

Петров Александр Иванович

**Исследование и практическая реализация
программно-аппаратных средств
проведения полимеразной цепной реакции
с наблюдением в реальном времени**

Специальность:

01.04.01 - Приборы и методы экспериментальной физики

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук**

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте аналитического приборостроения Российской Академии наук (ИАП РАН)

Научный руководитель

Доктор технических наук,
профессор,
директор ИАП РАН

Курочкин
Владимир
Ефимович

Официальные оппоненты:

Доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой автоматизации процессов химической промышленности Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)

Русинов
Леон
Абрамович

Кандидат технических наук, доцент кафедры «Вакуумная и компрессорная техника» (Э-5) Факультет «Энергомашиностроение Московского государственного технического университета им. Н.Э.Баумана

Белова
Ольга
Владимировна

Ведущая организация:

Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения, кафедра медицинской электроники.

Защита состоится 29 декабря 2016 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета Д002.034.01 на базе ИАП РАН по адресу 198095, Санкт Петербург, ул. Ивана Черных, д.31-33, лит А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайтах www.iairas.ru и www.iai.rssi.ru. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 198095, Санкт Петербург, ул. Ивана Черных, д.31-33, лит А.

Автореферат разослан

« ___ » _____ 2016г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор физико математических наук

А.Л. Буляница

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В последнее десятилетие произошло активное внедрение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в лабораторную и диагностическую практику. Благодаря своей скорости, высокой специфичности и чувствительности он получил широкое применение в первую очередь в клинической диагностике. Появление флуоресцентных методов детекции накопления продуктов ПЦР в процессе реакции (ПЦР в реальном времени, ПЦР-РВ) открыло дополнительные преимущества в использовании ПЦР-анализа, в частности, возможность количественной оценки содержания молекул нуклеиновых кислот в исследуемом образце.

Для проведения ПЦР-РВ используют специальные приборы, способные одновременно осуществлять термостатирование образцов с быстрыми переходами между температурами по заданной программе и регистрацию сигналов флуоресценции образцов на заданных длинах волн, соответствующих применяемым флуоресцентным красителям. К приборам такого класса можно отнести модели «iQ5», CFX96 («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралия), «StepOne» (Applied Biosystems, США), DT-48, DT-96 (НПФ ДНК-Технологии, Россия) и АНК-32 (ИАП РАН, Россия).

Важнейшая роль в составе таких анализаторов отводится аппаратным и программным средствам, образующим аппаратно-программные комплексы анализаторов нуклеиновых кислот (АПК АНК). АПК АНК позволяют обеспечить полную автоматизацию управления процессом ПЦР, автоматизацию измерения сигналов флуоресценции и анализа кинетики происходящей реакции, реализовать эффективные методы обработки данных для достижения высоких аналитических характеристик приборных комплексов и осуществлять непрерывный контроль работоспособности технических средств.

Как правило, АПК каждого производителя – это закрытые системы, обладающие как аппаратным, так и программным ноу-хау, дополнительно защищенные целой серией патентов. К тому же, методы анализа ДНК быстро и постоянно развиваются, что в свою очередь требует непрерывного и быстрого совершенствования АПК. Совершенствованию аппаратной части служит постоянно развивающаяся элементная база, особенно в части микроконтроллеров и силовых элементов управления. Стремительное развитие информационных технологий так же предоставляет новые возможности для формирования информационной среды поддержки АПК.

Учитывая стратегическую важность указанных приборов, в Институте аналитического приборостроения Российской академии наук была разработана серия АПК АНК - специализированных приборов для экспресс анализа нуклеиновых кислот: АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64, Нанофор -05.

В результате для создания собственных АПК АНК потребовалось разработать собственные подходы к проектированию аппаратной части и к построению программного обеспечения АПК АНК, что и определило актуальность темы диссертации.

Целью работы является развитие научно практических основ создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ.

Для достижения указанной цели в работе ставились и решались следующие задачи:

1. Провести экспериментальные исследования с целью определения правил задания рабочих параметров теплового блока (амплификатора).
2. Осуществить синтез оптимального алгоритма первичной обработки сигнала флуоресценции по критерию максимума апостериорной плотности вероятности.
3. Разработать проблемно ориентированный язык (ПОЯ) управления экспериментом и автоматный язык (АЯ) управления аппаратной частью.
4. Усовершенствовать алгоритмы вторичной обработки сигналов для многокомпонентного количественного и качественного анализа ПЦР-РВ.
5. Создать программное обеспечение для комплекса аналитических приборов - анализаторов нуклеиновых кислот, на методе полимеразной цепной реакции (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64, АНК-96).
6. Внедрить разработанный комплекс приборов в научные и практические генетические исследования.

Методы исследования. Теоретические и практические исследования базируются на комплексном использовании положений математической статистики, теории обнаружения и оценивания стохастических сигналов, линейной алгебры, теории вероятностей, теории конечных автоматов, теории взаимодействия открытых систем, методов системного и функционального анализа, функционального и объектно-ориентированного программирования и проектирования, имитационного моделирования, структурно-функционального описания аппаратуры.

Научная новизна работы состоит в развитии научно практических основ создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ, что имеет важное народнохозяйственное значение. В результате исследований автором получены следующие основные научные результаты:

1. Впервые экспериментально исследованы тепловые характеристики амплификатора на элементах Пельтье при проведении ПЦР-РВ для пробирок объемом 0.2 мл (фирма "Ахуген", PCR-0.2D-C).
2. Синтезирован оптимальный алгоритм первичной обработки сигнала флуоресценции ПЦР, при котором оценка является несмещенной, а ее дисперсия уменьшается с ростом интенсивности сигнала. Разработанный алгоритм непосредственно определяет устройство его реализующее и оценивает погрешность его работы.
3. Впервые предложен классификатор кинетических кривых на основе анализа первой производной, введены критерий наличия роста и признак аномальности.
4. Установлено, что для аппроксимации кинетической кривой на экспоненциальном участке лучше всего подходит цензурированная сигмовидная функция.

