной камеры с флуоресцентно меченой цельной кровью. На основании полученных результатов предлагается использовать гирудин в качестве антикоагулянта для повышения чувствительности теста, скорость сдвига $1000с^{-1}$ для учета влияния фактора фон Виллебранда и исключения влияния ориентации фибрилл коллагена на высоких скоростях сдвига. Автор указывает на критическую важность времени от взятия крови до постановки эксперимента и стандартизации манипуляций с образцами для получения воспроизводимых результатов. Помимо этого, была показана важность длины трубок, по которым кровь поступает в систему и необходимость минимизации их длины для быстрой стабилизации концентрации клеток над активатором. Важной новаторской особенностью разработанной системы является использование локализованной области с активатором для создания ограниченной зоны активации и контрольной области непосредственно внутри канала. Предлагается применять площадь покрытия как стандартный параметр для характеризации тромбообразования.

На основании результатов о влиянии ориентации фибрилл коллагена на формирование тромбов при высокой скорости сдвига объясняются различия в данных, полученных разными группами исследователей *in vitro* и предлагается разрабатывать и анализировать результаты проточных тестов с учетом большей тромбогенности продольных фибрилл в условиях высоких скоростей сдвига. Результаты анализа роли коллагена III типа в обеспечении адгезии тромбоцитов на высоких скоростях сдвига указывают на возможность применения этого белка в отдельности и в сочетании с коллагеном I типа для достижения более высокой и равномерной адгезии. Также полученные результаты позволяют строить предположения о роли фибрилл III типа и продольной ориентации субэндотелиального коллагена в формировании артериальных тромбов. Автор указывает на перспективность исследования этих особенностей *in vivo*.

Структура, содержание и оценка диссертационной работы

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста и включает в себя ввеение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы (глава 2), результаты (главы 3 и 4), заключение (глава 5), выводы, практические рекомендации, список обозначений и сокращений, а также список литературы, включающий 132 библиографических источника. Работа содержит 24 рисунка.

Диссертация выдержана в академическом стиле и является законченной научно-квалификационной работой. Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, положения, выносимые на защиту, научная новизна, достоверность и обоснованность результатов.

В обзоре литературы подробно изложена роль тромбоцитов в гемостазе, основные пути их активации, этапы формирования тромба и роль субэндотелиального матрикса в этом процессе. Рассмотрена роль потока в формировании тромбоцитарного агрегата, обоснована его важность для оценки функции тромбоцитов. Описано развитие диагностики тромбоцитарного гемостаза, внедрение микрофлюидных технологий, а также современное состояние исследований в этой области. Отражены успехи и особенности применения подобных технологий в изучении патологий системы гемостаза, основные сложности и задачи, стоящие перед исследователями и рекомендации ведущих исследователей в этой области. Также приведены данные о составе субэндотелиального матрикса и ориентации фибрилл коллагена в сосудах.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные статистические и экспериментальные подходы, включающие подготовку проточных камер, иммобилизацию коллагена и пробоподготовку. Предсавлены подробные протоколы экспериментов с использованием флуоресцентной микроскопии и иммунофлуоресцентного окрашивания, а также съемки и анализа изображений.

В главе 3, посвященной полученным результатам, описан процесс стандартизации параметров микрофлюидного теста, а также отладки протокола для клинического использования. Представлены исчерпывающие данные о воспроизводимости разработанного теста. Показаны результаты анализа чувствительности системы к гемостатическим нарушениям на примере пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича и иммунной тромбоцитопенической пурпурой. Также продемонстрирована способность теста различать группы пациентов с различной тяжестью клинических проявлений и приведено сравнение с применяемыми на данный момент анализами.

В главе 4, также содержащей рещультаты исследования, приведены результаты, показывающие, что сонаправленные с потоком фибриллы коллагена демонстрируют большую тромбогенность по сравнению с поперечными волокнами на высоких скоростях сдвига. Показано, что наблюдаемые различия связаны с начальными этапами тромбоцитарного гемостаза и объясняются более длительным взаимодействием тромбоцитов, движущихся под воздействием потока, с продольными фибриллами, что необходимо для активации и стабильной адзезии в условиях высоких скоростей сдвига. Продемонстрировано, что лишь малая популяция фибрилл, богатая фактором фон Виллебранда, обеспечивает адгезию в этих условиях и показано, что эти фибриллы относятся к коллагену III типа, содержащемуся в стандартных препаратах в качестве примеси.

Глава «Заключение» содержит анализ места разработанной системы и полученных данных в современных исследованиях гемостаза. Анализируется соотношение полученных результатов с литературными данными. Обсуждаются следствия полученных результатов, а также их возможные приложения и перспективы развития разработанной системы.

Выводы диссертации отражают основные полученные результаты исследований и соответствуют поставленной цели и задачам.

Работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Министерства образования и науки РФ, наглядно иллюстрирована, соответствует современным

методическим требованиям, написана с соблюдением литературных норм в академическом стиле и практически не содержит стилистических погрешностей и опечаток.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а тема исследования специальности 1.5.2. «Биофизика».

Диссертационная работа Мельниковой Евгении Александровны заслуживает положительной оценки и соответствует высоким требованиям по критериям актуальности, научной новизны и научно-практической значимости.

Вопросов и принципиальных замечаний, существенно влияющих на общую положительную оценку диссертации, нет.

