

ФМБА РОССИИ

**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)**

119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1А
Тел. (499) 246-77-21 Факс (499) 246-44-09
<http://www.fncfm.org>, e-mail: niihfm@fmbamail.ru

22.02.2023 № 259-1

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического
агентства»,
член-корр. РАН, профессор РАН,
д.б.н.
М.А. Лагарькова



« 22 » февраля 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения
«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)
на диссертационную работу **Белова Дмитрия Анатольевича**
**«НОВЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ И МЕТОДИКИ ОБРАБОТКИ
СИГНАЛОВ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ АМПЛИФИКАТОРОВ НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук
по специальности 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

Актуальность диссертационной работы

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) – современный метод молекулярно-генетического анализа, позволяющий детектировать изменение интенсивности флуоресценции проб ДНК при их циклической амплификации в присутствии флуоресцентных красителей. Метод получил широкое распространение и активно применяется в клинической практике и науке.

Ежегодно компании по всему миру выпускают на рынок новые приборы для ПЦР-РВ - детектирующие амплификаторы. Из-за пандемии COVID-19 данное направление приборостроения получило особый научный и технологический импульс. Среди отечественных серийных производителей амплификаторов можно выделить две крупные компании – ООО «ДНК-Технологии» и Институт аналитического приборостроения РАН. Линейка выпускаемых ИАП РАН амплификаторов состоит из приборов серии АНК: АНК-32, АНК-48 и АНК-64. Важными техническими характеристиками всех амплификаторов нуклеиновых кислот, критически влияющими на качество результатов анализа, являются скорость нагрева/охлаждения и разброс температур между пробами в ходе одной постановки. Поэтому актуальной задачей является улучшение представленных характеристик в выпускаемых и разрабатываемых амплификаторах.

Метод плавления ДНК реализуется на детектирующих амплификаторах после процедуры амплификации ПЦР-РВ. Первоначально используемый как вспомогательный, по мере развития аппаратно-программного и реагентного обеспечения, метод начал применяться в задачах эпигенетики и выявления однонуклеотидных полиморфизмов. В диссертации решается актуальная задача по созданию методик обработки сигналов плавления ДНК и расширению спектра задач, решаемых при помощи амплификаторов серии АНК (ИАП РАН, Россия).

Научная новизна исследования

В диссертационной работе представлены следующие научно-технические результаты, обладающие новизной и важностью для развития приборной базы отечественных ПЦР-амплификаторов, увеличения их производительности и повышения их надежности:

- представлены варианты реализации термогидравлической системы, обеспечивающие сокращение времени анализа на амплификаторах серии АНК до 30 % и пятикратное уменьшение разброса температур по зонам амплификации при термостатировании проб.

- разработан способ компенсации неоднородности температурного поля элементов амплификатора, основанный на корректировке сигналов управления температурным режимом элементов Пельтье и формировании поправок температур проб при повторных анализах по выявленным различиям температур плавления массива идентичных образцов.

- впервые выполнена оценка влияния параметров термогидравлической системы на характеристики амплификатора. Расчет динамики тепловых

процессов численными методами при термоциклировании пробы в тепловом блоке амплификатора сведен к решению нестационарной задачи теплопроводности с эквивалентным коэффициентом теплопроводности пробы и переменным коэффициентом теплоотдачи между поверхностями каналов блока термоциклирования и протекающим теплоносителем.

- предложены новые методики обработки оптических сигналов при плавлении ДНК, основанные на их аппроксимации непрерывными функциями, а именно усовершенствованными сигмоидальной, производной сигмоидальной, Гаусса и полиномиальной функцией оптимальной степени, позволяющие достичь критериев высокого разрешения путем уменьшения погрешности вычисления температуры плавления ДНК до 0,1 К, а также позволяющие повысить производительность амплификатора за счет уменьшения рабочего диапазона температур и увеличения шага дискретизации сигнала.

Практическая значимость

Практическая значимость диссертации обусловлена возможностью предложенной термогидравлической системы увеличить производительность ПЦР-амплификаторов, а также снизить коэффициент нагрузки в элементах Пельтье и, таким образом, повысить их надежность. Сформулированная математическая модель процессов теплопереноса в тепловом блоке может быть использована при разработке и усовершенствовании современных амплификаторов. Разработанная методика определения разброса температур по лункам на основе метода плавления ДНК позволяет выполнять предэксплуатационную настройку амплификаторов и выравнивание неоднородности их температурного поля. Предложенные методики обработки сигналов плавления позволяют реализовывать метод плавления ДНК высокого разрешения на амплификаторах серии АНК.

