ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.029.01 (Д002.034.01) НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИАП РАН), Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение Диссертационного совета от «10» марта 2023 г. № 3

о присуждении Петрову Дмитрию Григорьевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата технических наук.

Диссертация «Разработка экспериментальной установки для создания методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе» по специальности 1.3.2 (01.04.01) – Приборы и методы экспериментальной физики принята к защите 23.12.2022 г., протокол № 19/1 Диссертационным советом 24.1.029.01 (Д002.034.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН), 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д.31-33, лит.А, приказ 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель: Петров Дмитрий Григорьевич в 2012г. окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого» по направлению «Техническая физика». В 2015-2019 гг. соискатель проходил обучение в аспирантуре на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института аналитического приборостроения Российской академии наук» по специальности 03.06.01 «Физика и астрономия». В период подготовки диссертации соискатель Петров Дмитрий Григорьевич работал в должности заведующего сектором в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институте аналитического приборостроения Российской академии наук» в лаборатории методов и приборов иммунного и генетического анализа, на этой должности работает и в настоящее время.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институте аналитического приборостроения Российской академии наук», г. Санкт-Петербург.

Научный руководитель: Курочкин Владимир Ефимович - доктор технических наук, профессор, руководитель научного направления Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт аналитического приборостроения Российской академии наук», г. Санкт-Петербург.

Официальные оппоненты:

1) Чернышев Андрей Владимирович - доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Вакуумная и компрессорная техника», Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана. (г. Москва), представил на диссертацию и автореферат **положительный отзыв**, в котором содержатся следующие замечания:

1. В названии диссертации указано, что работа посвящена разработке экспериментальной установки для создания методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе. В чем заключается суть выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе не уточняется, и ответа на этот вопрос в работе я не нашел.
2. Работа по своей сути имеет очень важное прикладное значение, и ее результаты использованы в разработках ИЛП РАН, но в работе это не отражено. Не конкретизировано, что внедрено и нет формального акта внедрения результатов исследования.
3. В работе встречаются ошибки типа: «вязкости лизирующего реагента η = 0,9 спуаз, плотности лизирующего реагента ρ = 0,92 г/см» (стр.90). Размерность вязкости сПуаз – применяется в системе СГС! Размерность плотности указана с ошибкой. Далее подставляя эти значения в расчетную формулу, автор получает результат в миллиметрах. Встречаются выражения типа «… квадрат толщины пограничного слоя…» стр. 90. Или использование в одной формуле (7) на стр. 92 параметров в разных системах измерения (Си и СГС). Там же указывается – «это энергия на единицу площади … 1,2 -3,0 Вт/см^2). В ваттах измеряется мощность.
4. Глава 3 посвящена проведению комплекса экспериментальных исследований. Но в главе отсутствуют сведения о методах и данных обработки результатов.
5. Не понятно решена ли задача: п5. «Создание протоколов автоматического выделения НК [нуклеиновых кислот] с использованием разработанной установки...». В заключении этот результат не оговорен.

2) Ермолин Михаил Сергеевич - кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории геохимии наночастиц Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской Академии наук, представил на диссертацию и автореферат **положительный отзыв**, в котором содержатся следующие замечания:

1. Хотелось бы увидеть более четкое описание механизма взаимодействия НК с оксидом кремния. Непонятно, что имеется в виду под «экранированными межмолекулярными электростатическими взаимодействиями»? Может ли дегидратироваться поверхность оксида кремния, в котором по определению нет воды? Кроме того, приводит ли образование водородных связей к дегидратации молекул?
2. Данные, приведенные в таблице 2.1, показывают, что потери НК, связанные с их сорбцией на стенках картриджа, увеличиваются при снижении концентрации НК. Чем это можно объяснить? Предполагается ли работа с более низкими

концентрациями НК в пробах и не будут ли в данном случае потери НК на стенках картриджа еще больше?

3. В описании используемых материалов не приведены характеристики магнитных частиц, например, их размерное распределение. Являются ли они коммерчески доступными или синтезированы автором работы?

