

Заключение диссертационного совета МГУ.014.4
по диссертации на соискание ученой степени доктора наук
Решение диссертационного совета от «26» марта 2024 г. № 87
о присуждении Шляпникову Юрию Михайловичу, гражданину РФ,
ученой степени доктора химических наук.

Диссертация «Ультрасенситивные методы иммунохимического и гибридного анализа биомолекул с применением магнитных меток» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите диссертационным советом «19» декабря 2023 года, протокол № 85.

Соискатель Шляпников Юрий Михайлович, 1985 года рождения, в 2006 г. с отличием окончил Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». С 2006 по 2009 гг. Шляпников Ю.М. обучался в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В 2010 году защитил кандидатскую диссертацию «Разработка методов иммобилизации и детекции фрагментов ДНК на микрочипах» по специальности «биоорганическая химия» в диссертационном совете Д 501.001.41 при МГУ имени М.В. Ломоносова.

Соискатель с 2009 г. работает в Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) в лаборатории наноструктур и нанотехнологий, где и была выполнена представленная диссертационная работа. С 2018 г. по настоящее время является ведущим научным сотрудником с возложением обязанностей заведующего лабораторией наноструктур и нанотехнологий.

Официальные оппоненты:

Веселова Ирина Анатольевна

доцент, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования МГУ имени М.В. Ломоносова,

Дзантиев Борис Борисович

профессор, доктор химических наук, руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики, заведующий лабораторией иммунобиохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН),

Решетиллов Анатолий Николаевич

профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 47 опубликованных научных работ (без тезисов докладов), в том числе по теме диссертации 20 работ, из них 3 патента и 17 научных статей, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

Статьи в журналах 1-го квартиля

1. **Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. Improving immunoassay performance with cleavable blocking of microarrays // *Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 93(2). – P. 1126-1134. (Объём 0,5 п.л.). [JIF = 8.008]. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04175. Авторский вклад – 80%.
2. **Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Vinarov A.Z., Zamyatnin A.A. Jr., Shlyapnikova E.A. Can new immunoassay techniques improve bladder cancer diagnostics with protein biomarkers? // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – V. 7. – 620687. (Объём 0,2 п.л.). [JIF = 5.246]. doi: 10.3389/fmolb.2020.620687. Авторский вклад – 80%.
3. **Shlyapnikov Y.M.**, Kanev I.L., Shlyapnikova E.A. Rapid ultrasensitive gel-free immunoblotting with magnetic labels // *Analytical Chemistry*. – 2020. – V. 92(5). – P. 4146-4153. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 6.986]. doi: 10.1021/acs.analchem.0c00314. Авторский вклад – 80%.
4. **Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. Rapid amplification-free microarray-based ultrasensitive detection of DNA // *Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 91(17). – P. 11209-11214. (Объём 0,3 п.л.). [JIF = 6.35]. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02149. Авторский вклад – 80%.
5. **Shlyapnikov Y.M.**, Morozov V.N. Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels // *Analytica Chimica Acta*. – 2017. – V. 966. – P. 47-53. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 4.95]. doi: 10.1016/j.aca.2017.02.037. Авторский вклад – 80%.
6. **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Morozov V.N. Reversible and Irreversible Mechanical Damaging of Large Double-Stranded DNA upon Electrospraying // *Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 88(14). – P. 7295-7301. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 6.643]. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01642. Авторский вклад – 80%.
7. Mikheev A.Y., **Shlyapnikov Y.M.**, Kanev I.L., Avseenko A.V., Morozov V.N. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6 // *European Polymer Journal*. – 2016. – V. 75. – P. 317–328. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 3.743]. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2016.01.001. Авторский вклад – 30%.
8. **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Morozov V.N. Carboxymethylcellulose film as a substrate for microarray fabrication // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86(4). – P. 2082-2089. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 6.083]. doi: 10.1021/ac403604j. Авторский вклад – 80%.
9. Kanev I.L., Mikheev A.Y., **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Morozova T.Y., Morozov V.N. Are reactive oxygen species generated in electrospray in low currents? // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86(3). – P. 1511-1517. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 6.083]. doi: 10.1021/ac403129f. Авторский вклад – 30%.
10. Morozov V.N., Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., **Shlyapnikov Y.M.**, Nikitin M.P., Nikitin P.I., Nwabueze A.O., van Hoek M. Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances // *Journal of Aerosol Science*. – 2014. – V. 69. – P. 48-61. (Объём 0,7 п.л.). [JIF = 2.856]. doi: 10.1016/j.jaerosci.2013.12.003. Авторский вклад – 20%.
11. **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Simonova M.A., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Komaleva R.L., Grishin E.V., Morozov V.N. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84(13). – P.