Полученные автором результаты представляют практический интерес и могут быть использованы:

- в организациях, разрабатывающих оборудование для реализации методов ПЦР-РВ и плавления ДНК: ООО "ДНК-технология" (Москва), ООО «ЛЮМЭКС-АХК» (Санкт-Петербург), ФГУП «Экспериментальный завод научного приборостроения со специальным конструкторским бюро Российской академии наук» (г. Черноголовка), МГТУ им. Н. Э. Баумана (Москва), АО «Научные приборы» (Санкт-Петербург) и др.;

- в организациях, реализующих и совершенствующих метод плавления ДНК высокого разрешения: Институт математических проблем биологии (г.

Пушино), ИПМ им. М.В. Келдыша РАН (Москва), ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта" (Санкт-Петербург), ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России (Санкт-Петербург), ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва), ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) и др.

Структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Работа изложена на 144 страницах текста, содержит 41 рисунок, 18 таблиц. Список литературы включает 148 источников.

В разделе «**Введение**» обосновывается актуальность темы исследования, приведены цели и задачи исследования, указаны научная новизна и практическая ценность, сформулированы положения, выносимые на защиту, отмечен личный вклад автора. Представлен список научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, в которых были использованы полученные результаты, перечислены научные конференции, на которых представлены доклады по тематике работы.

Первая глава посвящена анализу современного состояния приборного и программного обеспечения методов ПЦР-РВ и плавления ДНК. Приведена общая схема детектирующего амплификатора нуклеиновых кислот, обсуждены варианты реализации его термоциклирующего, термостатирующего и оптического блоков. Выполнен сравнительный анализ коммерчески доступных амплификаторов, выявлены основные направления их развития, методики увеличения скорости изменения температуры анализируемых образцов и обеспечение минимального температурного градиента между пробамии в одной постановке. Приведены основные сведения о методе плавления ДНК и областях его применения для задач аналитики. Рассмотрены известные алгоритмы и коммерческое программное обеспечение для обработки сигналов плавления ДНК. Сформулированы цель и задачи диссертационного исследования.

Во второй главе приведены новые технические решения детектирующих амплификаторов нуклеиновых кислот. Описана корректирующая система, направленная на компенсацию неоднородности температурного поля держателя пробирок амплификатора и основанная на корректировке сигналов управления температурным режимом элементов Пельтье и формировании поправок температур проб при повторных анализах

по выявленным различиям температур плавления образцов в массиве пробирок. Применение корректирующей системы в составе амплификатора направлено на реализацию молекулярно-генетического анализа методом ПЦР-РВ с высокой и сопоставимой во всех пробирках эффективностью амплификации, а также на обнаружение малых различий температур плавления при анализе методом High Resolution Melting (HRM).

Предложены варианты реализации термогидравлической системы в составе теплового блока детектирующего амплификатора нуклеиновых кислот. Предложенная система направлена на повышение производительности амплификатора путем увеличения скоростей нагрева и охлаждения анализируемых проб за счет протекания жидкости заданной температуры и ее удаления в каналах держателя пробирок амплификатора, а также на компенсацию неоднородности температурного поля держателя пробирок за счет циркуляции теплоносителя в каналах.

В третьей главе сформулирована математическая модель, позволяющая описать процессы теплопереноса в тепловом блоке амплификатора с термогидравлической системой. Выполнен расчет динамики тепловых процессов численными методами. Выявлено, что термогидравлическая система позволяет уменьшить время проведения молекулярно-генетического анализа методом ПЦР-РВ на величину около 30% от общей стандартной продолжительности. Разработан и испытан экспериментальный стенд на основе амплификатора АНК-32 (ИАП РАН, Россия), содержащий предложенную термогидравлическую систему. Экспериментально подтверждено повышение скорости изменения температуры держателя пробирок при использовании термогидравлической системы до 6 раз. Выявлено допустимое различие результатов экспериментального и численного расчета. Экспериментально установлено, что благодаря введению в состав амплификатора термогидравлической системы достигается пятикратное уменьшение разброса температур по лункам держателя пробирок.

