

Директору Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института  
органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Российской академии наук, председателю  
Диссертационного совета 24.1.092.01  
Действительному члену РАН  
Егорову Михаилу Петровичу

Я, Бовин Николай Владимирович, д.х.н., Заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов, главный научный сотрудник лаборатории углеводов ГНЦ ФГБУН Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, согласен быть официальным оппонентом диссертационной работы Касимовой Анастасии Алексеевны на тему **«Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: строение и расщепление деполимеразами бактериофагов»**, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия в диссертационный совет 24.1.092.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук».

Профессор, Заведующий отделом химической  
биологии гликанов и липидов

д.х.н. Н.В. Бовин

Подпись Н.В. Бовина заверяю:

Зам. директора ИБХ РАН

чл.-корр. РАН И.В.Смирнов



## Сведения об официальных оппонентах

**1. ФИО оппонента:** Бовин Николай Владимирович

**2. Ученая степень и наименование отрасли науки, по которым им защищена диссертация:** д.х.н., 1.5.6 – биотехнология

**3. Список публикаций оппонента:**

1. Pazykina G.V., Tsygankova S.V., Sablina M.A., Chizhov A.O., Bovin N.V. Synthesis of Sug1-4GalNAc $\alpha$  disaccharides and their interaction with human blood antibodies // *Mendeleev Communications*, 2023, 33(1), pp. 107–108
2. Sharif M., Hickl V., Juarez G., Bovin N., Miller D.J. Hyperactivation is sufficient to release porcine sperm from immobilized oviduct glycans // *Scientific Reports*, 2022, 12(1), 6446
3. Shilova N., Bovin N., Maltseva D., Hushpulian D., Tonevitsky A. Specificity of viscumin revised. As probed with a printed glycan array // *Biochimie*, 2022, 202, pp. 94–102
4. Slivka E.V., Tuzikov A.B., Khaidukov S.V., Bovin N.V., Rapoport E.M. Influence of the Lipid Moiety Structure on the Insertion/Release of Glycolipids in/from the Cell: A Study with Synthetic Analogs // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2022, 48(5), pp. 932–936
5. Nikiforova, A.V., Golovchenko, V.V., Mikshina, P.V., Bovin, N.V., Shilova, N.V. Plant Polysaccharide Array for Studying Carbohydrate-Binding Proteins // *Biochemistry (Moscow)*, 2022, 87(9), pp. 890–902
6. Tsygankova S.V., Pazykina G.V., Paramonov A.S., Chizhov A.O., Bovin N.V. Synthesis of Disaccharide Xyl $\beta$ 1-2Man $\beta$ , the Core Fragment of Plant N-Glycoproteins // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2022, 48(3), pp. 513–518
7. Olivera-Ardid S., Bello-Gil D., Tuzikov A., Bovin N., Mañez R. Poly-L-Lysine-Based  $\alpha$ Gal-Glycoconjugates for Treating Anti- $\alpha$ Gal IgE-Mediated Diseases // *Frontiers in Immunology*, 2022, 13, 873019
8. Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Bovin N.V., Sukhikh G.T. Repertoire of glycan-binding placenta-associated antibodies in healthy pregnancy and in preeclampsia // *Scandinavian Journal of Immunology*, 2022, 95(6), e13157
9. Орлова А.В., Лаптинская Т.В., Бовин Н.В., Кононов Л.О. Различия в реакционной способности п-ацетил- и п,п-диацетилсиалилхлоридов, вызванные их разной супрамолекулярной организацией в растворе // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2017. № 11. С. 2173-2179.



10. Шилова Н.В., Зиганшина М.М., Хасбиуллина Н.Р., Нокель А.Ю., Липатников А.Д., Новаковский М.Е., Полякова С.М., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Изучение иммунного ответа к гликанам и пептидам s-белка у больных, перенесших covid-19 // Акушерство и гинекология. 2021. № S3-1. С. 32.

**4. Полное наименование организации, являющееся основным местом работы на момент написания отзыва:** Государственный Научный Центр Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

**5. Занимаемая должность:** Профессор, Доктор наук, Заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов, главный научный сотрудник лаборатории углеводов ГНЦ ФГБУН Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Профессор, Заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов

д.х.н. Н.В. Бовин

Подпись Н.В. Бовина заверяю:

Зам. директора ИБХ РАН



чл.-корр. РАН И.В.Смирнов

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работу **Касимовой Анастасии Алексеевны** «Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: строение и расщепление деполимеразами бактериофагов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Объект исследования данной диссертационной работы – группа грамотрицательных бактерий вида *Acinetobacter baumannii* – представляет особый интерес в связи с их антибиотико-устойчивостью. Единственным на сегодняшний день альтернативным и в то же время практичным терапевтическим подходом для борьбы с этой внутрибольничной инфекцией является лечение бактериофагами. Однако, несмотря на часто наблюдаемую эффективность бактериофагов, лечение ими не стало общепринятым; одной (и, вероятно, основной) причиной этого является недоизученность бактериофагов и их взаимодействия с капсульными полисахаридами: поиск терапевтических фагов ведется методами интуитивного скрининга, без существенной молекулярной основы, а это принципиальный барьер для получения разрешительной документации для терапевтика любого механизма действия. Данная диссертация посвящена расшифровке структуры капсульных полисахаридов, изучению расщепления капсульных полисахаридов специфическими ферментами-деполимеразами бактериофагов, а также поиску закономерностей в структуре полисахаридов с одной стороны и генетическими особенностями бактериальных гликозил-трансфераз – с другой. Сказанное выше свидетельствует одновременно как об очевидной практической значимости данного исследования, так и о его фундаментальности, а в совокупности – о высокой актуальности.

