

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Тупик Александры Николаевны

«Разработка микрочиповых устройств

для проведения полимеразной цепной реакции в гелевой среде»,

представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

### 1. Актуальность темы диссертационной работы

Разработка миниатюрных аналитических систем является одним из основных направлений развития современного аналитического приборостроения. Миниатюрные приборы позволяют не только уменьшить потребляемую мощность, объем образца и время анализа, но и получать новые технические характеристики аналитических устройств, отличные от макроаналогов. Основным элементом современных микроаналитических систем является миниатюрное устройство – аналитический микрочип, содержащий основные функциональные элементы для проведения стадий анализа (смесители, фильтры, электроды, функциональные сенсорные слои, а также системы каналов и резервуаров, необходимых для манипуляции с микрообъемами жидкости). Возможность автоматизации, управления и полного контроля всех стадий анализа в микроустройстве является бесспорным преимуществом микрочипов как элементов аналитических систем.

Наиболее перспективным является применение микроустройств для биологических и медицинских исследований. В современной практической медицине все большее внимание уделяется методам ДНК-диагностики, среди которых наиболее распространенным и известным является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для проведения ПЦР необходимы специальные условия – циклический температурный режим, а также изоляция синтезируемого продукта для предотвращения перекрестного заражения

проб (контаминации). Миниатюризация реакционных камер для ПЦР позволяет увеличить скорость и однородность теплообмена за счет высокого соотношения площади поверхности к объему, что повышает эффективность реакции и уменьшает общее время анализа.

Современные технологии цифровой ПЦР (цПЦР) позволяют регистрировать малые количества нуклеиновых кислот в присутствии мешающих факторов (конкурентные ДНК, ингибирующие вещества и др.). На данный момент существует около десятка зарубежных коммерческих фирм, представляющих микрочиповые устройства для цПЦР, однако разработкой отечественных аналитических систем для цПЦР на микрочиповой платформе только начинают заниматься отдельные компании и научные учреждения, например ИАП РАН, «Люмэкс». Разновидностью цифровой ПЦР является метод молекулярных колоний, который позволяет регистрировать результат ПЦР от отдельных молекул нуклеиновых кислот (колонии) в вязкой гелевой среде и может использоваться для ранней диагностики заболеваний или генетического анализа. Чтобы обеспечить доступность этого метода для исследовательских и диагностических лабораторий, необходимо снизить трудоемкость анализа при проведении ПЦР в слое геля, что возможно при создании специализированных микрочиповых устройств с реакционными камерами, содержащими гелевый слой.

Таким образом, тема диссертационной работы Тупик Александры Николаевны, посвященная развитию существующих технологий изготовления микрочиповых устройств с целью создания экспериментальных образцов для проведения ПЦР в гелевой среде, является *актуальной*.

Целью диссертационной работы, сформулированной автором, является разработка и создание микрочиповых устройств для обнаружения предельно малых количеств молекул нуклеиновых кислот на основе полимеразной цепной реакции в гелевой среде с применением флуориметрических методов детектирования.

Для достижения поставленной цели автором были проведены экспериментальные исследования, включавшие в себя выбор конструкционных материалов, изучение их влияния на эффективность реакции, выбор способов модификации поверхности полимерных материалов, изготовление микроструктур в стеклянных и полимерных подложках, изучение процесса отверждения клеевых композиций для герметизации реакционных камер, изготовление и апробация стеклянных и полимерных микрочиповых устройств при проведении ПЦР. Автором предложен критерий отверждения клеевых композиций на основе акрилатных соединений, для чего были проведены экспериментальные исследования светопропускания полимерных композиций в ближней инфракрасной области. Качество получаемого клеевого соединения подтверждено при исследовании на герметичность реакционных камер при циклическом нагреве по программе ПЦР, а также при апробации микрочиповых устройств.

## **2. Достоверность и обоснованность результатов**

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечивается корректным использованием теоретических и экспериментальных методов исследований и обработки данных. Выбор направлений работы в рамках поставленной цели представляется обоснованным и логичным. Экспериментальное исследование влияния полимерных материалов и композиций на эффективность ПЦР позволило определить основные конструкционные материалы для создания микрочиповых устройств. Теоретические оценки влияния температуропроводности полимерного материала на скорость нагрева планарного устройства не противоречат известным подходам и согласуются с результатами экспериментальных исследований.

