

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования

«Санкт Петербургский
государственный университет»,
д-р.т. н., профессор
С. В. Аплонов



23» ноября 2017 г.

Отзыв

ведущей организации о диссертации Посмитной Яны Станиславовны
«РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ
МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ»,

представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук
по специальности 01.04.01 – приборы и методы экспериментальной физики

Диссертационная работа Посмитной Яны Станиславовны посвящена одной из самых актуальных проблем - созданию и усовершенствованию устройств, обеспечивающих манипуляции с биологическими объектами и являющихся основой современных микроаналитических систем. Особое место при этом занимает разработка компактных, относительно недорогих, чувствительных и эффективных диагностических микрофлюидных устройств, предназначенных для экспресс-анализа биологических объектов. Такие устройства могут работать в условиях ограниченных ресурсов, они незаменимы для применения в клинической практике, в процессе контроля безопасности пищевых продуктов, при мониторинге окружающей среды и др. Как правило, в этих устройствах реализуются новые принципы и методики анализа биологических проб, отработка которых возможна в условиях исследовательских лабораторий. И в этом случае востребованными являются способы оперативного изготовления микрофлюидных устройств из недорогих полимерных материалов, на которых проверяются создаваемые методики.

Цель диссертационной работы Посмитной Я.С. заключалась в разработке и апробации способов оперативного изготовления микрофлюидных устройств из полимерных материалов для методов молекулярной диагностики (амплификации и разделения нуклеиновых кислот) при проведении биологических и медицинских

исследований. Отсюда следует несомненная актуальность выполненных в диссертационной работе исследований.

Структура и основное содержание работы

Диссертация состоит из Введения, четырех глав, Заключения, списка литературы, включающего 163 наименования. Текст диссертации изложен на 177 страницах, содержит 60 Рисунков, 47 Таблиц, 3 Приложения.

Во **Введении**, сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы актуальность темы диссертации, научная новизна и практическая значимость результатов работы, а также перечислены положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой обзор научной литературы по теме диссертации. Она содержит исчерпывающие сведения о современном состоянии исследований в развиваемой области и состоит из 7 разделов, в которых приведен краткий обзор значимых результатов в области создания микрофлюидных устройств, рассмотрены особенности «капельной» микрофлюидики, материалы и технологии, которые используются при создании таких устройств, проанализированы методы и способы изготовления микрофлюидных чипов (МФЧ), подробно рассмотрен метод «мягкой» литографии, проанализированы пути его развития, обсуждены способы целевой модификации поверхности чипов; приведены сведения о методах контроля характеристик материалов чипов при их модификации. Глава завершается формулировкой основных задач диссертационного исследования.

Вторая глава состоит из 4 разделов. Она посвящена экспериментальным исследованиям материалов для МФЧ, среди которых – материал, традиционно использующийся в микрофлюидике для макетирования устройств – полидиметилсилоксан (ПДМС) Sylgard® 184 (Dow Corning, США), а также альтернативные эластичные материалы: Пентэласт®-712 марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия), Lasil T-4 (Dow Corning, Германия), КРЕОЛ (ООО «СУРЭЛ», Россия), СКТН марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия). Кроме того, изучены эпоксидные компаунды: Resine Epoxy R123 (Soloplast VOSSCHEMIE, Франция), ПЭО-221К и ПЭО-510КЭ-20/0 (СПбГТИ(ТУ), Россия). При исследованиях применены методы спектрометрии и флуоресцентной спектроскопии; микроскопические и макроскопические способы измерения модуля упругости, методы сканирующей ближнепольной, атомно-силовой и конфокальной лазерной микроскопии; оптическая микроскопия; метод капиллярного электрофореза и метод амплификации нуклеиновых кислот. Рассмотрены методы модификации поверхности ПДМС Sylgard® 184 с целью создания функциональных групп для получения прочного и герметичного соединения между элементами чипа, обеспечения гидрофобности / гидрофильности поверхности и функциональных слоев для управления электроосмотическим потоком, представлены результаты проверки материалов на ингибирование полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Третья глава диссертации посвящена исследованиям, связанным с модификацией метода «мягкой» литографии. Рассмотрены способы получения «промежуточных» эластомерных реплик, которые затем используются для создания твердых мастер-форм из эпоксидных компаундов для продления ресурса мастер-формы из кремния и фоторезиста, а также применения металлических сплавов для мастер-формы, структуры в которой изготовлены