5596-5603. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 6.179]. doi: 10.1021/ac300567f. Авторский вклад – 70%.

12. Morozov V.N., **Shlyapnikov Y.M.**, Kidd J., Morozova T.Ya., Shlyapnikova E.A. Conic electrophoretic concentrator for charged macromolecules // *Analytical Chemistry*. – 2011. – V.83(14). – P. 5548–5555. (Объём 0,4 п.л.). [JIF = 6.175]. doi: 10.1021/ac201146w. Авторский вклад – 70%.

Статьи в журналах 2-го квартiля

13. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А., Потолдыкова Н.В., Светочева Я.А., Винаров А.З., Зинченко Д.В., Зерний Е.Ю., Замятнин А.А. мл., Шляпникова Е.А. Неинвазивная диагностика рака почки с помощью ультрачувствительной иммунодетекции раково-сетчаточных антигенов // *Биохимия*. – 2022. – Т. 87(7). – С. 877-887. (Объём 0,7 п.л.). Авторский вклад – 70%. [**Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Potoldykova N.V., Svetocheva Y.A., Vinarov A.Z., Zinchenko D.V., Zernii E.Y., Zamiatnin A.A. Jr., Shlyapnikova E.A. Non-Invasive Diagnostics of Renal Cell Carcinoma Using Ultrasensitive Immunodetection of Cancer-Retina Antigens // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – V. 87(7). – P. 658-666 [JIF = 2.824]. doi: 10.1134/S0006297922070070.

14. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А., Винаров А.З., Потолдыкова Н.В., Владимиров В.И., Зерний Е.Ю., Замятнин А.А. мл., Шляпникова Е.А. Раково-сетчаточные антигены в моче больных раком мочевого пузыря и предстательной железы // *Биохимия*. – 2022. – Т. 87(11). – С. 1648-1658. (Объём 0,7 п.л.). Авторский вклад – 70%.

[**Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Vinarov A.Z., Potoldykova N.V., Vladimirov V.I., Zernii E.Y., Zamiatnin A.A. Jr., Shlyapnikova E.A. Cancer-Retina Antigens in the Urine of Bladder and Prostate Cancer Patients // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – V. 87(11). – P. 1268-1276 [JIF = 2.824]. doi: 10.1134/S0006297922110062.

15. Morozov V.N., Nikolaev A.A., **Shlyapnikov Y.M.**, Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Bagdasaryan T.R., Burmistrova I.A., Smirnova T.G., Andrievskaya I.Y., Larionova E.E. Nikitina I.Y., Lyadova I.V. Non-invasive approach to diagnosis of pulmonary tuberculosis using microdroplets collected from exhaled air // *Journal of Breath Research*. – 2018. – V. 12. – 036010. (Объём 0,8 п.л.). [JIF = 2.779]. doi: 10.1088/1752-7163/aab3f2. Авторский вклад – 60%.

16. Morozov V.N., Mikheev A.Y., **Shlyapnikov Y.M.**, Nikolaev A.A., Lyadova I.V. Non-invasive lung disease diagnostics from exhaled microdroplets of lung fluid: perspectives and technical challenges // *Journal of Breath Research*. – 2017. – V. 12. – 017103. (Объём 0,7 п.л.). [JIF = 2.779]. doi: 10.1088/1752-7163/aa88e4. Авторский вклад – 50%.

Статья в журнале 3-го квартiля

17. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А., Шляпникова Е.А. Быстрый метод иммуноблоттинга для определения фемтограммовых количеств белка // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2020. – Т. 169 (6). – С. 788-792. (Объём 0,2 п.л.). Авторский вклад – 80%.

[**Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. Rapid Detection of Femtogram Amounts of Protein by Gel-Free Immunoblot // *Bulletin of Experimental of Biology and Medicine*. – 2020. – V. 169(6). – P. 840-843. [JIF = 0.775]. doi: 10.1007/s10517-020-04988-2.

Патенты:

1. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А. Замятнин А.А., Зерний Е.Ю., Потолдыкова Н.В., Светочева Я.А., Винаров А.З., Шляпникова Е.А. Способ диагностики почечно-клеточной карциномы по наличию зрительных белков аррестина и рековерина в моче. Патент РФ № 2805811 от 24.10.2023. (Объём 0,2 п.л., вклад 70%).

2. Шляпникова Е.А., Королёв Д.О., Зерний Е.Ю., Савватеева Л.В., Замятнин А.А., Винаров А.З., Филиппов П.П., Балдин А.В., **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А. Способ ранней диагностики почечно-клеточной карциномы по наличию белка зрительного аррестина в сыворотке крови. Патент РФ № 2741245 от 21.01.2021. (Объём 0,2 п.л., вклад 70%).