Положения выносимые на защиту:

1. При использовании пробирок объемом 0.2 мл (фирма "Axygen", PCR-0.2D-C) для получения достоверных результатов количественного анализа ПЦР необходимо обеспечивать скорость их нагрева/охлаждения не более 2°C
2. Несмещенные эффективные оценки сигналов флуоресценции могут быть получены в результате обработки интегратором или фильтром низких частот.
3. Критерием наличия реакции является отношение максимума производной к среднеквадратичному отклонению амплитуды шумов производной, рассчитанных с 5 по 10 цикл. Достоверным критерием является значение отношения больше 5.
4. Использование автоматного языка (АЯ) при реализации алгоритма управления прибором сокращает время разработки более чем в 3 раза.

Практическая значимость работы

Проведенные исследования позволили уточнить механизм тепловых процессов амплификации в приборах АНК. Установлены параметры режимов питания элементов Пельтье в режиме нагрева и охлаждения, что позволило увеличить скорость нагрева в 2 раза, а охлаждения в 1.2 раза. Общее время амплификации при этом сократилось на 10–15 мин.

Показано, что увеличение скорости нагрева более 2 °C/c (+/-0.1 °C/c) приводит к большому значению распределения температур в реакционной смеси (больше 10 °C), тем самым, ухудшая качество проведения ПЦР-реакций.

Разработанные алгоритмы первичной и вторичной обработки сигналов легли в основу программного обеспечения для серийно выпускаемых приборов серии АНК.

Разделение алгоритмов управления на ПОЯ и АЯ повысило надежность работы АНК и позволило использовать одно и тоже ПО для различных типов приборов.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались в 1999 – 2016 годах на научных семинарах ИАП РАН (г. Санкт-Петербург), Университета ИТМО (г. Санкт-Петербург), СПб ГУАП (г. Санкт-Петербург), ВНИИСБ (г. Москва) и на международном конгрессе "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" Конгресс-2015 (симпозиум С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине».

Реализация результатов работы и внедрение

Теоретические и практические результаты, полученные в диссертационной работе, использованы в научно-исследовательских и опытно-конструкторских работах, проводимых в ИАП РАН и ЗАО «СИНТОЛ».

Приоритет разработок защищен тремя патентами.

Разработаны и внедрены в серийное производство АПК приборов серии АНК (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64).

Результаты работы использованы в учебных лекционных курсах, которые читаются автором в СПбГУ ИТМО.

Приборы АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64 успешно используются в биологических, химических, экологических, генетических научных и производственных лабораториях, а также лабораториях СЭС, МО РФ и клинических лабораториях поликлиник и больниц.

Результаты диссертационной работы были полностью использованы при разработке высокопроизводительного анализатора с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований (АНК-96). Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификационный номер ПНИЭР RFMEFI60714X0095).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 17 печатных работ, среди которых 11 статей в изданиях, включенных в список ВАК РФ.

Личный вклад автора.

Автором сформулированы цели и задачи исследований, осуществлены теоретические и экспериментальные исследования. Проводилось руководство коллективом разработчиков программных средств в части планирования работ и проведения разработки АПК АНК, включая личное участие в отработке алгоритмов управления АПК АНК, в создании и тестировании алгоритмов обработки. Подготовка публикаций проводилась совместно с соавторами.

Структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы. Работа изложена на 112 страницах текста, содержит 41 рисунок, 12 таблиц, список литературы включает 68 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введение обоснованы актуальность темы диссертации, приведены цель и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость результатов выполненной работы, перечислены научные положения, выносимые на защиту, отражен личный вклад автора.



Рис.1 - Общая схема прибора для проведения ПЦР-РВ

Первая глава состоит из 8 разделов и посвящена анализу современного состояния АПК ПЦР-РВ.

В разделе 1.1 приведена общая схема прибора для проведения ПЦР-РВ (Рис.1). Дан краткий сводный обзор технических параметров на основе анализа 28 моделей приборов. Выделены основные характеристики приборов: скорость нагрева/охлаждения теплового блока образцов, число пробирок в блоке образцов, число каналов регистрации (длин волн регистрации флуоресценции) и время регистрации.

В разделе 1.2 приведен принцип действий «анализатора нуклеиновых кислот». Дано

определение кинетических кривых как данных получаемых в результате проведения ПЦР-РВ.

В разделе 1.3 перечислены возможности программного обеспечения серийных приборов ПЦР-РВ [1]. Сформулирована задача разработки ПО для приборов АНК, разрабатываемых в ИАП РАН.

В разделе 1.4 перечислены основные направления совершенствования АПК для проведения ПЦР-РВ, это:

- 1) увеличение количества одновременно анализируемых образцов;
- 2) увеличение скорости изменения температуры при амплификации;
- 3) увеличение числа каналов флуоресцентной детекции;
- 4) совершенствование алгоритмов управления работой прибора;
- 5) совершенствование алгоритмов обработки результатов;
- 6) совершенствование пользовательского интерфейса и интеграции в лабораторные измерительные системы.

В разделе 1.5 приведены перспективы разработки новых приборов ПЦР-РВ. Отмечено, что существенным недостатком приборов для ПЦР-РВ западного производства, ограничивающим их широкое внедрение в массовую практику, является их высокая цена, закрытость АПК в плане алгоритмов управления и обработки, ограничение на использование фирменных реагентов и расходных материалов кругом производителей.

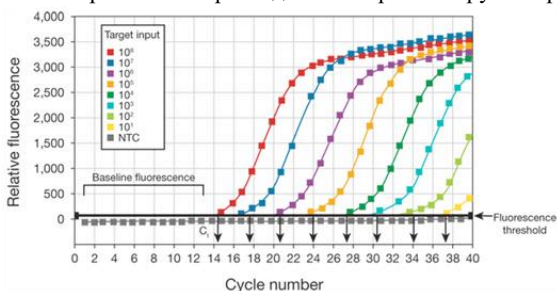


Рис. 2 Кинетические кривые ПЦР-РВ, расчет пороговых циклов с использованием горизонтальной линии – порога.