Для изучения свойств материалов, используемых на разных этапах изготовления микрочиповых устройств, применялись следующие методы: лазерная конфокальная микроскопия, микроскопия ближнего поля,

профилометрия, сканирующая зондовая микроскопия, оптическая и инфракрасная спектрофотометрия. Результаты, полученные при апробации изготовленных микрочиповых устройств, имеют количественное и качественное совпадение с результатами, полученными референтными методами (в том числе опубликованными другими исследователями).

По результатам диссертационной работы опубликовано 13 печатных работ, в том числе 9 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ к публикации результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **3. Научная новизна**

Экспериментально исследованы спектры светопропускания фотоотверждаемых полимерных композиций на акрилатной основе в ближней инфракрасной области при разной продолжительности воздействия ультрафиолетовым излучением. Предложен критерий порогового типа, позволяющий установить факт отверждения применяемой полимерной композиции.

Усовершенствована методика определения герметичности микрочиповых устройств гравиметрическим методом за счет обоснования и введения в расчет поправки, учитывающей влагопоглощение применяемых полимерных материалов, величина которой определяется по результатам спектрофотометрических измерений в ближней инфракрасной области спектра.

Предложен способ оценки погрешности счета молекулярных колоний при их случайном и равномерном размещении в реакционной камере и с учетом размеров колоний, основанный на применении классических комбинаторных схем (выбор без возвращения). Использование подобного подхода дает возможность определить максимальное число колоний известного размера, регистрируемое в реакционной камере с выбранной погрешностью счета.

По результатам апробации изготовленных микрочиповых устройств для метода молекулярных колоний выявлена монотонно убывающая зависимость характерного размера молекулярных колоний от длины амплифицируемого фрагмента ДНК (в диапазоне от 200 до 500 пар оснований), характер которой имеет хорошее соответствие с результатами, опубликованными другими исследователями для метода «полоний» (Church G.M. et al).

#### **4. Практическая значимость**

В рамках работы созданы микрочиповые устройства для проведения ПЦР в гелевой среде, которые позволяют обнаружить малые количества ДНК в присутствии мешающих факторов. Применение микрочиповых устройств позволяет реализовать преимущества технологии цифровой ПЦР при ранней диагностики социально-значимых заболеваний, при проведении генетических исследований (секвенирование, обнаружение редких мутаций, однонуклеотидного полиморфизма и др).

Для снижения стоимости изготовления микрочиповых устройств было предложено использовать отечественные сертифицированные полимерные материалы, а микроструктуры изготавливать методом лазерной микрообработки, позволяющим оперативно обрабатывать мелкие партии однотипных заготовок для микрочиповых устройств. Для стеклянных микрочиповых устройств был предложен способ восстановления их работоспособности после проведения ПЦР, основанный на использовании химических средств для очистки стеклянной поверхности.

Экспериментальные исследования влияния полимерных материалов и композиций на эффективность ПЦР позволили определить круг основных конструкционных материалов для создания микрочиповых устройств, что было использовано при выполнении ПНИЭР: «Создание роботизированного комплекса для молекулярно-генетических исследований» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития

научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы» Минобрнауки России-(подтверждено Актом внедрения от 05.10.2015).

## **5. Общая характеристика работы**

Поставленная цель и задачи диссертационной работы решены полностью. Выполнен и представлен необходимый объем экспериментальных исследований, созданы и апробированы экспериментальные образцы стеклянных и полимерных микрочиповых устройств для проведения ПЦР в гелевой среде. Актуальность их применения продемонстрирована при регистрации кДНК онкомаркера цитокератина в реакционных камерах микрочиповых устройств, изготовленных как из стеклянных, так и из полимерных материалов. Формирование микроструктур является сложным и дорогостоящим процессом, поэтому применение полимерных материалов и высокотехнологических методов обработки поверхности лазерным излучением для изготовления реакционных камер значительно снизило стоимость изготовления микрочиповых устройств для ПЦР.

Научная новизна, практическая значимость и выводы являются результатами анализа теоретических и экспериментальных данных на этапах изготовления, исследования и апробации микрочиповых устройств для ПЦР.

Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание, выводы, научную новизну и практическую значимость работы, а также личный вклад автора.

## **6. Замечания**

По работе имеется ряд замечаний:

1) С. 75. Механическая обработка позволяет получать не только осесимметричные поверхности. Существует, например, микрофрезерование, позволяющее получать более сложные поверхности. Кроме того, в работе не упомянута лазерная стереолитография, позволяющая получить прецизионные изделия с высоким качеством поверхности.