методами лазерной обработки. Особое внимание уделяется современным методам полировки металлической поверхности после лазерной обработки (электронно-лучевой, электролитно-плазменной, магнетронному напылению слоя хрома), позволяющим уменьшить шероховатость, сохранив при этом сформированные микроструктуры. Обсуждаются результаты исследований точности и воспроизводимости размеров тестовых микроструктур мастер-форм из латуни Л60, ЛС59-1, компаундов ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ, Resine R123 и получаемых от них реплик из ПДМС Sylgard® 184. Рассматриваются различные способы и методы герметизации МФЧ и приводятся данные, полученные при проверке испаряемости буферного раствора из реакционной камеры микрочипа при температурном режиме изотермической амплификации.

В четвертой главе приводятся результаты апробации МФЧ при создании термостабильных макроэмульсий, имитирующих ПЦР-смесь по составу, вязкости и рН. Обсуждаются результаты экспериментов по регистрации изотермической амплификации (по сигналу флуоресценции) в каплях, движущихся в транспортном потоке минерального масла. Анализируются данные, полученные при постановке ПЦР на МФЧ с реакционными камерами при обнаружении фрагмента кДНК гена GAPDH. Приведены результаты исследований по созданию гибридного МФЧ (ПДМС Sylgard® 184-стекло К8) для электрофоретического разделения пробы. Рассматриваются различные варианты обработки МФЧ, оказывающие влияние на электроосмотический поток. Электрофоретическое разделение пробы на МФЧ продемонстрировано на примере разделения смеси олигонуклеотидов, меченных флуоресцентной меткой.

В Заключении сформулированы основные результаты диссертационной работы. В трех **Приложениях** содержатся дополнительные сведения о результатах испытаний материалов и изготовленных в процессе выполнения работы образцов.

Основным результатом исследования явилось обоснование новых подходов к созданию прототипов микрофлюидных чипов, обеспечивающих возможность расширения ассортимента применяемых материалов, а следовательно – создание устройств с новыми свойствами, снижение затрат и сокращение времени изготовления микрочипов в лабораторных условиях.

Научная новизна работы заключается в разработке новых подходов к созданию прототипов микрофлюидных чипов, в модификации метода «мягкой» литографии, в обосновании перспективности применения отечественных эпоксидных компаундов и эластичных материалов в методах оперативного изготовления микрофлюидных устройств в условиях исследовательской лаборатории. Впервые показана возможность детектирования флуоресценции от отдельных макроэмульсий в транспортном потоке на микрофлюидном чипе.

Замечания

1. Несмотря на то, что в целом диссертация прекрасно оформлена и написана грамотно, в ней присутствуют не вполне удачные фразы. В частности, название первой главы диссертации «Литературный обзор» представляется не вполне корректным.

2. При исследовании жесткости материалов методом АСМ и при получении изображений не указано, были ли использованы разные образцы, приготовленные по одной методике, или исследования проводили путем выборочного сканирования поверхности одного образца.
3. К сожалению, в диссертации при оценке смачивания поверхности по измерению угла смачивания (глава 2, таблица 2.9) не приведены изображения, на основании которых эта оценка проводится. Каким образом помещалась капля на поверхность образца? Чем определяется погрешность определения угла смачивания (1-2%)? Сколько капель и на скольких образцах при этом проанализировано?
4. Из текста диссертации не ясно, осуществлялось ли термостатирование образцов при испытаниях, проведенных с использованием электрофореа на микрочипе?

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы.

Достоверность полученных данных определяется продуманным подбором информативных методов исследования, детальной разработкой подходов к решению задач диссертационного исследования, обоснованным выбором используемых материалов. Полученные результаты непротиворечивы, хорошо коррелируют с данными, представленными в литературе, и с результатами других исследователей. Полученные в работе результаты обсуждались на международных и российских научных конференциях, опубликованы в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Практическая и теоретическая значимость выполненного исследования