В разделе 1.6 описаны базовые алгоритмы обработки данных [2]. Описаны три стадии в кинетической кривой: базовая линия (стадия инициации, когда ПЦР-продукты еще не детектируются флуоресцентной меткой), экспоненциальная стадия (в которой наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции от цикла ПЦР), плато (стадия насыщения). Даны определения эффективности реакции амплификации как множителя и порогового цикла, как параметра, пропорционального логарифму исходного количества молекул НК в пробе. Приведен список базовых алгоритмов с кратким описанием их работы. Приведен обзор использования модельных функций [3].

В разделе 1.7 приведена детальная формулировка цели и задач исследования.

В разделе 1.8 сформулированы выводы по главе 1.

Вторая глава состоит из 4 разделов и посвящена исследованию тепловых режимов амплификации при проведении ПЦР на приборах серии АНК.

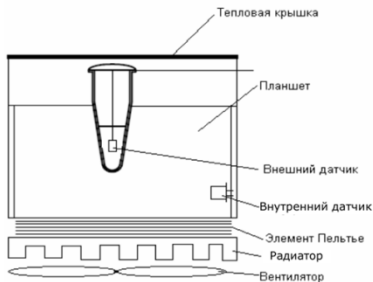


Рис. 3 - Модель теплового блока

В разделе 2.1 приведено описание эксперимента по исследованию тепловых режимов. Представлена математическая модель теплового блока на основе элемента Пельтье [4]. Приведены графики скорости нагрева и охлаждения по лученные по двум датчикам: первый – температура планшета, второй – температура в пробирке, в

зависимости от напряжения (мощности) на элементе Пельтье.

В разделе 2.2 оценено время установления температуры в пробирке. Получены рабочие параметры работы элементов Пельтье при нагреве и охлаждении. Получено расчетное значение постоянной времени установления температуры для пробирки равное 12 сек.

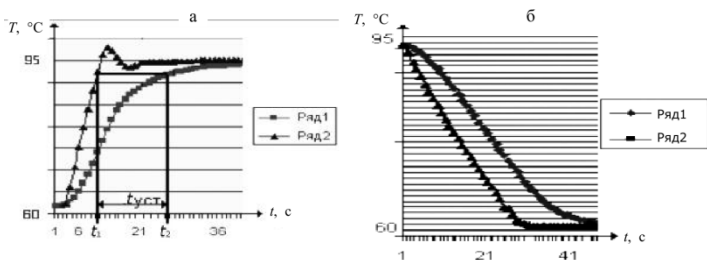


Рис. 4 - Графики зависимости температуры от времени, а- нагрев, б - охлаждение .

Ряд 1 — показания внешнего датчика, ряд 2 — показания внутреннего датчика

В разделе 2.3 проведена оценка разброса температуры в пробирке с реакционной смесью, то есть разность температуры планшета и реакционной смеси в зависимости от скорости нагрева/охлаждения.

В разделе 2.4 приведены выводы, что из-за большой разности температур реакционной смеси в пробирке и планшета для образцов при больших скоростях нагрева/охлаждения получается большой разброс по температуре в пробирке с реакционной смесью, для компенсации которого приходится давать задержку равную постоянной времени для пробирки при проведение количественных измерений. таким образом, для пробирок объемом 0.2 мл (фирма "Axygen", PCR-0.2D-C) не рекомендуется использовать скорости нагрева/охлаждения более 2°C.

Третья глава состоит из 3 разделов и посвящена синтезу алгоритма фильтрации первичной обработки сигнала флуоресценции данных ПЦР-РВ.

В разделе 3.1 приведено утверждение, что характер шумов сигнала флуоресценции не определен в силу сложности процессов флуоресценции от исследуемых образцов. Принята гипотеза о равномерном распределении амплитуды шумов. А для оценки сигнала

флуоресценции использована оценка на основе максимума апостериорной плотности вероятности. Такая оценка параметра θ требует определения максимума по θ от $\ln \{P(k/\theta)\}$ [5,6]:

$$\max_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^m k_i \ln[\mu_i(\theta) + \mu_{\phi}] - \int_0^{\tau} n(t, \theta) dt + \ln p(\theta) \right\}, \quad (1)$$

где $k = \{k_1, k_2, \dots, k_m\}$ – вектор фотоотсчетов ФЭУ, соответствующий последовательности фотоотсчетов на интервале $(0; \tau)$, μ_i – коэффициент усиления ФЭУ, μ_{ϕ} – средний отсчет фонового шума ФЭУ на интервале, $n(t, \theta)$ – фоновый шум.

Для равномерно распределенной априорной плотности вероятностей $\ln p(\theta) = \text{const}$, решение уравнения (1) можно записать так:

$$\hat{\theta}_{\max} = \frac{1}{n_c \tau} \sum_{i=1}^m k_i - n_{\phi} / n_c. \quad (2)$$

Таким образом, аналитически получено, что устройство оценки по методу максимальной апостериорной плотности вероятностей должно суммировать (интегрировать) отсчеты на интервале $(0, \tau)$ в соответствии с выражением (2).

В разделе 3.2 приведены математическое ожидание и дисперсия оценки.

$$m_1(\hat{\theta}_{\max}) = \left\{ m_1 \left[\frac{1}{n_c \tau} \sum_{i=1}^m k_i \right] - \frac{n_{\phi}}{n_c} \right\} = \frac{m_1(\theta) n_c \tau + n_{\phi} \tau}{n_c \tau} - \frac{n_{\phi} \tau}{n_c} \quad M_2(\hat{\theta}_{\max}) = \frac{1}{2 n_c \tau} + \frac{n_{\phi}}{n_c^2 \tau} \quad (3)$$

Нетрудно видеть, что $m_1(\hat{\theta}_{\max}) = m_1(\theta)$, т.е. оценка является несмещенной, причем $m_1(\hat{\theta}_{\max}) = 1/2$. Таким образом, способность оценивать интенсивность импульсов флуоресцентного излучения может быть улучшена обработкой максимально возможной интенсивности флуоресценции продуктов ПЦР, а также увеличением интервала выборки фотоотсчетов $(0; \tau)$. При $n_c \tau \rightarrow \infty$ дисперсия оценки стремится к нулю и оценка приближается к истинному значению параметра.

