

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Посмитной Яны Станиславовны на тему:

«РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики».

Представленная на рассмотрение диссертационная работа состоит из введения, 4-х глав, заключительного раздела, содержащего основные результаты и выводы, и приложений. Работа изложена на 177 страницах машинописного текста, включая 60 рисунков, 47 таблиц, содержит три приложения и список литературы из 163 наименований. По теме диссертации опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК; 10 работ опубликовано в сборниках трудов конференций и тезисов докладов. Публикации соответствуют тематике диссертационного исследования, отражают основное содержание диссертации и автореферата и позволяют судить о значимости научного вклада соискателя.

Диссертация Посмитной Я. С. посвящена развитию методов оперативного изготовления микрофлюидных устройств из полимерных материалов, предназначенных для использования в приборах для молекулярной диагностики с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофоретического разделения проб.

Актуальность темы диссертационной работы вытекает из потребности создания современных аналитических приборов на микрофлюидной платформе, позволяющих реализовать новые уникальные методы исследования биологических проб. Такие приборы являются востребованными не только при проведении научных исследований, но и для решения широкого круга задач при медицинской диагностике, в области биотехнологий, в фармакологии и экологии. В настоящее время проблемой

для широкого распространения приборов на микрофлюидных платформах является отсутствие «надежных» методов изготовления микрофлюидных чипов (МФЧ). Прежде всего, это относится к изготовлению прототипов МФЧ, используемых в научно-исследовательском процессе. Методы и технологии оперативного изготовления микрофлюидных чипов стремительно развиваются, так как позволяют за относительно короткий промежуток времени разрабатывать и создавать новые прогрессивные методики анализа биологических проб, в том числе, основанные на методах амплификации нуклеиновых кислот, электрофоретического разделения пробы и др. Важными требованиями, предъявляемыми к таким методам, являются их доступность в условиях исследовательских лабораторий, невысокий уровень затрат на изготовление прототипов (макетов) чипов и возможность применения различных материалов. Общепринятым и широко используемым методом изготовления микрочипов является метод «мягкой» литографии, обеспечивающий формирование микро- и наноструктур в полидиметилсилоксане (ПДМС). Однако и метод, и используемый при этом материал, имеют ряд недостатков, что затрудняет реализацию некоторых важных методик анализа биологических проб. Таким образом, диссертационная работа, посвященная разработке и созданию микрофлюидных устройств из полимерных материалов с применением усовершенствованных способов их оперативного изготовления, несомненно, является актуальной.

Базируясь на изучении и анализе методов, применяемых для изготовления полимерных микрофлюидных устройств и мастер-форм в условиях исследовательских лабораторий, автор формулирует *цель и задачи* диссертационной работы.

Методы исследований. При выполнении диссертационной работы автор использовала экспериментальные методы исследований, в том числе: методы спектрометрии, флуоресцентной спектроскопии, микроскопические и макроскопические тесты при измерении модуля упругости, методы

сканирующей ближнепольной, атомно-силовой и конфокальной лазерной микроскопии, оптической микроскопии, методы репликации микроструктур с применением шаблонов, методы капиллярного электрофореза и амплификации нуклеиновых кислот.

Достоверность основных положений и результатов диссертации подтверждается корректностью постановки задач, применением современных приборных средств и методик исследований, соответствием результатов работы и результатов, полученных другими методами и другими научными коллективами, а также литературным данным, воспроизводимостью результатов экспериментальных исследований.

Научная новизна диссертации состоит в обосновании, разработке и апробировании нового метода создания прототипов микрофлюидных чипов и других устройств, основанном на модифицированном методе «мягкой» литографии, заключающемся в сочетании технологий лазерной микрообработки и электролитно-плазменной полировки при изготовлении мастер-форм, а также использовании эластичных и эпоксидных материалов для репликации микроструктур. Данный метод позволяет существенно расширить возможности и снизить затраты на изготовление микроустройств.