4. Как следует из описания стадии отмывки сорбента от остатков лизата, промывочный раствор после каждой стадии перекачивается обратно в исходную ячейку. Можно ли использовать дополнительную ячейку для слива отработанного промывочного раствора, что могло бы увеличить эффективность отмывки?

5. В разделе «Определение режимов дозирования и перемешивания реагентов для автоматического выделения НК» приведены скорости дозирования в двух размерностях мл/с и мл/мин. Какая размерность является верной? Может ли быть связано варьирование скорости дозирования реагентов (от 1.5 до 3.0 мл/с) не только с параметрами картриджа (диаметром каналов и типом материала), но и также с характеристиками реагентов, например, их плотности и вязкости?

6. С чем по мнению автора связано снижение выхода НК при увеличении температуры выше 70°С? Почему для сорбции ДНК под воздействием УЗ [ультразвука] была выбрана частота именно 2.65 МГц; использовали ли УЗ других частот?

7. В работе указывается, что эксперименты проводились в трех повторах, однако в таблицах отсутствуют данные, характеризующие разброс результатов, что важно при оценке полученных результатов. Также не хватает единообразия в использовании некоторых терминов, например, силикатная мембрана/стекловолоконная мембрана или элюция/элюирование. Кроме того, в работе присутствуют опечатки, а также грамматические и пунктуационные ошибки.

Ведущая организация Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институт биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук, г. Пущино, Московская область, **в своем положительном заключении**, утвержденном директором, доктором физико-математических наук Павлом Яковлевичем Грабарником, подписанном доктором биологических наук Евгением Анатольевичем Пермяковым, главным научным сотрудником Института биологического приборостроения с опытным производством Российской Академии наук, указала, что диссертация соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2, и отметила следующие замечания:

1. Требует дополнительного пояснения схема установки для проточного концентрирования нуклеиновых кислот в части вариантов применения для мониторинга объектов окружающей среды. Хотелось бы знать, какие варианты внешнего облика установки могут быть предложены автором.

2. Также в диссертации не хватает подробного описания способов подведения ультразвука к рабочей ячейке картриджа, а также обсуждения того, какие при этом существуют ограничения и какие способы преодоления может предложить автор.

Соискатель имеет **18 (восемнадцать)** работ, из них по теме диссертации **11 (одиннадцать)** опубликованных работ в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ и Международные библиометрические базы SCOPUS и/или Web of Sciences.

К наиболее значительным работам, отражающим основное содержание диссертации, относятся:

1. **Петров Д.Г.** Воздействие полей разной природы на выход ДНК при выделении из модельных растворов на двуокиси кремния. 1. Влияние температуры / Д.Г. Петров, Е.Д. Макарова, Н.А. Корнева, А.С. Альдекеева, Н.Н. Князьков // Научное приборостроение. – 2015. – Т. 25. – № 2. – С. 91-101.
2. **Петров Д.Г.** Разработка высокоэффективного метода выделения нуклеиновых кислот, на магнитных частицах / Д.Г. Петров, Н.Н. Князьков, Е.Д. Макарова, С.Н. Малышин, В.Е. Курочкин // Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина». – Москва. – 2015. – Т.1. – С. 99-100.
3. **Petrov D. G.** Analysis of the effectiveness of the stages of the concentration of genetic material / D. G. Petrov, I. E. Antifeev, N. N. Germash, E. D. Makarova // Journal of Physics: conference series. – 2019. – №033023. – P. 1400.
4. **Петров Д.Г.** Возможные пути создания автоматического прибора идентификации ПБА методом полимеразной цепной реакции / В.Е. Курочкин, Я.И. Алексеев, Д.Г. Петров, И.Е. Антифеев // Межучрежденческая конференция «Современные аспекты биологической защиты». – Киров. – Т.1. –С. 3-4.
5. **Петров Д.Г.** Воздействие полей разной природы на выход ДНК из модельных растворов на двуокиси кремния. Влияние ультразвука / Д.Г. Петров, Е.Д. Макарова, И.Е. Антифеев, А.В. Бродская, Н.Н. Константинова, С.Н. Малышин // Научное приборостроение. – 2017. – Т. 28. – № 4. – С. 40-55.
6. **Петров Д.Г.** Ультразвуковая суспензионная колонка для анализа mycobacteriumtuberculosis с использованием наноструктурированного магнитного сорбента / Р.Х. Дженлода, В.М. Шкинев, Д.Г. Петров, Б.Я. Спиваков // XIII Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии». – Севастополь. – Т.1. – С.43-45.
7. **Petrov D. G.** DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by PCR detection / R. Kh. Dzhenloda, V. M. Shkinev, B. Ya Spivakov // Mendeleev Communications. – 2017. – №27. – P. 302-303.
8. Flow sample preparation using standing wave ultrasound and magnetic fields in the determination of nucleic acids by real-time polymerase chain reaction [Text] / B. Ya. Spivakov, R. Kh. Dzhenloda, V. M. Shkinev, **D. G. Petrov** // 10th International Confe-