В разделе 3.3. на основе анализа полученных оценок сформулированы утверждения: для реализации алгоритма первичной обработки (оценивания) сигнала флуоресценции необходимо соблюдение условий:

период дискретизации отсчетов должен быть много меньше периода изменения сигнала флуоресценции;

для получения оценки достаточно построить фильтр низких частот для выборки отсчетов сигналов флуоресценции.

В результате работы был синтезирован оптимальный алгоритм первичной обработки сигнала флуоресценции ПЦР, при котором оценка является несмещенной, а ее дисперсия уменьшается с ростом интенсивности сигнала. Разработанный алгоритм непосредственно определил устройство его реализующее как интегратор.

Четвертая глава состоит из 3 разделов и посвящена реализации алгоритмов управления на основе создания проблемно ориентированного языка описания эксперимента и создания автоматного языка управления прибором.

В разделе 4.1 приведена реализация алгоритма управления по схеме, когда для описания эксперимента используется специально разработанный проблемно-ориентированный язык (ПОЯ), а для управления аппаратурой – специально разработанный автоматный язык (АЯ). Приведено определение ПОЯ как языка программирования, сфокусированный на определенной предметной области и содержащий элементы (слова), отражающие абстракции именно этой предметной области [7]. По набору слов ПОЯ соответствует моделям (функциональным, информационным, поведенческим и структурным) АПК. К проблемно ориентированному набору слов могут быть добавлены структуры управления (циклы, условия, переходы). Проблемно-ориентированный язык разрабатывают эксперты-методисты и конечные пользователи, как разработчики поведенческих моделей АПК. Приведена реализация ПОЯ при описании сценария работы анализатора:

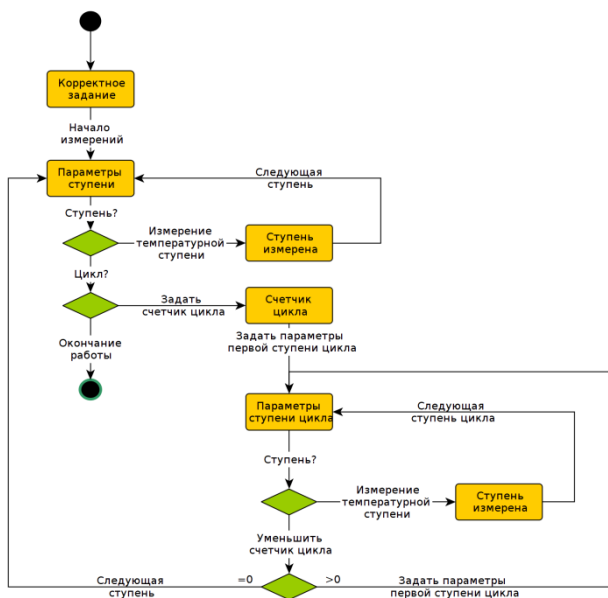


Рис. 2. – Алгоритм для реализации ПОЯ в виде блок-схемы

Ступень 1: Денатурация,
 $T=95^{\circ}\text{C}$, $t=300$ сек,
 каналы:R6G, ROX, FAM,
 Су5;

Цикл: 40 повторов.

Ступень 1: Отжиг,
 $T=60^{\circ}\text{C}$, $t=40$ сек,
 каналы:R6G, ROX, FAM,
 Су5;

Ступень 2: Элонгация,
 $T=72^{\circ}\text{C}$, $t=15$ сек,
 каналы:R6G, ROX, FAM,
 Су5;

Ступень 3: Денатурация,
 $T=95^{\circ}\text{C}$, $t=15$ сек,
 каналы:R6G, ROX, FAM,
 Су5;

Конец цикла

Определен АЯ как язык программирования, сфокусированный на работе аппаратуры и содержащий слова, соответствующие функциям, реализуемым в аппаратной части прибора. Автоматный язык призваны разрабатывать инженеры-конструкторы и технологи-программисты, участвующие в разработке аппаратной части комплекса.

Приведена реализация АЯ для АПК АНК (Табл. 1 и Рис. 3).

Табл. 1 – Алгоритм работы прибора АНК в виде последовательного списка исполняемых функций:



№	Описание функции алгоритма
1	Включить тепловой блок
2	Включить оптический блок
3	Задать температуру 95°C
4	Ждать стабилизации температуры
5	Установить канал регистрации FAM
6	Запустить регистрацию данных
7	Получить данные по образцам
8	Установить канал регистрации R6G
161	Задать температуру 95°C
162	Ждать стабилизации температуры
2116	Выключить оптический блок
2114	Выключить тепловой блок

Рис. 3 - Блок схема АЯ

В разделе 4.2 приведено сравнение алгоритмов работы конечного автомата для ПОЯ и для АЯ. Первое, что бросается в глаза, при сравнении ПОЯ и АЯ – это семантический разрыв в описании одно и того же алгоритма работы прибора:

- ПОЯ написан экспертом-методистом ПЦР лаборатории, то есть конечным пользователем прибора.
- АЯ написан инженером-разработчиком с точки зрения работы составных блоков анализатора.

Во-вторых, очевидно, что конечный автомат АЯ имеет более простую структуру, меньшее число состояний и переходов. К тому же в нем отсутствуют переходы с условиями, что упрощает алгоритм работы, повышает надежность работы алгоритма. Главное отличие реализации АЯ в том, что команды управления аппаратурой можно чередовать в произвольном порядке и менять параметры (например, температуры) по любому правилу. Все эти изменения будут касаться только входного алфавита предложенного автомата, но не самого автомата. Попытка изменить параметры, в случае ПОЯ, потребует изменения входного алфавита и, что самое существенное, реализации конечного автомата, что приведет к еще большему усложнению алгоритма работы КА-распознавателя ПОЯ, а, следовательно, и аппаратуры, если делать аппаратную реализацию данного КА.

Таким образом:

- ПОЯ: “простой” алфавит - “сложный” автомат.
- АЯ: “сложный” алфавит - “простой” автомат.