Кроме того, к научной новизне работы следует отнести результаты, полученные при исследовании оптических и физико-механических свойств традиционных (ПДМС Sylgard® 184, Dow Corning, США) и новых материалов (Пентэласт®-712, ООО «Силиконовые Материалы», Россия; Lasil T-4, Dow Corning, США; Resine Epoxy R123, Soloplast Vosschemie, Франция; ПЭО-221К и ПЭО-510КЭ-20/0, СПбГТИ(ТУ), Россия) для микрофлюидных чипов, что позволило автору разработать рекомендации по применению этих материалов в устройствах с флуоресцентным детектированием.

Практическая значимость работы заключается в разработанных и апробированных конструкциях и новых способах изготовления мастер-форм и микрофлюидных чипов, позволяющих расширить как номенклатуру

применяемых материалов, так и возможности для создания новых методик для молекулярно-генетических исследований (с применением техники «капельной» микрофлюидики, методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот, методов ПЦР).

Оформление диссертационной работы. Работа написана хорошим техническим языком, построена логично, хорошо оформлена. Имеющиеся описки и терминологические неточности не затрудняют чтение и осмысление результатов работы. **Автореферат** отражает основное содержание диссертации.

Общая характеристика работы

Первая глава посвящена обзору исследований в области создания микрофлюидных устройств для молекулярной диагностики, изложены принципы и особенности «капельной» микрофлюидики, обсуждаются способы создания капель – макроэмульсий в МФЧ, рассмотрены материалы используемые в микрофлюидике, проведен анализ методов и способов изготовления микрочипов, а также контроля характеристик материалов. На основании обзора сформулированы цель и основные задачи диссертационного исследования.

Во второй главе описываются экспериментальные исследования характеристик материалов для МФЧ: ПДМС Sylgard® 184, Пентэласт®-712, Lasil T-4, КРЕОЛ, Resine Epoxy R123, ПЭО-221К и ПЭО-510КЭ-20/0. Приведены результаты исследований свойств полимерных материалов: оценки модуля упругости и смачивания поверхности. Рассмотрены методы и способы целевой модификации поверхности ПДМС Sylgard® 184 и стеклянных материалов. Приводятся данные, полученные при изучении светопропускания и флуоресценции полимерных материалов для МФЧ. Рассматриваются оценки уровня фоновой флуоресценции материалов на длинах волн возбуждения наиболее часто применяемых в молекулярной диагностике флуоресцентных меток. Представлены результаты проверки материалов на ингибирование ПЦР.

Третья глава посвящена исследованиям, связанным с модификацией метода «мягкой» литографии. Для продления ресурса исходной мастер-формы рассматриваются варианты применения «промежуточных» эластичных реплик с которых формируются шаблоны из эпоксидных компаундов. Альтернативой этого является применение металлических сплавов для мастер-форм и методов лазерной обработки. Описаны процедуры и представлены данные характеризующие тестовые образцы с микроструктурами из оптических эпоксидных клеев-компаундов отечественного производства. Анализируются результаты исследований точности и воспроизводимости размеров микроструктур мастер-форм из ПДМС, латуни, эпоксидных компаундов и получаемых с них реплик из ПДМС. Рассматриваются способы герметизации МФЧ: обработка соединяемых частей в растворе «пиранья» и высокочастотной плазмой в среде аргона или кислорода. Приводятся данные, полученные при проверке испаряемости буферного раствора из реакционной камеры МФЧ при температурном режиме изотермической амплификации.

В *четвертой главе* приводятся результаты апробации образцов МФЧ при амплификации нуклеиновых кислот (с применением метода изотермической амплификации и техники «капельной» микрофлюидики, а также метода ПЦР) и при разделении смеси нуклеиновых кислот на гибридном полимер-стеклянном микрочипе для электрофоретического разделения пробы (смеси олигонуклеотидов, меченных флуоресцентной меткой).

В *Заключении* представлены основные результаты диссертационной работы.

Приложения содержат дополнительные сведения о результатах экспериментальных исследований и предварительных расчетов.

Оценивая работу в целом, следует отметить обстоятельный обзор литературных источников по теме диссертации, высокий уровень владения методами экспериментальных исследований и современный подход при выполнении физического эксперимента, что характеризует автора как сложившегося научного работника.