2) С. 56, табл. 2.4. Поскольку для теплоемкости указан интервал изменения значений, для температуропроводности также следовало привести интервал. Непонятно, что за значения в скобках указаны ( $1,29 \cdot 10^7$  и  $1,68 \cdot 10^7$ ). Подстановка значений теплоемкости, плотности и теплопроводности дает несколько иные значения температуропроводности по сравнению с указанными в табл. 2.4.

3) С. 59. Для решения одномерного нестационарного уравнения теплопроводности (2) выбран неудачный метод – простая явная схема, обладающая условной устойчивостью и наклонными характеристиками. В силу ограниченности скорости передачи возмущений эта схема дает задержку в расчете, особенно во внутренних областях, не характерную для классической модели теплопроводности Фурье. Это существенно увеличивает оценки времени 60-61, сделаны по результатам численного моделирования. Автору следовало бы использовать простую неявную схему или схему Кранка-Николсона.

4) Для решения уравнения (2) необходимо было указать начальные и граничные условия. Кроме того, следовало бы указать использованное в расчетах сеточное число Фурье. Какого рода граничные условия использовались, как они были обоснованы? Учитывая результаты эксперимента, модель с многослойной стенкой и граничными условиями второго рода была бы здесь более уместной.

5) С. 59: «изменение температуры происходит в основном в вертикальной плоскости... таким образом, задача является пространственно одномерной». Видимо, изменение температуры происходит всё же вдоль вертикальной оси.

6) С. 60, рис. 2.2. Неудачное название «Распределения температурных полей...», поскольку температурным полем называют совокупность значений температуры в данный момент времени для всех точек изучаемого пространства. Скорее, здесь представлена зависимость температуры от времени в различных точках пластины.

7) Размерность в табл. 2.2: видимо, «мм» вместо «Мм». Ссылки на литературу ошибочно приводятся после точки в конце предложения. С. 18: частота в фразе «под действием ультразвука (от 0,1 до 2 кГц)» выглядит непривычно низкой. Замечен ряд опечаток на с. 4, 9, 11, 25, 30, 31, 35, 37, 53, 54, 62, 64, 72, 73, 94, но их характер не носит катастрофический характер.

Следует заметить, что сделанные замечания ни в коей мере не умаляют достоинств научно-квалификационной работы Тупик Александры Николаевны.

## **7. Заключение**

Диссертационная работа Тупик Александры Николаевны «Разработка микрочиповых устройств для проведения полимеразной цепной реакции в гелевой среде» изложена хорошим техническим языком, является научно-квалификационной работой, в которой предложены и разработаны новые аналитические устройства на микрочиповой основе, применение которых упростит проведение ПЦР в гелевой среде и позволит использовать технологии цифровой ПЦР на примере метода молекулярных колоний для обнаружения предельно малых количеств молекул ДНК в диагностических и исследовательских лабораториях.

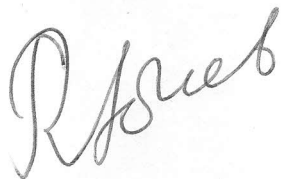
Основные научные результаты диссертационной работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, количество публикаций соответствует критериям п. 13 Положения (см. раздел 2 отзыва).

Диссертация соответствует паспорту специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики (технические науки) по пунктам области исследования: «Разработка и создание экспериментальных установок для проведения экспериментальных исследований в различных областях физики», «Изучение физических явлений и процессов, которые могут быть использованы для создания принципиально новых приборов и методов экспериментальной физики», «Разработка и создание средств автоматизации физического эксперимента», и отвечает требованиям п. 9



Положения ВАК РФ «О присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, как научно-квалификационная работа, в которой содержатся новые научно-обоснованные технические и технологические решения задач разработки и создания микрочиповых устройств для проведения ПЦР в гелевой среде, имеющие существенное значение для развития страны, а ее автор, Тупик Александра Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Официальный оппонент,  
заведующий кафедрой оптимизации  
химической и биотехнологической  
аппаратуры Санкт-Петербургского  
государственного технологического  
института (технического университета),  
доктор технических наук  
по специальности 05.17.08,  
профессор



Абиев Руфат Шовкетович

Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Санкт-Петербургский государственный технологический институт  
(технический университет)»  
Кафедра оптимизации химической и биотехнологической аппаратуры

Адрес: 190013, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 26  
Телефон: +7 (812) 494-92-76  
E-mail: [rufat.abiev@gmail.com](mailto:rufat.abiev@gmail.com)

Подпись *Абиева Руфата Шовкетовича*  
начальник отдела контроля качества

