

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе

д.т.н., проф., Е.А. Крук



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения»

на диссертационную работу **Петрова Александра Ивановича** «Исследование и практическая реализация программно-аппаратных средств проведения полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 - «Приборы и методы экспериментальной физики»

Полимеразная цепная реакция – это оригинальный современный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.

Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять молекулярно биологические исследования и, как следствие, медицинскую диагностику на качественно новый уровень. В диссертационной работе автор решает, несомненно, **актуальную** задачу по исследованию и практической реализации программно-аппаратных средств проведения полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени. К тому же, методы анализа ДНК быстро и постоянно развиваются, что в свою очередь требует непрерывного и быстрого совершенствования аппаратно программных комплексов. 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 АНК, что весьма благоприятно сказывается на развитии методов анализа ДНК.

Практическая значимость работы состоит в том, что на основе теоретических и практических результатов, полученных в диссертационной работе, разработаны и внедрены в серийное производство АПК приборов серии АНК (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64). 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).

Новизна работы состоит в том, что:

- Предложены научно практические основы создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ
- Впервые экспериментально исследованы тепловые характеристики амплификатора на элементах Пельтье при проведении ПЦР-РВ для пробирок объемом 0.2 мл (фирма "Axygen", PCR-0.2D-C).
- 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.
- Впервые предложен классификатор кинетических кривых на основе анализа первой производной, введены критерий наличия роста и признак аномальности.
- Установлено, что для аппроксимации кинетической кривой на экспоненциальном участке лучше всего подходит цензурированная сигмоидная функция.

Достоверность положений диссертационной работы подтверждается практическим использованием полученных результатов при проведении, начиная с 2006г., в НИИ Фтизиопульмонологии Первого МГМУ им.

И.М.Сеченова совместно с ЗАО «Синтол» скрининга более 2000 клинических образцов культур МБТ из 25 регионов Российской Федерации. Процент МЛУ-МБТ штаммов (к рифампицину и изониазиду), полученных от впервые выявленных пациентов, составил 21,9%, а процент МЛУ-МБТ штаммов, полученных от ранее леченных больных, был 58,5%. Совпадение результатов с данными микробиологического анализа составило 94%. В рамках мониторинга был проведен молекулярно-генетический анализ диапазона и частоты встречаемости различных кодонов и мутаций в генах МБТ, ответственных за устойчивость к рифампицину и изониазиду. В 2007г. проведены клинические испытания наборов по определению устойчивости к рифампицину и изониазиду. В 2008-2009гг. проведена апробация наборов по определению устойчивости к препаратам резервного ряда (фторхинолонам, капреомицину, амикацину). В ЗАО «Синтол» г. Москва успешно выпускаются тест-системы «ГМО Детект», которые позволяют обнаружить все зарегистрированные в России линии ГМО растительного происхождения. Тест системы адаптированы на использование аппаратных и программных средств, разработанных по результатам диссертационного исследования.

Результаты работы и защищаемые положения прошли апробацию на трех российских и международных конференциях. Автором опубликовано по теме диссертации 17 печатных работ, среди которых 11 статей в изданиях, включенных в список ВАК РФ, также автором было получено три патента. Публикации соискателя полностью отражают содержание диссертационной работы и подтверждают его **личный вклад** в проведенные исследования.

Диссертация посвящена научным исследованиям в области моделировании физических явлений и процессов, а также разработки и созданию устройств для экспериментальных исследований в различных областях, что соответствует формуле специальности 01.04.01, «Приборы и методы экспериментальной физики».

Работа состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы. Работа изложена на 112 страницах текста, содержит 41 рисунок, 12 таблиц, список литературы с общим числом ссылок 68.

Во введении обосновывается актуальность темы, приведена цель и задачи исследования, указана 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 конференции, где были сделаны доклады по тематике работы.

Первая глава посвящена анализу современного состояния АПК ПЦР-РВ. Приведена общая схема прибора для проведения ПЦР-РВ. Рассмотрен

принцип действия анализатора нуклеиновых кислот. Приведен состав программного обеспечения приборов ПЦР-РВ. Выделены основные направления совершенствования АПК ПЦР-РВ. Сформулированы перспективы разработки новых приборов. Рассмотрены алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ. Сформулированы цель и задачи диссертационного исследования.

Вторая глава посвящена исследованию тепловых режимов амплификации при проведении ПЦР на приборах серии АНК. Оценены время установления температуры в пробирке, разность температуры планшета и реакционной смеси в зависимости от скорости нагрева/охлаждения. Получены рабочие параметры работы элементов Пельтье при нагреве и охлаждении.

Третья глава посвящена синтезу алгоритма первичной обработки данных на основе максимума апостериорной плотности вероятности. 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.