Отмечая достаточно высокий уровень представленной диссертационной работы, следует сделать **ряд замечаний**:

1. В рассматриваемой работе просматривается некоторое несоответствие в названии, поставленной цели работы и полученной научной новизне:

Название: «Разработка микрофлюидных устройств из полимерных материалов для амплификации и разделения нуклеиновых кислот».

Цель работы: Разработка и апробация способов оперативного изготовления микрофлюидных устройств из полимерных материалов для методов молекулярной диагностики (амплификации и разделения нуклеиновых кислот).

Научная новизна:

- впервые произведен комплекс исследований оптических и физико-механических свойств материалов ...;

- ... впервые разработаны рекомендации по применению полимерных материалов в устройствах для обнаружения нуклеиновых кислот с флуоресцентным детектированием;

- предложены и обоснованы новые подходы при создании прототипов микрофлюидных чипов

- впервые показана возможность детектирования флуоресценции от отдельных микроэмульсий в транспортном потоке на микрофлюидном чипе, что обеспечивает высокопроизводительный анализ нуклеиновых кислот.

2. В раздел: Положения, выносимые на защиту, следовало бы добавить пункт:

«Новые микрофлюидные устройства из полимерных материалов для амплификации и разделения нуклеиновых кислот, созданные на основе разработанного метода оперативного изготовления».

3. В работе встречается некоторая терминологическая неточность:

- при описании процесса изготовления автор часто использует термины: «подход» при создании прототипов ..., «способы» оперативного изготовления

микрофлюидных устройств, а по сути в работе предлагается новая технология изготовления микрофлюидных устройств;

-автор часто использует термин: «оценка»: «оценка величин светопропускания», «оценка модуля упругости», «оценка смачивания поверхности» и т.д. Правильно было бы использовать термин – «измерение» или «исследование»;

-неудачно применен термин «необратимая» герметизация (стр. 123, абзац 2), в технике это называется: герметизация неразъемного соединения.

4. Автор указывает, что полученные при исследовании данные обрабатывались методами статической обработки результатов (стр. 8). Но в самой работе ни используемые методы, ни процесс статической обработки результатов не изложены.

5. Контроль герметичности микрофлюидного чипа производился оптическим методом исследования стыка на разделе полимер-полимер, то есть косвенным методом. Почему не применялся ни один из известных и широко используемых прямых методов контроля герметичности?

6. В Заключении приведены основные результаты выполненной диссертационной работы, но выполнение некоторых поставленных задач исследований не нашло отражения.

Общее заключение. Выполненный анализ материалов, представленных на оппонирование, позволяет утверждать, что диссертационная работа Посмитной Яны Станиславовны «Разработка микрофлюидных устройств из полимерных материалов для амплификации и разделения нуклеиновых кислот» соответствует паспорту специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики». Выводы по результатам работы обоснованы.

Диссертация Посмитной Яны Станиславовны является актуальной, целостной, самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей важное значение для создания современных аналитических методов исследований на основе микрофлюидной платформы и полностью удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о

присуждении ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, ред. от 28.08.2017 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Автор диссертации Посмитная Яна Станиславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики».

Официальный оппонент

доктор технических наук, профессор

Московского государственного технического

университета им. Н.Э. Баумана, кафедра

«Вакуумная и компрессорная техника»

Чернышев Андрей Владимирович

«07» декабря 2017 г

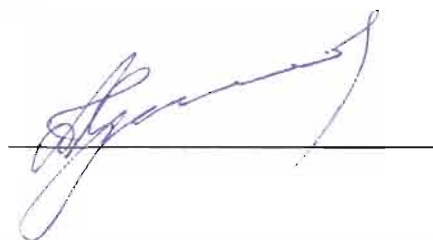
Телефон: +79165535752, +7(499)263-6743

e-mail, av-chernyshev@yandex.ru

Адрес: 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5

<http://www.bmstu.ru/>

E-mail: bauman@bmstu.ru



ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ

ЗАМ. НАЧАЛЬНИКА УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
НАЗАРОВА О. В.

ТЕЛ. 8-499-263-60-70