

О Т З Ы В

официального оппонента диссертационной работы

Белова Дмитрия Анатольевича

«Новые технические решения и методики обработки сигналов детектирующих амплификаторов нуклеиновых кислот», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

На оппонирование представлены: диссертация общим объемом 144 страницы, включающая введение, четыре главы, заключение; список литературы, содержащий 148 источника и автореферат диссертации на 20 страницах.

Актуальность темы диссертации обусловлена широким распространением методов молекулярного анализа нуклеиновых кислот, к которым относятся полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), позволяющая проводить количественный анализ, и метод плавления ДНК высокого разрешения. Метод ПЦР-РВ широко применяется при решении различных диагностических и научно-исследовательских задач, как, например, прямое обнаружение и идентификация возбудителей заболеваний, молекулярное типирование и исследование свойств патогенных микроорганизмов, анализ мутаций, связанных с генетическими заболеваниями, идентификация личности человека. Метод плавления ДНК высокого разрешения позволяет сегодня решать такие задачи, как обнаружение мутаций, полиморфизмов и эпигенетических различий в образцах двухцепочечной ДНК. Оба метода обладают высокими чувствительностью и специфичностью, которые, однако, в высокой степени

зависят от используемого оборудования и применяемых методик обработки результатов эксперимента.

В последнее время резко возросла необходимость существенного увеличения производительности и обеспечения одинаковых условий протекания реакции во всех ячейках многоканального оборудования, предназначенного для реализации методов ПЦР-РВ и плавления ДНК высокого разрешения. Ситуация обострилась в период пандемии COVID-19, когда на порядки возросли объемы клинико-диагностических тестов на основе ПЦР-РВ.

С учетом того, что решению вопросов, связанных с совершенствованием, направленным, прежде всего, на повышение производительности оборудования для реализации ПЦР-РВ, посвящена данная диссертация, ее актуальность не вызывает сомнения.

Научная новизна. В диссертационной работе предложены новые методики обработки сигналов плавления ДНК, основанные на их аппроксимации непрерывными функциями, а именно усовершенствованными сигмоидальной, производной сигмоидальной, Гаусса и полиномиальной функцией оптимальной степени, которые позволяют: - достичь критериев высокого разрешения путем уменьшения погрешности вычисления температуры плавления ДНК до 0,1 К; - повысить производительность амплификатора при реализации анализов методом плавления ДНК за счет сокращения длительности анализа до 6 раз путем уменьшения рабочего диапазона температур и увеличения шага дискретизации сигнала.

Значимость результатов для науки и практики. Результаты исследований, представленные в диссертационной работе Белова Д.А., имеют существенное значение для развития отечественной школы научного и медико-биологического приборостроения. Представлены варианты реализации термогидравлической системы амплификатора ДНК, позволяющие обеспечить повышение производительности амплификатора ДНК за счет сокращения длительности анализа до 25%. Разработан способ

компенсации неоднородности температурного поля «держателя», то есть детали, в которой размещаются образы с пробами, основанный на корректировке сигналов управления температурным режимом элементов Пельтье.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. Работа Белова Д. А. выполнена на хорошем техническом и методическом уровне. Сформулированные научные положения и выводы, в целом, обоснованы и соответствуют поставленным задачам и полученным результатам исследования. При работе над диссертацией соискатель использовал современные методы теоретических и экспериментальных исследований. Достоверность результатов, полученных автором диссертации, не вызывает сомнения и подтверждается тем, что применяемые теоретические подходы основаны на фундаментальных законах теплофизики и согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на 7 Российских и международных конференциях. Полученные в работе результаты опубликованы в 14 печатных трудах, из которых 9 входят в перечень журналов ВАК, 5 публикаций — в международные реферативные базы данных и систему цитирования Scopus. По результатам работы получено 3 патента на изобретения и зарегистрирована 1 программа для ЭВМ.

Характеристика работы Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка использованных источников. Работа содержит 144 страницы машинописного текста, 18 таблиц и 41 рисунок. Список использованных источников включает 148 наименований.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследований.

Первая глава посвящена обзору методов ПЦР-РВ и плавления ДНК, а также оборудования для их реализации. Выполнено сравнение современных детектирующих амплификаторов и выявлены основные технические характеристики, требующие улучшения. Приведены теоретические основы анализа методом плавления ДНК, в частности, факторы, влияющие на форму графиков плавления и значение его основного характерного параметра – температуры плавления T_m . Проанализированы известные методики обработки сигналов плавления, выявлены их недостатки. Приведены ограничения метода плавления ДНК высокого разрешения и известные способы их решения. Выполнен обзор методов измерения тепловых параметров детектирующих амплификаторов.