rence on Instrumental Methods of Analysis : Modern Trends and Application. – Heraklion. –№.1. – P.111.

9. **Петров Д.Г.** Методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток / Д.Г. Петров, Е.Д. Макарова, Н.Н. Гермаш. И.Е. Антифеев // Научное приборостроение. – 2019. – Т.29. – № 4. – С. 28-50.

10. **Петров Д.Г.** Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа: разработки ИАП РАН и ООО«Синтол» / В.Е. Курочкин, Я.И. Алексеев, Д.Г. Петров, А.А. Евстрапов // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2021. – Т. 40. – №3. – С. 69-74.

11. Заявка на изобретение RU2020135259A. Автоматизированный прибор для выделения, очистки и анализа нуклеиновых кислот методом ПЦР-РВ [Текст] / А.А. Евстрапов, **Д.Г. Петров**, Ю.В. Белов. А.А. Воробьев, А.А. Казанцев, И.Е. Антифеев,Н.А. Есикова, А.Н. Зубик, Н.Н. Гермаш Д.А. Белов; патентообладатель Минобороны России – RU 2020135259A; заявл.26.10.2020 опубл.26.04.2022.

На автореферат диссертации поступили следующие отзывы:

1. От Власовой Ольги Леонардовны, доктора физико-математических наук, доцента, директора высшей школы биомедицинских систем и технологий Санкт-Петербургского Политехнического университета им. Петра Великого

Замечания:

- В работе в недостаточно полном объеме освещен вопрос самого алгоритма разработки новой методики выделения НК, с чего он начинается, и какой результат новой методики выделения НК является приемлемым для дальнейшего анализа.

2. От Шилова Ильи Александровича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией анализа геномов Федерального государственного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии».

Замечания:

- Недостаточно подробно описаны разновидности проб, содержащих НК, которые пригодны для обработки на созданной установке.
- Какие существуют ограничивающие условия для применения мегагерцового ультразвука при выделении НК, какие существуют пути их преодоления.

3. От Дженлоды Рустама Харсановича, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории концентрирования Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской Академии наук

Отзыв без замечаний

4. От Никулина Артёма Валерьевича, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника, руководителя центра коллективного пользования

«Биотехнология» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии».

Отзыв без замечаний.

Все отзывы на автореферат диссертации положительные.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их большим опытом работы в областях биологии, физики, аналитической химии, приборостроения, медицинской биотехнологии, методов выделения и анализа различных химических соединений, что подтверждается публикациями, в которых рассматриваются вопросы, связанные с тематикой диссертационного исследования соискателя.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана экспериментальная установка, позволяющая создавать и апробировать методики выделения нуклеиновых кислот твердофазными методами в автоматическом режиме;

на разработанной экспериментальной установке **впервые показано** влияние изменения длительности отдельных стадий выделения НК на результат всей пробоподготовки;

