

02.12.2022 № 10341-455/101

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИАП РАН
доктор технических наук



А.А. Евстапов

« 2 » декабря 2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт
аналитического приборостроения Российской академии наук»
по диссертации 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»

Информация о соискателе и диссертации

Диссертация «Новые технические решения и методики обработки сигналов детектирующих амплификаторов нуклеиновых кислот» выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт аналитического приборостроения Российской академии наук» (далее – ИАП РАН).

Белов Дмитрий Анатольевич, 1990 г. рожд., в 2015 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петербургский государственный университет путей сообщения Императора Александра I» (далее - ФГБОУ ВО ПГУПС) по специальности «Промышленная теплоэнергетика» с присуждением квалификации «Инженер». Диплом с отличием № 107814 0000804 выдан 07.07.2015.

Белов Дмитрий Анатольевич обучался в аспирантуре с 01.09.2015 по 31.08.2019 и освоил программу подготовки научно-педагогических кадров по направлению подготовки 13.06.01 «Электро- и теплотехника» с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь», протокол № 1 от 06.06.2019. Диплом № 107814 0000116 выдан 10.06.2019.

В настоящее время Белов Дмитрий Анатольевич работает младшим научным работником в лаборатории № 235 ИАП РАН.

Научный руководитель - Киселев Игорь Георгиевич, доктор технических наук, профессор кафедры «Электротехника и теплоэнергетика» ФГБОУ ВО ПГУПС, Заслуженный работник Высшей школы Российской Федерации.

Научный консультант - Манойлов Владимир Владимирович, доктор технических наук, заведующий лабораторией ИАП РАН.

Актуальность темы исследования

В настоящее время в науке и медицине нашли широкое применение детектирующие амплификаторы нуклеиновых кислот (далее – амплификаторы), работающие на принципе накопления продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и регистрации сигналов флуоресценции образцов в реальном времени (ПЦР-РВ). При всем многообразии практического применения амплификаторов важной характеристикой в условиях реального использования является время проведения реакции и, соответственно, получения результатов анализа. Актуальной задачей является уменьшение времени анализа за счет совершенствования приборной базы анализатора, в частности, его теплового блока. При этом необходимо оценить эффективность конструкционных изменений путем исследования процессов теплопереноса численными методами и проведения экспериментов.

Современные амплификаторы позволяют осуществлять анализы на основе метода плавления высокого разрешения (High Resolution Melting, HRM), способного определять характеристики образцов ДНК в соответствии с их поведением при плавлении ДНК. Метод HRM используются для решения ряда задач: выявления однонуклеотидных полиморфизмов, оценки специфичности проведения ПЦР, в эпигенетических исследованиях и т. д. Для достижения высокого разрешения дискретность изменения температуры не должна превышать 0,2 К. Это приводит к значительному увеличению длительности измерений. Отсюда возникает необходимость разработки методики для сокращения времени проведения анализов на основе метода плавления высокого разрешения, содержащей обработку исходных данных с достижением увеличенной дискретности измерения. Разработка методик обработки данных особенно актуальна, так как алгоритмы, применяемые в известных анализаторах, либо мало освещены в научной литературе, либо вообще полностью закрыты.

Основными характерными параметрами графика плавления (ГП) являются температура плавления ДНК T_m и ширина интервала плавления ΔT . Эти параметры зависят от состава и длины анализируемого фрагмента ДНК. При осуществлении метода плавления высокого разрешения необходимо обеспечить определение отличия температур плавления ДНК двух образцов с величиной погрешности порядка 0,1 К, это задает дополнительные высокие требования к техническим характеристикам усилителей. Важными задачами являются уменьшение температурного градиента между различными пробирками и разработка методик, направленных на повышение точности определения температуры плавления ДНК T_m и значения ширины интервала плавления ДНК ΔT без необходимости компенсации нелинейной базовой линии и нормировки графика плавления.

Таким образом, актуальным является развитие приборной и методической базы усилителей, направленное на улучшение его характеристик: увеличение скорости нагрева и охлаждения в циклическом режиме, уменьшение разброса температур между пробирками в режиме плавления, увеличение точности определения характерных параметров плавления ДНК, в частности, за счет повышения разрешающей способности усилителя и уменьшения длительности анализов ПЦР-РВ и HRM.