В четвертой главе приведены предложенные методики обработки графиков зависимости флуоресцентного сигнала от температуры при плавлении ДНК, основанные на аппроксимации графиков плавления различными функциями: усовершенствованными сигмоидальной, производной сигмоидальной, Гаусса и полиномиальной функцией оптимальной степени. Методики реализованы в программной среде Matlab и позволяют определить величины температуры плавления T_m и ширины интервала плавления ΔT , достичь стандартов плавления высокого разрешения и автоматизировать вычислительный процесс. Показаны

результаты применения численных методик к экспериментальным данным процессов амплификации и плавления ДНК, произведено сравнение погрешностей определения значений T_m и ΔT , величины модифицированного критерия Акаике, а также затратности вычислительных ресурсов. Представленные методики реализованы в экспериментальной версии программного обеспечения для амплификаторов АНК-32, АНК-48, АНК-64 и экспериментального образца АНК-96.

Раздел **«Заключение»** резюмирует полученные результаты и сделанные на их основе выводы, которые полностью соответствуют поставленным в работе целям и задачам.

Из вышеизложенного следует, что диссертантом проделан большой объем работы, выполненной на высоком научном-техническом уровне, получены новые практические знания, которые, несомненно, имеют прикладной характер и будут использованы в дальнейших разработках. Результаты работы изложены подробно и читаются с интересом.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации

Диссертационная работа выполнена с использованием достаточного количества результатов экспериментальной работы, инженерно-конструкторских решений и широкого комплекса методов и подходов. На основании полученных данных диссертантом сделаны обоснованные выводы. Проведенные исследования выполнены на высоком научно-техническом уровне, достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений.

Освещение диссертации в научной печати

Результаты работы и защищаемые положения прошли апробацию на семи российских и международных конференциях. Автором опубликовано по теме диссертации 14 печатных работ, среди которых 9 статей в изданиях, включенных в список ВАК РФ, и 5 статей – Scopus. Автором было получено три патента и зарегистрирована программа для ЭВМ. Публикации соискателя полностью отражают содержание диссертационной работы и подтверждают его личный вклад в проведенные исследования.

Замечания и вопросы к содержанию диссертационной работы

Замечаний к диссертационной работе немного. В тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения, которые не относятся к научной сути работы. Но хотелось бы обратить внимание на следующее:

1. В Таблице 4.5 приводятся результаты применения разработанных методик обработки сигналов плавления ДНК, при этом, значения СКО определения параметра T_m не превышают 0,1 град. Остается непонятным, почему в результате применения программного обеспечения на основе одной из методик, значение СКО составляет 0,2 град. (Таблица 4.6).

2. Не обоснован выбор значений удельной тепловой мощности элементов Пельтье и скорости протекания воды, приведенных на стр. 74 и используемых при реализации численных методов исследования тепловых процессов амплификатора.

Сделанные замечания никак не снижают ценность данной работы и значимость полученных в ней результатов.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям

Диссертационная работа Белова Дмитрий Анатольевича «Новые технические решения и методики обработки сигналов детектирующих амплификаторов нуклеиновых кислот» является самостоятельной завершенной научно-исследовательской квалификационной работой, посвященной разработке новых технических решений, совершенствованию способов обработки и интерпретации сигналов в современных ПЦР - амплификаторах с потенциальной возможностью их внедрения в практику. Тема и содержание диссертационной работы полностью соответствует выбранной специальности 1.3.2 - «Приборы и методы экспериментальной физики».

По научной новизне, актуальности, объему и обоснованности научных результатов диссертация полностью отвечает всем требованиям, изложенным в п. 9 Положения ВАК РФ «О присуждении ученых степеней», (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Белов Дмитрий Анатольевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата технических наук.

Отзыв обсужден и одобрен 17.02.2023 на общеинститутском семинаре ФГБУ «Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства» и утвержден протоколом № 1 от 17 февраля 2023г.

Руководитель Центра технологий и микрофабрикации ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Басманов Дмитрий Викторович



Кандидат физико-математических наук, и. о. заведующего лабораторией электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Башкиров Павел Викторович



Адрес: Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства».

Сайт: <http://rcpcm.org/>

тел.: +7 499 2469165; e-mail: olga.likhnova@rcpcm.org

Подпись Басманова Д.В. и Башкирова П.В. заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
к.б.н. О.П. Лихнова



«22» февраля 2023 г.