Предлагаемый подход позволяет совместить оба подхода, взяв простоту входного алфавита ПОЯ и простоту конечного автомата АЯ:

- ПОЯ - является естественным для конечного пользователя.
- АЯ - является естественным для аппаратуры.
- КА распознавателя ПОЯ – осуществляет преобразование одного заданного алфавита (ПОЯ) в другой (АЯ), так же заранее определенный.

Дополнительно учтем, что для корректной работы прибора алгоритм работы должен быть реализован в микроконтроллере, что требует обязательно тестирования во всех необходимых режимах работы и не позволяет быстро добавлять новые схемы или комбинации. Подход на основе АЯ лишен этого недостатка, так как все схемы работы реализуются как входной алфавит конечного автомата, а функций перехода значительно меньше, чем вариантов схем анализов. Однако предлагаемый подход требует реализации КА-интерпретатора, позволяющего переходить от описания на ПОЯ к исполнению АЯ. Но эта задача не требует модернизации встроенного ПО прибора, а касается только ПО, разворачиваемого на компьютере.

В разделе 4.3 приведены выводы.

В результате реализация алгоритма управления на основе предлагаемой схемы:

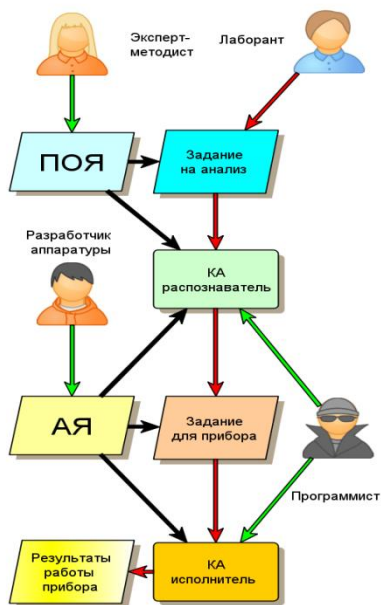


Рис. 5 – Общая схема эксперимента

- 1) создан проблемно ориентированный язык управления экспериментом;
- 2) произведена оптимизация работы оборудования за счет сокращения числа функций управления;
- 3) повышена надежности работы АПК за счет исключения циклических процедур из алгоритма работы аппаратуры;
- 4) сокращено время разработки аппаратной части за счет упрощения алгоритмов работы, уменьшения числа функций;
- 5) сокращено время тестирования алгоритмов, за счет отсутствия длительных циклических встроенных процедур;
- 6) предоставлена возможность работы с моделью АПК;
- 7) разработана общая схема эксперимента, с разделением зон ответственности участников разработки АПК.

Реализация ПОЯ позволила проводить полностью автоматизированные генетические исследования, на примере внедренной в практику тест-системы «Амплитуб» для быстрой диагностики туберкулеза, в том числе с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ, ШЛУ-ТБ).

Полностью описываемая схема была реализована при разработке высокопроизводительного анализатора с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований (АНК-96). Разработка программного обеспечения показала, что время разработки и отладки встроенного ПО анализатора было сокращено в три раза по сравнению с аналогичным временем при создании АНК-32. Был ощутимо сокращен набор тестов для проверки работоспособности различных схем проведения анализа.

Пятая глава состоит из 6 разделов и посвящена исследованию алгоритмов вторичной обработки. Задача создания программного обеспечения для новых приборов приводит к необходимости критически проанализировать применяемые базовые алгоритмы, определить их состав и границы применимости и по результатам исследования, при необходимости, усовершенствовать для получения корректных результатов вторичной обработки.

Были проведены исследования возможностей известных алгоритмов вторичной обработки:

- уменьшения шумов, фильтрации, сглаживания кинетических кривых без потери информационной составляющей о ходе реакции;
- учета базовой линии, вклад в которую дают аппаратные особенности канала регистрации, фон и температурный дрейф;
- аппроксимации кинетической кривой модельными функциями;
- учета взаимного влияния каналов регистрации в случае многокомпонентного анализа.

Впервые для реализации автоматической вторичной разработки ставится задача классификации кинетических кривых для обнаружения наличия реакции и выбора наилучшего алгоритма определения параметров реакции.

В разделе 5.1 рассмотрена эффективность фильтрации сигналов ПЦР-РВ. Проведено исследование алгоритмов фильтрации шумов, предложены показатели эффективности фильтрации, произведена оценка погрешности и изучено влияние фильтрации на погрешность расчета пороговых циклов.

Наилучшим фильтром по совокупности признаков: минимума искажений, максимума отношения сигнал/шум является фильтр Савицкого-Голея с параметрами окна 5 точек. Показано, что при увеличении уровня шума происходит приблизительно линейное увеличение значения стандартного отклонения пороговых циклов. Полученные результаты позволяют пользователю выбрать объем реактивов в пробирках при количественных анализах ПЦР на основе критериев: допустимого уровня шума и допустимой погрешности измерения. Например, при максимальной амплитуде шума 12.5 о.е. и сигнале 1000 о.е. стандартное отклонение S имеет приблизительно величину 0.02 или 2 % порогового цикла. Примерно

такие результаты получаются при реальных анализах ПЦР с объемом реактивов 23 мкл и объемом пробы 2 мкл.

В разделе 5.2 рассмотрена классификация кривых для дальнейшего автоматического анализа. Классификация кинетической кривой осуществляется на основе анализа первой производной. Координата максимума первой производной позволяет аналитически выделить участок инициализации, участок экспоненциального роста, участок насыщения (плато). Введено количественное определение признака наличия реакции как отношение максимума производной к стандартному отклонению амплитуды шумов производной, рассчитанных на 5 - 10 цикла. При значениях отношения больше 5 устойчиво классифицировались кинетические кривые. Отличие значения от 3 (правило 3σ для нормально распределённой случайной величины) обусловлено возрастанием амплитуды шумов при дифференцировании. На основе анализа формы кривой введен признак аномальности кривой равный отношению полуширин пика максимума производной. При значениях отношения более 1.5 кривая является аномальной из-за наличия явно выраженного дрейфа в районе плато.