определены условия проведения отдельных стадий автоматизированного выделения НК, что **позволяет** создавать новые и модифицировать действующие протоколы выделения НК с целью повышения эффективности пробоподготовки в целом;

разработанная экспериментальная установка была **дополнена** УЗ-модулем, что позволило провести выделение НК под воздействием УЗ (с частотой 2,65 МГц) в диапазоне интенсивностей от 1,2 до 3,0 Вт/см^2 с эффективностью выделения выше 85% без применения температурного воздействия;

впервые показано двадцатикратное по сравнению со стационарным режимом увеличение степени концентрирования НК с применением проточного метода выделения на магнитном сорбенте под воздействием УЗ.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что применительно к проблематике диссертации эффективно, с получением обладающих новизной результатов:

показано, что можно спрогнозировать, путем управления комплексом условий выделения НК, включающим длительность стадий, расход и интенсивность перемешивания реагентов, интенсивность температурного и ультразвукового воздействий результативность выделения и достичь более, чем 80%–го выхода ДНК;

продемонстрирована возможность выделения НК проточным способом под воздействием УЗ в условиях малых концентраций НК в пробе, при котором достигнуто многократное (до 20 раз) повышение степени концентрирования НК, в сравнении со стационарным режимом выделения;

при изменении рабочей температуры в ячейке в диапазоне от 20 до 90°С **выявлено** наличие нетривиального оптимума (максимума) эффективности выделения НК из жидких проб (около 70°С).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Они были использованы при разработке методик автоматического выделения НК для серийно выпускаемого Комплекса для выделения нуклеиновых кислот, принятого на снабжение Минобороны России и востребованного в рамках Гособоронзаказа. Также с помощью разработанной экспериментальной установки удалось существенно ускорить процесс создания методики автоматического выделения НК, используемого при работе Автоматизированного прибора для выделения, очистки и анализа нуклеиновых кислот методом ПЦР-РВ (Патент РФ RU 2784821 C2). Часть результатов диссертационного исследования, касающаяся проточного концентрирования НК и выделения под воздействием УЗ, позволила сформировать существенный научно-технический задел, необходимый при разработке устройств пробоподготовки ДНК/РНК для анализа методами ПЦР, ПЦР-РВ, секвенирования.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что научные положения, выводы и результаты, содержащиеся в диссертационной работе, подтверждаются использованием общеизвестных, апробированных и обоснованных физических методов, комплексным характером выполненных экспериментальных исследований и использованием лицензионных программных пакетов для обработки и анализа данных экспериментов. Достоверность экспериментальных данных также подтверждается использованием современного оборудования.

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на пяти международных конференциях (Армия 2018, Армия 2019, Армия 2020, Армия 2021, Экобалтика), 2-х всероссийских с международным участием (Физика-А 2018, Физика-А 2019), а также на межучрежденческих конференциях, проводимых Минобороны России.

Личный вклад соискателя заключается в следующем:

разработана экспериментальная установка, позволяющая создавать и апробировать методики выделения нуклеиновых кислот в автоматическом режиме;

определены экспериментальным путём режимы работы созданной установки;

проведены эксперименты по изучению влияния тепловых, УЗ полей, условий массообмена на эффективность выделения НК;

созданы и внедрены методики автоматизированного выделения НК на серийно выпускаемом приборе (Комплекс КВНК);
совместно с соавторами подготовлены к публикации статьи и другие результаты диссертационного исследования.

На заседании 10 марта 2023 года Диссертационный совет принял решение присудить Петрову Дмитрию Григорьевичу ученую степень кандидата технических наук.

Для проведения тайного голосования Диссертационный совет в количестве **14** человека, из них **14** докторов наук, участвовавших в заседании, из **21** человека входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту **0** человек, проголосовали: за – **14**, против – **нет**, недействительных бюллетеней – **нет**.

Зам. председателя
Диссертационного совета
д.ф.-м.н., профессор А.О. Голубок

Ученый секретарь
Диссертационного совета А.Л. Буляница
д.ф.-м.н.

Дата оформления заключения
10 марта 2023 г.
М.П.