Четвертая глава посвящена реализации алгоритмов управления на основе создания проблемно ориентированного языка описания эксперимента и создания автоматного языка управления прибором. ПОЯ построен на основе методических указаний конечных пользователей. Проведен переход от ПОЯ к АЯ. Разработан конечный автомат-исполнитель, реализующий алгоритмы работы прибора. Приведены результаты реализации алгоритмов и сформулированы выводы.

Пятая глава посвящена исследованию алгоритмов вторичной обработки. Проведено исследование алгоритмов фильтрации шумов, предложена оценка эффективности фильтрации, произведена оценка погрешности и изучено влияние фильтрации на погрешность расчета пороговых циклов. Предложены критерии классификации кинетических кривых на основе анализа первой производной. Исследованы особенности аппроксимации кинетических кривых модельными функциями. Проведено сравнение аппроксимации различными модельными функциями, изучено влияние дрейфа базовой линии на погрешности моделирования сигмоидной функции. Исследована возможность определения значения порогового цикла из параметров аппроксимации. Исследованы особенности многокомпонентного анализа ПЦР-РВ. Был выработан базовый набор алгоритмов математической обработки кинетических кривых, который был использован при реализации программного обеспечения для приборов серии АНК, выпускаемых ИАП РАН. Сформулированы выводы.

Шестая глава посвящена описанию внедрения результатов работы. Описано развитие версий ПО АПК АНК от первой к четвертой.

В заключении приведены перспективы развития данного направления и сформулированы результаты и выводы диссертационного исследования.

В целом диссертация написана хорошим языком, содержит необходимое количество рисунков и таблиц, иллюстрирующих полученные данные, Автореферат диссертационной работы полностью отражает ее содержание.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы в ней обнаружен ряд недостатков:

1. В разделе «1.7 Детальная формулировка цели и задач исследования» задачи исследований почти полностью совпадает с задачами исследований, приведенными во Введении.
2. Вызывает сомнение необходимость применения термина «цензурированная сигмоидная функция».
3. Не совсем понятно, в каких разделах находится описание решения задач исследований «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)» и «6. Внедрить разработанный комплекс приборов в научные и практические генетические исследования».
4. В разделе 6.1 автор ограничился очень кратким описанием разработанного и внедренного оборудования.
5. Отсутствуют некоторые ссылки на литературу, например, [59].

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не опровергают научной новизны или значимости результатов исследования, а также состоятельности защищаемых положений.

Диссертация является самостоятельной завершенной научно-исследовательской квалификационной работой, посвященной разработке новых программно-аппаратных комплексов, совершенствованию способов обработки и интерпретации результатов исследований с быстрым внедрением в практическое поле деятельности. Тема и содержание диссертационной работы полностью соответствует выбранной специальности 01.04,01 — «Приборы и методы экспериментальной физики»,

Полученные автором результаты представляют практический интерес и могут быть использованы в организациях выполняющих работы и проводящих исследования в рамках Приоритетных направлений развития науки, технологии и техники РФ. К таким организациям относятся: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (г. Москва), Федеральное государственное учреждение науки «Институт биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук» (г. Пущино), Федеральное государственное унитарное предприятие «Экспериментальный завод научного приборостроения со специальным конструкторским бюро Российской академии наук» (г. Черноголовка), акционерное общество

«Научные приборы» (г. Санкт-Петербург).

По научной новизне, актуальности, объему и обоснованности научных результатов диссертационная работа Петрова Александра Ивановича полностью отвечает всем требованиям ВАК РФ, изложенным в п.9. Положения ВАК РФ «О присуждении ученых степеней», (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г, № 842), а ее автор, Петров Александр Иванович, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики».

Диссертационная работа доложена Петровым А.И. на научном семинаре Института Аналитического приборостроения Российской академии наук 17 сентября 2016 года.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Кафедры «Медицинской радиоэлектроники» Санкт-Петербургского государственного университета аэрокосмического приборостроения и утвержден протоколом № 11 от 24 ноября 2016 г.

Доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой Медицинской радиоэлектроники федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения.

190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 67, лит. А.

Тел./факс: (812) 494-70-24

Эл. почта: kvz_k41@aanet.ru


(К.В. Зайченко)
Зайченко Кирилл Вадимович

Кандидат технических наук, доцент, ученый секретарь кафедры медицинской радиоэлектроники федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения.

190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 67, лит. А.

Тел./факс: (812) 494-70-24

Эл. почта: kvz_k41@aanet.ru


(Л.А. Кулыгина)
Кулыгина Людмила Александровна



Подписи Зайченко К.В. и Кулыгиной Л.А. заверяю