Предложен подход, позволяющий усовершенствовать метод «мягкой» литографии и заключающийся в использовании шаблонов (мастер-форм) из металлических сплавов, полученных методами лазерной микрообработки, что обеспечивает снижение времени и затрат на изготовление шаблона. Разработаны и изготовлены микрофлюидные чипы, предназначенные для амплификации нуклеиновых кислот, из полидиметилсилоксана с интегрированной полиолефиновой пленкой и пленкой циклоолефинового сополимера, пленки уменьшают испарение реакционной смеси из рабочей камеры микрочипа при ее нагреве и охлаждении до уровня, обеспечивающего проведение полимеразной цепной реакции. Предложен способ изготовления мастер-форм и микрофлюидных чипов для экспериментальных исследований (на примере реализации метода амплификации нуклеиновых кислот) из эпоксидных компаундов отечественного производства. Теоретическая значимость исследования заключается в расширении представлений о возможностях микрофлюидных технологий, о закономерностях формирования и особенностях применения различных материалов для анализа и разделения нуклеиновых кислот.

Рекомендации к использованию результатов работы

Полученные автором результаты работы могут быть использованы на предприятиях и в организациях, занимающихся разработкой и изготовлением микроустройств для биологических исследований (АО «Научные приборы», Санкт-Петербург; НПК «СИНТОЛ», Москва; ООО «Лазерный центр», Санкт-Петербург и др.), в научных лабораториях и высших учебных заведениях, использующих методы анализа нуклеиновых

кислот, проводящих биотехнологические разработки и готовящих специалистов в соответствующих областях: в Московском государственном университете, Санкт-Петербургском государственном университете, Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого, Институте фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского Федерального Университета, Санкт-Петербургском государственном университете информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО), Институте аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербургском национальном исследовательском академическом университете РАН (Академический Университет).

Оценка соответствия содержания диссертации специальности 01.04.01

В диссертационной работе Посмитной Я.С. представлены результаты исследований, позволяющие усовершенствовать методы, используемые при разработке и создании микрофлюидных устройств, являющихся ключевыми элементами новых приборов для экспериментальных исследований в физике, биологии и медицине. Представлены результаты комплексных исследований оптических, физико-механических свойств эластичных и твердых прозрачных полимерных материалов, которые могут использоваться при создании функциональных микроузлов для прототипов микрофлюидных чипов методами «мягкой» литографии, что существенно расширяет возможности данного метода. Разработаны и созданы экспериментальные образцы микрофлюидных чипов, на которых продемонстрирована возможность проведения амплификации нуклеиновых кислот и электрофоретического разделения смеси олигонуклеотидов.

На основании этого можно заключить, что диссертационная работа соответствует паспорту специальности «Приборы и методы экспериментальной физики» 01.04.01 по следующим пунктам:

1. Изучение физических явлений и процессов, которые могут быть использованы для создания принципиально новых приборов и методов экспериментальной физики.
2. Разработка и создание экспериментальных установок для проведения экспериментальных исследований в различных областях физики.

Заключение по диссертационной работе

Диссертационная работа Посмитной Яны Станиславовны «Разработка микрофлюидных устройств из полимерных материалов для амплификации и разделения нуклеиновых кислот» представляет собой законченное научное исследование по актуальной тематике, выполненное на высоком научном уровне. Основные положения диссертации отражены в публикациях автора в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ. Автореферат и научные публикации полностью отражают содержание диссертации. Совокупность полученных Посмитной Я.С. результатов, их апробация на международных и всероссийских конференциях, новизна, актуальность и практическая значимость проведенных исследований позволяют заключить, что диссертация отражает высокую квалификацию автора.

Диссертационная работа 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, представленным на

соискание ученой степени кандидата наук, а Посмитная Я. С. заслуживает присуждения ей степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – приборы и методы экспериментальной физики

Отзыв обсуждён и одобрен на заседании кафедры Молекулярной биофизики и физики полимеров 21 ноября 2017 г., протокол № 88.08/21-04-09

Доктор физико-математических наук,
профессор, профессор кафедры
Молекулярной биофизики и физики
полимеров

Касьяненко Нина Анатольевна

199034, Санкт-Петербург,
Университетская набережная 7–9
<http://spbu.ru>
+7 (812) 428–43–88; nkasyanenko@spbu.ru

Заведующий кафедрой Молекулярной
биофизики и физики полимеров,
доктор физико-математических наук,
профессор

Цветков Николай Викторович

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Санкт Петербургский
государственный университет»,

199034, Санкт-Петербург,
Университетская набережная 7–9
<http://spbu.ru>
+7 (812) 328–20–00, e-mail: spbu@spbu.ru