3. Морозов В.Н., **Шляпников Ю.М.** Способ детекции аналита из раствора на частицах и устройство для его реализации. Патент РФ № 2528885 от 20.09.2014. (Объём 0,2 п.л., вклад 80%).

На автореферат диссертации поступило 5 дополнительных отзывов, все положительные. Выбор официальных оппонентов обусловлен их высокой компетентностью и наличием публикаций в области биотехнологии.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработан комплекс новых методов и оригинальных решений для проведения ультрачувствительного анализа биомакромолекул с применением магнитных меток, что крайне важно для биотехнологии и медицины, в частности, для улучшения ранней диагностики патологий человека. В работе разработаны новые способы повышения эффективности иммунохимического анализа, а также новые аналитические методики и тест-системы. Предложены новые оригинальные способы концентрирования белков, которые могут быть использованы при разработке новых биотехнологических процессов и в научной практике. Получены новые данные о механизме повреждения молекул ДНК при электрораспылении – методе, широко используемом в масс-спектрометрии, для получения ДНК-микрочипов и других целей. Внедрение систем нового типа в биомедицинскую технологию позволит расширить возможности рентабельных методов иммунохимического и гибридного анализа биомакромолекул и их использования для решения таких важных медицинских задач, как выявление и лечение инфекционных и онкологических заболеваний.

В результате проведённых исследований соискателем разработан универсальный набор методов ультрачувствительного анализа биомакромолекул и, таким образом, решены важные научно-технические задачи и предложены новые научно обоснованные технические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие биотехнологии.

Содержание диссертации полностью соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Трехстадийная методика проведения мультиплексного гетерофазного иммуноанализа и разработанная тест-система позволяют одновременно выявлять пять бактериальных токсинов с пределом обнаружения до 0.1 пг/мл (1фМ) при времени анализа не более 10 минут в образцах сложного состава без предварительной (или минимальной) подготовки проб. Ошибку измерения концентрации при определении фемтограммовых количеств аналита можно значительно уменьшить за счет введения внутренней нормировки сигнала.

2. Ультрочувствительный иммуноанализ на микрочипах с применением магнитных меток позволяет проводить бесконтактную диагностику туберкулёза лёгких по специфическим биомаркерам, содержащимся в собранных на фильтрах пробах выдыхаемого больным воздуха. Наночипы из нейлона, изготовленные методом электрораспыления с газовой фазой нейтрализацией, обладают высокой фильтрующей способностью за счёт образования калиброванных пор.

3. Новый способ мультиплексного ультрочувствительного гибридного анализа фрагментов ДНК на микрочипах с использованием магнитных меток позволяет достичь предела обнаружения 0,1 фМ и сократить время анализа до 5 минут. Установлено, что механизм повреждения длинных молекул ДНК при электрораспылении связан с их гидродинамическим разрывом в ускоряющемся потоке вблизи поверхности конуса Тейлора.

4. Новое низкоадгезивное покрытие для микрочипов на стеклянной основе из термически сшитой карбоксиметилцеллюлозы обеспечивает эффективную детекцию сигнала магнитными метками. Такие микрочипы могут быть использованы в автоматических анализаторах.

5. Блокирование поверхности микрочипов химически расщепляемым блокирующим агентом, содержащим перфторацильную группу, позволяет повысить эффективность иммуноанализа за счёт улучшения массопереноса аналитов из объема к поверхности микрочипа и уменьшения фонового сигнала, обеспечивая тридцатикратное повышение соотношения сигнал/шум.

6. Использование ультрочувствительного иммуноанализа позволяет найти новые мочевые онкомаркеры. Раково-сетчаточные антигены аррестин и рековерин являются перспективными предиктивными биомаркерами онкоурологических заболеваний.

7. Разработанные оригинальные электрофоретические устройства на основе полупроницаемой мембраны позволяют за 15 минут сконцентрировать белки до 10^5 раз.

8. Метод ультрочувствительного иммуноблоттинга, включающий электрофоретическое разделение образца в зазоре между соприкасающимися мембранами, фотохимическую *in situ* иммобилизацию белков и их детекцию магнитными частицами, покрытыми специфическими антителами, позволяет обнаружить до 0,3 фг (10-20 зептомоль) белка за 5 минут.

На заседании 26 марта 2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Шляпникову Юрию Михайловичу ученую степень доктора химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за 17, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель диссертационного совета
д.х.н., проф., чл.-корр. РАН

Варфоломеев С.Д.

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.х.н.

Сакодынская И.К.

26 марта 2024 года