Во второй главе предложены направления совершенствования амплификаторов нуклеиновых кислот с целью повышения их технических характеристик. Предложен способ измерения неоднородности температурного поля держателя пробирок с помощью бесконтактных датчиков, представляющих гасимые флуоресцентные зонды в пробирках для ПЦР-РВ. Описана корректирующая система, позволяющая компенсировать неравномерность температурного поля путем корректировки значений управляющих сигналов элементов Пельтье. Предложены технические решения, предполагающие включение в состав теплового блока амплификатора термогидравлической системы.

Третья глава посвящена разработке математической модели теплового процесса в блоке нагрева/охлаждения амплификатора, выполнено численное исследование процессов теплопереноса в элементах амплификатора с учетом термогидравлической системы. Результаты расчета, подтвержденные экспериментальными исследованиями, показали возможность сокращения длительности анализа методом ПЦР-РВ на анализаторе АНК-32 за счет добавления в его состав термогидравлической системы на величину до 25 %.

Экспериментально показано уменьшение разброса температур проб в пробирках при использовании термогидравлической системы. Описана конструкция гидрораспределителя, позволяющая упростить конструкцию термогидравлической системы и регулировать гидравлические сопротивления в каналах держателя пробирок.

Четвертая глава посвящена обработке сигналов плавления ДНК. Подробно описаны разработанные методики, основанные на аппроксимации графиков плавления различными непрерывными функциями, для определения их основных характерных параметров, а именно температуры плавления и ширины интервала плавления, аналитическими методами. Выполнено сравнение разработанных методик, по ряду критериев выявлено преимущество методики на основе полиномиальной функции. На ее основе разработано программное обеспечение ANK_Melting. Выполнена оценка систематической и случайной погрешностей определения разработанной программой ANK_Melting температуры плавления T_m на экспериментальном образце амплификатора АНК-96.

Автореферат в достаточной степени отражает основное содержание диссертации.

Работа написана хорошим техническим языком, построена логично. Имеющиеся опечатки и орфографические ошибки не затрудняют чтение и осмысление результатов работы.

Таким образом, в диссертационной работе Белова Д.А. поставленная цель достигнута – выполнен комплекс мероприятий, направленных на совершенствование приборной и методической базы детектирующих амплификаторов нуклеиновых кислот серии АНК.

Замечания и вопросы. При изучении диссертации возникли вопросы, ответ на которые, надеюсь, автор даст на защите диссертации.

1. Выводы к главе 1 не обоснованы. Дается много описательного материала, но нет четкого количественного обоснования необходимости повышения производительности амплификаторов ДНК.
2. При постановке Задач, решаемых в диссертации нет обзора и анализа математических моделей рабочих процессов, методов расчета и экспериментальных стендов и исследований.
3. Раздел 1.3 Методы измерений тепловых параметров – много ценного материала, но нет количественной оценки погрешности и динамических характеристик средств измерений.
4. Глава 3. Раздел 3.1 Математическое моделирование рабочих процессов. Нет строго описания сформулированной математической модели, нет допущений. Решается нестационарная задача, а где начальные и конечные условия? Из расчетной области исключены элементы Пельтье, пробирки (описка), и окружающая среда. Приведены исходные зависимости, но представлены расчетные. Нет расчета (не представлены результаты) теплового поля в реакционной смеси в процессе нагрева/охлаждения.
5. В работе не описано внедрение результатов работы, нет формального акта внедрения.

Стоит отметить, что указанные замечания и вопросы не влияют на общую положительную оценку работы, выполненную на хорошем уровне, но надеюсь, что в процессе защиты соискатель даст обоснованные ответы на обозначенные вопросы и замечания.

Заключение. Таким образом, диссертационная работа Д. А. Белова является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – создание основ для разработки нового, имеющего более высокие технические характеристики, поколения серийно выпускаемых приборов для анализа нуклеиновых кислот.

Тематика диссертационного исследования соответствует паспорту специальности 1.3.2 по следующим по пункту:

«Разработка и создание лечебно-диагностических методик и аппаратных комплексов для биомедицинских исследований».

Диссертация удовлетворяет требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 в действующей редакции), предъявляемым ВАК к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата технических наук, а ее автор, Белов Дмитрий Анатольевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Официальный оппонент:

Доктор технических наук по специальности 05.11.17 – приборы, системы и изделия медицинского назначения, профессор,
Заведующий кафедрой
«Вакуумная и компрессорная техника» (Э-5)
ФГБОУ ВО МГТУ им. Н. Э. Баумана (НИУ)
Чернышев Андрей Владимирович



А. Чернышев
14.02.23

OK

Почтовый адрес: 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, Телефон: +7 (499) 263-68-36
Контакты официального оппонента:
Моб. +7 9684359929, e-mail: chernyshev@bmstu.ru, av-chernyshev@yandex.ru

OK