В разделе 5.3 рассмотрено исследование особенностей количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Анализировались различные способы расчета порогового цикла при оценке кривых касательными, аппроксимации модельной функцией. Проведено исследование погрешности расчета порогового цикла от положения пороговой линии. Оценка погрешности измерения выполнялась путем расчета значений стандартного отклонения S пороговых циклов. Приведены условия проведения ПЦР в реальном времени на анализаторах АНК-32 и АНК-64 и выполнено экспериментальное сравнение погрешностей методов расчета пороговых циклов путем вычисления стандартного отклонения. Показано, что погрешности расчета пороговых циклов, вычисленных методом на базе S-образной функции, а также методами порога и точки перегиба на уровне 500 о.е., имеют наименьшие значения.

В разделе 5.4 рассмотрен выбор модельной функции при аппроксимации кинетических кривых ПЦР-РВ. На этапе исследования поиск параметров модельных функций (МФ) осуществлялся с помощью электронной таблицы Excel.

Для тестирования были выбраны функции:

МФС S-образной функция (Сигмоидная)

$$Y = 1 / (1 + \exp((C0 - C) / k)), \quad (1)$$

где Y – сигнал флуоресценции, C – номер цикла, $C0$, k — коэффициенты, определяемые из аппроксимации кинетической кривой уравнением 1;

МФЭ Модельная функция эффективности

$$y_{i+1} = E_{ci} * y_i$$

$$E_{ci+1} = E_{c0} - y_i * (E_{ci} - 1) / ((y_i - 1) * (E_{ci} - 1) * b + 1), \quad (2)$$

где E_{ci} – значение эффективности реакции на i –цикле, y_i – значение сигнала флуоресценции на i –цикле, b – коэффициент определяемый из аппроксимации кинетической кривой уравнением 2;

МФК Модельная функция с учетом процессов на основе уравнения диффузии

$$\begin{aligned}
 c_i &= \ln(1 + y_i * Re / p_i) * p_i / Re \\
 y_{i+1} &= y_i + c_i & p_{i+1} &= p_i - c_i,
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

где y_i – значение сигнала флуоресценции на i –цикле, c_i – концентрация продукта, выработанного на i –цикле, p_i – концентрация трифосфатов на i –цикле, Re – коэффициент диффузии определяемый из аппроксимации кинетической кривой уравнением 3;

МФБ Логистическая кривая на основе степенной функции

$$Y = 1 / (1 + (y_0 - 1)E^{c-n}), \tag{4}$$

где Y – сигнал флуоресценции, n – номер цикла, y_0 , E с — коэффициенты, определяемые из аппроксимации кинетической кривой уравнением 4.

Все модельные функции тестировались на одном входном наборе данных ПЦР-РВ. Фон учитывался в качестве параметра аппроксимации в виде константы Для критерия качества аппроксимации были построены разностные кривые исходных данных и модельной функции.

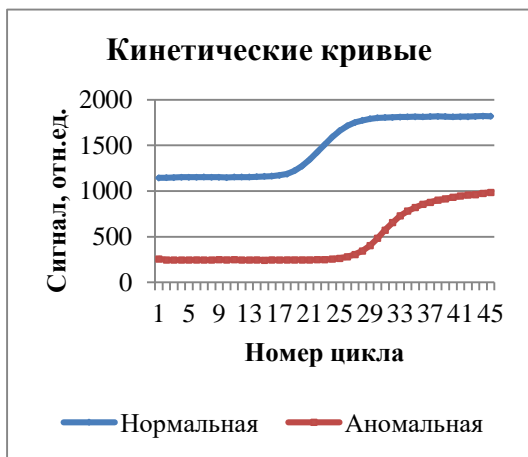


Рис. 6 – Реальные кинетические кривые для выбора модельной функции

Для аппроксимации реальных данных у каждой модельной функции были добавлены два параметра A_{mp} – амплитуда флуоресценции и BG нулевая линия.

В качестве параметра качества аппроксимации был выбран коэффициент детерминации

Табл. 2 - Коэффициент детерминации аппроксимации модельными функциями на 1 - 31 циклах

Тип кривой	МФК	МФС	МФЭ	МФБ
Нормальная	0,99415	0,99985	0,99534	0,99808
Аномальная	0,99682	0,99972	0,99891	0,99974

В табл. 2 представлены значения коэффициента детерминации для различных модельных функций, рассчитанные на 1 -31 циклах.

В результате **сравнения модельных функций** получено, что

Реальные данные ПЦР ни одна из моделей не аппроксимирует без ошибок в районе насыщения (плато).

МФС и МФБ хорошо аппроксимируют кинетические кривые до точки перегиба, показав при этом лучшие результаты с наименьшими значениями коэффициента детерминации.

Все модельные функции являются исключительно нелинейными, что требует применения специальных алгоритмов оптимизации. Для практической реализации был выбран алгоритм Левенберга — Марквардта решения задачи о наименьших квадратах.

В разделе 5.5 рассмотрено поведение цензурируемой усовершенствованной модельной функции на основе сигмоидальной функции (УМФС). Под усовершенствованной подразумевается МФС с добавленными линейным и квадратичным коэффициентами, описывающими дрейф базовой линии. Проведено исследование влияния дрейфа базовой линии на расчет порогового цикла с использованием УМФС. Установлено, что влияние дрейфа практически полностью компенсируется алгоритмом. Цензурируемость функции достигается за счет ограничения участка кинетической кривой для аппроксимации. Координаты участка определяются при классификации кинетических кривых по анализу первой производной как $[C_0-10, C_0+3]$, где C_0 — координата максимума. Величина стандартного отклонения пороговых циклов при этом уменьшается на 20%. Показана возможность полной автоматизации вычислений пороговых циклов сигналов ПЦР-РВ.

В разделе 5.6 рассмотрено исследование особенностей многокомпонентного анализа НК. Предложен алгоритм построения многокомпонентных модельных сигналов. Предложен способ компенсации помех от соседних спектральных каналов. Для этого введено понятие компенсационных коэффициентов, которые используются при аппроксимации комбинаций многокомпонентных сигналов однокомпонентными сигналами. Предложен способ автоматического определения коэффициентов матрицы пересвета для восстановления однокомпонентных сигналов. Приведен пример определения этих коэффициентов при аппроксимации трехкомпонентных сигналов.