Тематика и содержание научной работы удовлетворяет трем приоритетам Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации, обозначенным Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642 (см. п. 20 (а, в, д)):

- переход к передовым цифровым, интеллектуальным производственным технологиям, роботизированным системам, новым материалам и способам конструирования, создание систем обработки больших объемов данных, машинного обучения и искусственного интеллекта;

- переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных);

- противодействие техногенным, биогенным, социокультурным угрозам, терроризму и идеологическому экстремизму, а также киберугрозам и иным источникам опасности для общества, экономики и государства.

Основные научные результаты и их новизна

Научная новизна

1. Разработаны варианты реализации термогидравлической системы, обеспечивающие повышение производительности усилителя при реализации анализов методом ПЦР-РВ за счет сокращения длительности анализа до 30 % и уменьшение разброса температур по лункам держателя пробирок при термостатировании проб до 5 раз.

2. 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 образцов в массиве пробирок.

3. Впервые выполнена оценка влияния параметров теплоносителя в термогидравлической системе 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 λ_{eq} и переменным коэффициентом теплообмена α_c между поверхностями каналов держателя пробирок и протекающей при различных скоростях и температурах жидкости.

4. Предложены методики обработки сигналов плавления 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;
- 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.

Практическая значимость

1. Предложенная термогидравлическая система позволяет увеличить производительность амплификаторов до 30 % за счет сокращения времени анализа, а также снизить коэффициент нагрузки элементов Пельтье и, таким образом, повысить их надежность.

2. Разработанная методика определения разброса температур по лункам на основе метода плавления ДНК позволяет выполнять настройку амплификатора и уменьшить неоднородность температурного поля держателя пробирок в его составе, что способствует воспроизводимости анализов.

3. Разработанная конструкция гидрораспределителя термогидравлической системы позволяет выровнять гидравлические сопротивления в каналах держателя пробирок, упростить конструкцию и уменьшить габариты термогидравлической системы.

4. Предложенные новые методики обработки сигналов плавления ДНК обеспечивают сокращение времени анализа до 6 раз, достижение критериев высокого разрешения и автоматизацию процесса обработки результатов анализа. На основе предложенной методики разработана экспериментальная версия программного обеспечения для серийно

выпускаемых амплификаторов АНК-32, АНК-48, АНК-64 и экспериментального образца АНК-96.

Личный вклад автора

1. Аналитический обзор современного состояния приборной и методической базы генетических анализаторов, основанных на методах полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), плавления ДНК и плавления ДНК высокого разрешения.

2. Создание методики для определения и выравнивания неоднородности температурного поля амплификатора.

3. Разработка новых технических решений детектирующего амплификатора, направленных на улучшение его характеристик.

4. Разработка математической модели процессов теплопереноса в тепловом блоке детектирующего амплификатора с термогидравлической системой.

5. Проведение исследований процессов теплопереноса теплового блока с термогидравлической системой численными методами.

6. Разработка экспериментального стенда и проведение экспериментальных исследований на стенде.

7. Сравнение результатов численного моделирования процессов теплопереноса теплового блока с термогидравлической системой и данных, полученных в результате эксперимента.

8. Разработка методик обработки сигналов плавления ДНК, реализация методик в программной среде MATLAB.

Апробация результатов диссертационного исследования

Основные положения и результаты диссертации докладывались на следующих конференциях.

1 Первая Российская конференция «Физика – наукам о жизни», Санкт-Петербург, ФТИ им. Иоффе, 2016 г.

2 Научная конференция с международным участием «Неделя науки СПбПУ», Санкт-Петербург, ФГАОУ ВО СПбПУ, 19-24 ноября 2018 г.

3 Международная конференция «Физика. СПб», ФТИ им. Иоффе, 22-24 октября 2019 г.

4 Международная научная конференция «FarEastCon», Владивосток, ДВФУ, 2020 г.

5 Шестой междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии», Москва, 2020 г.

6 VIII Международная молодежная научная конференция «Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2021», Екатеринбург, 17-21 мая 2021 г.

7 Международная конференция «Физика.СПб», Санкт-Петербург, ФТИ им. А. Ф. Иоффе, 18–22 октября 2021 г.

Основные научные 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 диссертации получено 3 патента на изобретение и зарегистрирована 1 программа для ЭВМ.

Основные публикации соискателя по теме диссертации

1 **Белов Д.А.**, Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Повышение разрешающей способности генетических анализаторов при определении температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2016. Т. 26, № 2. С. 17-22.