Полнота изложения результатов исследования в опубликованных работах

По теме диссертации опубликовано 2 печатных работы в научных изданиях, входящих в международную реферативную базу данных (Scopus), включая 1 статью, опубликованную в издании, включенном в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации и 1 статью в международном издании, входящем в Q1. Основные положения диссертации доложены на российских и международных конференциях.

Заключение

Диссертационная работа Мельниковой Евгении Александровны «Разработка микрофлюидной модели тромбоцитарного гемостаза для клинического применения и изучение влияния геометрии активатора на процессы тромбообразования», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 Биофизика, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача разработки и характеризации экспериментальной микрофлюидной системы тестирования тромбоцитарного гемостаза с артериальными реологическими параметрами и пространственно ограниченным активатором из поперечно ориентированных фибрилл коллагена.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная

работа Мельниковой Е.А. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 Биофизика.

Диссертационная работа, автореферат и отзыв на диссертацию Мельниковой Евгении Александровны «Разработка микрофлюидной модели тромбоцитарного гемостаза для клинического применения и изучение влияния геометрии активатора на процессы тромбообразования» обсуждены и одобрены на заседании Отдела клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства»., протокол № 1 от «20» января 2026 г.

Заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
д.б.н., доцент Лазарев Василий Николаевич

Даю согласие на обработку моих персональных данных

_____ Лазарев Василий Николаевич

Подпись д.б.н. Лазарева В.Н. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
к.б.н Кострюкова Елена Сергеевна

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства». Адрес: 119435, Москва, улица Малая Пироговская, д. 1а. Телефон: +7 (499) 246-4409; E-mail: info@rcpcm.org

В диссертационный совет 99.1.098.02
на базе федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30); федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117998, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1)
В аттестационное дело **Мельниковой Е.А.**

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

По диссертационной работе Мельниковой Евгении Александровны «Разработка микрофлюидной модели тромбоцитарного гемостаза для клинического применения и изучение влияния геометрии активатора на процессы тромбообразования», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2. Биофизика.

Полное и сокращенное наименование организации:	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»; ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность руководителя ведущей организации:	Лагарькова Мария Андреевна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, генеральный директор
Фамилия Имя Отчество лица, утвердившего отзыв ведущей организации, ученая степень, ученое звание, должность, место работы	Лагарькова Мария Андреевна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук (03.02.07 – генетика, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология), генеральный директор ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность сотрудника, составившего отзыв ведущей организации:	Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, доцент, заместитель генерального директора по научной работе
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации	1. Effects of medicinal leech-related cationic antimicrobial peptides on human blood cells and plasma / T. Vakhrusheva, G. Moroz, L. Basyreva и др. // Molecules, — 2022. — Т. 27, № 18. — С. 5848. — DOI: 10.3390/molecules27185848.

в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет:	2. Cytotoxicity and Antiplatelet Activity of Cationic Antimicrobial Peptides of the Medicinal Leech Hirudo Medicinalis / G. Moroz, N. Podoplelova, M. Iudin и др. // Cell Biochem Biophys, — 2025. — Т. 83, — С. 5443-5453. — DOI: 10.1007/s12013-025-01860-w. 3. Structure-biological activity relationships of myeloperoxidase to effect on platelet activation / I. Gorudko, D. Grigorieva, E. Shamova и др. // Archives of Biochemistry and Biophysics — 2022. — Т. 729, — С. 109353. — DOI: 10.1007/s12013-025-01860-w. 4. Development of a microfluidic biosensor for the diagnostics and typing of mycobacterium tuberculosis. Journal of clinical practice / T. Mitko, R. Shakurov, F. Shirshikov и др. // Journal of Clinical Practice — 2021. — Т. 12, — С. 14-20. — DOI: 10.17816/clinpract71815 5. Effect of Biopolymers and Functionalized by Them Vaterite Microparticles on Platelet Aggregation / D. Grigorieva, E. Mikhalchik, N. Balabushevich и др. // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology — 2024. — Т. 60, №3, — С. 1221-1233. — DOI: 10.1134/S0022093024030281. 6. Binding of lactoferrin to the surface of low-density lipoproteins modified by myeloperoxidase prevents intracellular cholesterol accumulation by human blood monocytes / V. Vasilyev, A. Sokolov, V. Kostevich и др. // Biochemistry and Cell Biology, — 2021. — Т. 99, №1, — С. 109-116. — DOI: 10.1139/bcb-2020-0141. 7. On the Application of Polymer Microspheres to Identify Positively and Negatively Charged Extracellular Traps of Blood Cells / L. Basyreva, E. Shmeleva, V. Zubko и др. // Nanotechnol Russia, — 2025. — Т. 20, — С. 190-199. — DOI: 10.1134/S2635167625600415

Адрес ведущей организации

Индекс	119435
Объект	ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Город	Москва
Улица	Малая Пироговская ул.
Дом	1а
Телефон	+7 (499) 246-4409
E-mail	info@rcpcm.org
Web-сайт	https://rcpcm.ru/

Ведущая организация подтверждает, что соискатель ученой степени не является её сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с её сотрудниками.

В соответствии с приказом Минобрнауки России от 01.07.2015 №662 «Об определении состава информации о государственной научной аттестации для включения в федеральную информационную систему государственной научной аттестации», согласие на обработку персональных данных подтверждаю

Генеральный директор
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина
ФМБА России
член-корр. РАН, д.б.н. Лагарькова Мария Андреевна

Подпись член-корреспондента РАН, доктора биологических наук, Лагарьковой Марии Андреевны заверяю:

Ученый секретарь, к.б.н Кострюкова Елена Сергеевна