В разделе 5.7 представлены выводы по 5 главе:

1. Для реализации базовых алгоритмов фильтрации были выбраны: скользящее среднее значение по 3 точкам, фильтр Савицкого—Голея по 5 точкам и медианный фильтр по 3 точкам.

2. Для расчета первой производной кинетической прямой было выбрано полиномиальное дифференцирование по Савицкому—Голею.

3. Были предложены оригинальные алгоритмы классификации кинетических кривых на основе анализа первой производной, что позволило упростить автоматический анализ и получить первичное оценивание кривых, достаточное для проведения качественного ПЦР-анализа.

4. Были реализованы алгоритмы аппроксимации модельными функциями методом оптимизации Левенберга — Марквардта для функций сигмоида, каноническая, упрощенная (степенная).

5. Было предложено использовать результаты аппроксимации модельными функциями для оценки кинетических кривых: расчет порогового цикла и эффективности реакции.

6. Впервые для расчета базовой линии был использован полином второй степени совместно с модельной функцией.

7. Впервые был использован алгоритм расчета матрицы перекрестного влияния каналов регистрации на основе модельной функции, что позволило практически полностью компенсировать перекрестное влияние каналов для каждого образца при многокомпонентном анализе.

8. При исследовании алгоритмов был выработан базовый набор алгоритмов математической обработки кинетических кривых, который был реализован в версиях программного обеспечения для приборов серии АНК, выпускаемых ИАП РАН.

Шестая глава состоит из 2 разделов и посвящена описанию результатов внедрения. Представлены фотографии разработанных приборов. Описано развитие версий ПО АПК АНК от первой к четвертой.

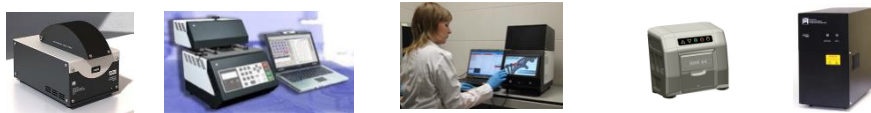


Рис.7 - Серия приборов АНК: АНК-4, АНК-32, АНК-48, АНК-64, АНК-96

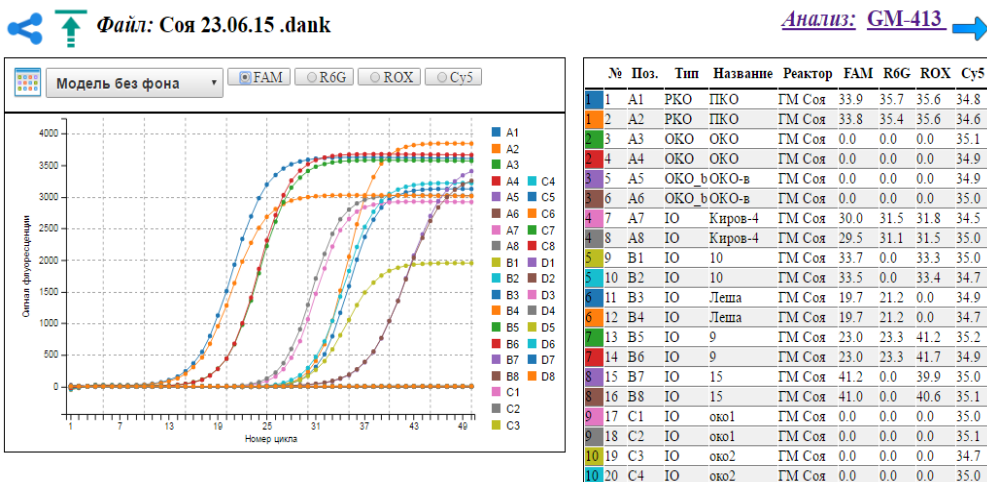


Рис. 8 – Результат работы ПО, расчет пороговых циклов

Заключение

Полученные результаты позволили развить научно практические основы создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ.

Практическая реализация позволила предоставить в распоряжение исследователей и практиков современные многофункциональные приборы для генетических исследований, позволяющие создавать новые методики измерений и обработки результатов анализа нуклеиновых кислот.

Основные результаты работы.

1. Экспериментально установлены правила определения рабочих параметров (мощность подводимая к элементу Пельтье и время задержки перед началом измерений) тепловых блоков приборов АНК.

2. Осуществлен синтез оптимального алгоритма первичной обработки сигнала флуоресценции для оптического блока приборов АНК.

3. Создан проблемно ориентированный язык управления экспериментом и автоматный язык управления аппаратной частью прибора АНК.

4. Разработаны алгоритмы вторичной обработки сигналов для многокомпонентного количественного и качественного анализа ПЦР-РВ.

5. Создано четыре версии программного обеспечения для комплекса аналитических приборов - анализаторов нуклеиновых кислот, на методе ПЦР-РВ (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64 и АНК-96).

6. Разработанные программно аппаратные комплексы успешно используются более чем в 300 приборах АНК для биологических, химических, экологических, генетических научных и производственных лабораторий, а также в лабораториях СЭС, МО РФ и клинических лабораториях поликлиник и больниц.

В перспективе предполагается внедрение разработанных приборов в лабораторные информационно-измерительные системы (ЛИИС). Такие системы обычно представляют собой объединение различных диагностических приборов в частности биохимических, иммунологических и генетических анализаторов при решении общих диагностических целей. Получаемые при этом данные требуют новые способы обработки и интерпретации результатов диагностики.

Список цитируемой литературы

1. Pabinger S., A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data [Текст] / S. Pabinger, S. Rödiger, A. Kriegner, K. Vierlinger, A. Weinhäuse // Biomolecular Detection and Quantification. – 2014. - Vol. 1. - P. 23–33.
2. Larinov A., A standard curve based method for relative real time PCR data processing / A. Larinov, A. Krause, W. Miller [Электронный ресурс] // BMC Bioinformatics. – 2005. - 6:62. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/6/62>
3. Rutledge R.G. A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR / R.G. Rutledge, D. Stewart

[Электронный ресурс] // BMC Biotechnology. - 2008.- 8:47. – Режим доступа: www.biomedcentral.com/1472-6750/8/47.