2 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Манойлов В.В. Методика обработки данных при плавлении продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2016. Т. 26, № 3. С. 10-14.

3 **Белов Д.А.**, Киселев И.Г., Ватулин Я.С. Инновационные решения при разработке прецизионного термостата. Профессиональное образование, наука и инновации в XXI веке. Т. 1: Сборник трудов X Санкт-Петербургского конгресса - СПб.: ФГБОУ ВО ПГУПС, 2016. С. 45-48.

4 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Манойлов В.В. Разработка методик обработки сигналов плавления ДНК // Научное приборостроение. 2017. Т. 27, № 1. С. 83-89.

5 **Белов Д.А.**, Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Методика определения разброса температур по лункам анализаторов нуклеиновых кислот // Научное приборостроение. 2017. Т. 27, № 4. С. 34-39.

6 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Новая методика обработки флуоресцентного отклика плавления ДНК // Научное приборостроение. 2018. Т. 28, № 1. С. 3-10.

7 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Широкоград А.Л. Разработка экспериментальной версии программного обеспечения на основе новой методики определения температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2018. Т. 29, № 2. С. 11-19.

8 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Киселев И.Г., Водопьянова Ю.О. Совершенствование теплового блока анализатора нуклеиновых кислот // Бюллетень результатов научных исследований. 2018. № 4. С. 5-11.

9 **Belov D.A.**, Belov Yu.V., Kurochkin V.E. Development of a new technique for quantitative PCR analysis // J. Phys.: Conf. Ser. 2019. 1400 033021.

10 Курочкин В.Е., **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Зубик А.Н. Определение модельных констант при вычислении температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2020. Т. 30, № 2. С. 10–16.

11 **Belov D.A.**, Belov Yu.V., Kiselev I.G. Modeling of the DNA Melting Point Dependence on Various Analysis Factors // IEEE 2020 International Multi-Conference on Industrial Engineering and Modern Technologies (FarEastCon). 2020. P. 1-3.

12 **Belov D.A.**, Bulyanitsa A.L., Korneva N.A., Aldekeeva A.S., Belov Yu.V. Analytical determination of DNA melting characteristic parameters using the optimal degree polynomial regression model // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. 2103 012057.

13 Kiselev I.G., **Belov D.A.** Physical processes simulation in a precision device for liquid samples thermal cycling // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. 2131 022061.

14 Kurochkin V.É., **Belov D.A.**, Belov Yu.V., Zubik A.N. A method for determining characteristic DNA melting parameters in nucleic acid analyzer // Biomedical Engineering. 2022. Vol. 55, № 5. P. 333–336.

Специальность, которой соответствует диссертация

Указанная выше тематика исследований полностью согласуется с формулой специальности 1.3.2 «Область науки и техники, включающая экспериментальные и теоретические исследования, направленные на разработку новых принципов и методов физических измерений, а также на создание новых приборов и устройств для изучения физических явлений и процессов» области знаний «технические науки».

Представленная диссертация соответствует паспорту специальности 1.3.2 по следующим пунктам.

1. Изучение физических явлений и процессов, которые могут быть использованы для создания принципиально новых приборов и методов экспериментальной физики.

2. Разработка новых принципов и методов измерений физических величин, основанных на современных достижениях в различных областях физики и позволяющих существенно увеличить точность, чувствительность и быстродействие измерений.

3. Разработка и создание научной аппаратуры и приборов для экспериментальных исследований в различных областях физики.

4. Разработка методов математической обработки экспериментальных результатов.

5. Моделирование физических явлений и процессов.

На основании этого можно заключить, что диссертационная работа соответствует выбранной специальности 1.3.2 «Приборы и методы экспериментальной физики».

По результатам проделанной работы принято решение рекомендовать диссертацию Белова Дмитрия Анатольевича «Новые технические решения и методики обработки сигналов детектирующих амплификаторов нуклеиновых кислот» к защите на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики» в диссертационном совете 24.1.029.01 Института аналитического приборостроения РАН.

Заключение принято на заседании Научного Семинара ИАП РАН (протокол № 9 от 15.09.2022). Присутствовали: 6 докторов наук, 9 кандидатов наук. Общее число участников – 23. Результаты открытого голосования: за принятие заключения – 22, против – нет, воздержавшихся – 1.

Председатель,
главный научный сотрудник,
доктор физико-математических наук



Явор М.И.

Секретарь



Хорошавина Л.П.