4. Чернышев А.В. Создание теории рабочих процессов, методов расчета и разработка оборудования для ПЦР-диагностики: автореф. дис. д-ра техн. наук. 05.11.17 [Текст] / А.В. Чернышев; – МГТУ им Н.Э. Баумана. - М., 2006.
5. Тихонов В.И. Статистический анализ и синтез радиотехнических устройств и систем [Текст]: учеб. пособие для вузов / В.И. Тихонов, В.Н. Харисов. – М.: Радио и связь, 1991. – 608 с.
6. Гальярди Р.М. Оптическая связь [Текст]: пер. с англ. С.М.Бабия, под ред.А.Г.Шереметьева / Р.М. Гальярди, Ш. Карп – М.: Связь, 1978. - 423с.
7. Васильев С. С. Об использовании в программировании проблемно-ориентированных языков [Текст] / С. С. Васильев, В. Б. Новосельцев //Известия Томского политехнического университета. Выпуск № 5 /2008 Т.313. С. 68-71.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Пат. 2304277 Российская Федерация, МПК G01N 21/63. Устройство для одновременного контроля в1 реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты [Текст] / Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., **Петров А.И.**, Петряков А.О., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В.; патентообладатели: Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., **Петров А.И.**, Петряков А.О., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В , - заявл. 23.06.2005; опубл. 10.08.2007.
2. Пат. 2418289 Российская Федерация, МПК G01N 21/64. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты [Текст] / Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Богданов В.М., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., **Петров А.И.**, Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Сочивко Д.Г., Чернышев А.В., патентообладатель: «Учреждение Российской академии наук Институт аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН)», - заявл. 25.11.2009; опубл. 10.05.2011.
3. Пат. на полезную модель 110864 Российская Федерация, МПК G01N 21/64. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты [Текст] / Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Богданов В.М., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., **Петров А.И.**, Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Сочивко Д.Г., Чернышев А.В., патентообладатель: ЗАО «Синтол», - заявл. 31.10.2011; опубл. 10.07.2012.
4. Абсолютное определение сверхмалых количеств днк в пробе методом пцр в реальном времени [Текст] / Я.И. Алексеев, В.Е. Курочкин, К.А. Благодатских, Д.Г. Сочивко, А.А. Федоров, Д.Г. Петров, А.И. Петров, И.В. Чубинский-Надеждин [Электронный ресурс] //Научные труды конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в

- биологии и медицине" Конгресс-2015 (симпозиум С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине». - С. 215-216. – Режим доступа: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=215
5. Высокпроизводительный анализатор с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований / В.Е. Курочкин, Ю.В. Белов, С.В. Коновалов, А.И. Петров [Электронный ресурс] // Научные труды конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" Конгресс-2015 (симпозиум С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине». - С. 240-241. – Режим доступа: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=240
 6. Информационная система для лабораторий генетического анализа / В.Е. Курочкин, Ю.В. Белов, А.И. Петров, К.С. Сычев [Электронный ресурс] // Научные труды конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" Конгресс-2015 (симпозиум С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине». - С.241-243. – Режим доступа: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=241
 7. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [Текст] / Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракшин Н.Ф., **Петров А.И.**, Петряков А.О., Румянцев Д.А. Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В.. // Научное приборостроение. - 2006. - Т. 16. № 3. с. 132-136.
 8. Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени [Текст] / Ю.В. Белов, В.В. Лавров, В.Е. Курочкин, **А.И. Петров** // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21. - № 1. - С. 44–49.
 9. Изучение влияния шумов детектора на погрешности количественных анализов нуклеиновых кислот на приборах ПЦР-РВ [Текст] / Ю.В. Белов, В.В. Лавров, В.Е. Курочкин, **А.И. Петров** // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21. - № 2. - С. 27–33.
 10. Оптимизация параметров сигмоидальной функции при моделировании сигналов ПЦР в реальном времени [Текст] / Ю.В. Белов, В.В. Лавров, В.Е. Курочкин, **А.И. Петров** // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21. - № 3. - С. 130–134.
 11. Белов Ю.В. Исследование погрешностей моделирования сигмоидальной функцией сигналов полимеразной цепной реакции в реальном времени [Текст] / Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин, **А.И. Петров** // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21, - № 4 - С 28-34.
 12. Белов Ю. В. Двухкомпонентный количественный ПЦР-анализ [Текст] / Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин, **А.И. Петров** // Научное приборостроение. - 2012. - Т. 22. - № 4. - С 72-76.
 13. Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК [Текст] / Я. И. Алексеев, Ю. В. Белов, О. П. Малоченко, Ю. А. Монахова, А. Н. Натыров, В. А. Орехов, С. В.

- Коновалов, В. Е. Курочкин, **А. И. Петров** // Научное приборостроение. - 2012. - Т. 22. - № 4. - С 86-92.
14. Белов Ю. В. Многокомпонентный количественный ПЦР-анализ [Текст] / Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин, **А.И. Петров** // Научное приборостроение. - 2013. - Т. 23.- № 2. - С 5-8.
15. Коррекция базовой линии сигналов флуоресцентного детектора генетического анализатора [Текст] / Ю. В. Белов, И. А. Леонтьев, **А. И. Петров**, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. - 2013. - Т. 23. - № 2. – С. 9-13.
16. Построение калибровочной линии при фрагментном анализе ДНК [Текст] / Ю. В. Белов, И. А. Леонтьев, В. В. Панчук, **А. И. Петров**, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. - 2013. - Т. 23. - № 3. – С. 26-31.
17. **Петров А. И.** Переход от проблемно-ориентированного языка к автоматному при проектировании аналитических приборов [Текст] / **А. И. Петров** // Научное приборостроение. – 2016. – Т. 26.- № 2. - С. 82–92.