Всего были определены структуры 25 ранее неизвестных капсульных полисахаридов *A. baumannii* и охарактеризованы все соответствующие генные кластеры, то есть проведена не просто большая, а очень большая сложная структурная работа. Сложность ее, помимо всего прочего, заключалась в том, что для полисахаридов этих бактерий типичным оказалось присутствие разнообразных (часть из которых оказались абсолютно новыми, то есть, здесь потребовались особенно строгие структурные доказательства; кроме того, в значительном числе случаев – в необычной бета-конфигурации) нонулоновых кислот, которые легко отщепляются в умеренно кислой среде, что затрудняет структурный анализ. Установление структуры осуществлялось традиционным для ИОХ комбинированием частичного химического расщепления (гидролиза, сольволиза, распада по Смитсу) полисахаридов с масс-спектрометрией и хиральной хроматографией при



необходимости доказывать абсолютную конфигурацию моносахаридов, а также нескольких разновидностей (двумерные варианты, ЯЭО, гетероядерные эксперименты) ЯМР-спектроскопии.

Под действием фаговых деполимераз из полисахаридов образуются олигосахариды, структуру которых исследовали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения, и спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР, включая двумерные эксперименты  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY,  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC. В результате в каждом (а их было 15) случае были найдены места расщепления полисахарида, определен механизм деполимеризации (вообще говоря, это может быть как собственно гидролизом, так и в некоторых случаях  $\beta$ -элиминированием), и показано, что при этом образуются мономерные, димерные или тримерные (но не более) фрагменты, мономер которых соответствует биологическому повторяющемуся звену полисахарида.

Обнаружен интересный факт: один из фаговых белков оказался не деполимеразой (эндогликозидазой), как ожидалось, а де-О-ацетилазой.

Обзор литературы (без названия, 40 страниц, около 200 ссылок) освещает две темы – 1) структуру и биосинтез КПС данного вида, 2) механизм действия бактериофагов на КПС. Обзор литературы говорит нам, что обнаружено 240 типов генных капсульных локусов бактерий *Acinetobacter baumannii* (и их число постоянно увеличивается), но в то же время, химическая структура к моменту начала диссертационной работы была определена только для 41 капсульного полисахарида, что является дополнительным аргументом в пользу нужности данного направления исследований. Этот раздел (как и другие) хорошо иллюстрирован (19 рисунков) и написан так, что является удобным подспорьем при осмыслении читателем результатов диссертационной работы.

#### Полученные результаты.

Диссертант с помощью указанных выше методов установил структуру 25 неизвестных ранее капсульных полисахаридов *Acinetobacter baumannii*. Необычной особенностью охарактеризованной группы из 25 полисахаридов оказалось наличие в составе полисахаридных цепей пяти 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот, это: псевдаминовая, 8-эпипсевдаминовая, легионаминовая, ацинетаминовая и 8-эпиацинетаминовая; все пять являются изомерными 9-углеродными моносахаридами, всегда расположенными в составе изученных КПС в виде боковых заместителей основной цепи, некоторые альфа, а другие – бета-связанные. Две из нонулозоновых кислот обнаружены впервые, структура была однозначно доказана. Уже сам по себе факт наличия

такого набора нонулозоновых кислот заслуживает внимания и дальнейшего изучения с точки зрения вирулентности бактерий изучаемого вида, а также грам-отрицательных бактерий в целом.

С помощью коллег из Австралии изучены генные кластеры, ответственные за биосинтез капсульных полисахаридов и в результате сопоставления массива биоинформатических данных с установленными структурами полисахаридов показано их соответствие, что дало основание обсуждать функции генов, участвующих в биосинтезе изученных полисахаридов.

Для тех 15 капсульных полисахаридов *A. baumannii*, для которых нашлись специфические бактериофаги, изучено расщепление рекомбинантными деполимеразами этих бактериофагов. Они действительно обладали эндо-гликозидазной активностью; механизм их действия был показан как гидролитический (а не соответствующий бета-элиминированию). Показано, что в результате действия этих ферментов образуются олигосахариды, соответствующие по структуре одному, двум или трем повторяющимся звеньям полисахарида. Один из фаговых ферментов оказался не полисахарид-гидролазой, а O-дезацетилазой.

Важно отметить, что полученные структурные данные в совокупности с данными по генным кластерам могут стать надежной научной основой для классификации штаммов бактерий *A. baumannii*, что востребовано в области диагностики вызываемых этими бактериями заболеваний.

#### К работе есть замечания.

1. Есть элементарные опечатки, на которых не будем заострять внимания, но есть и смысловые. В частности:
  - «дезацетилирование путем гидролиза»,
  - гексозы нельзя называть «гексасахаридами»,
  - «фаговая деполимераза являлась де-O-ацетилазой», если фермент является по механизму действия де-O-ацетилазой, то он никак не может называться деполимеразой.
2. Экспериментальная часть написана на неполных 6 страницах (кеглем №14), то есть слишком лапидарно; обычно в диссертациях эксперимент описывают подробнее, чем в статьях, освещая возникшие и потенциальные сложности, а здесь получилось наоборот.



3. Хотелось бы видеть в диссертации не только констатацию обнаруженных фактов, но и попытку дать им биологическое объяснение, в частности: 1) зачем бактериофагу де-О-ацетилаза, как это способствует его противобактерийному действию; 2) почему фаговые деполимеразы расщепляют полисахарид всегда (15 примеров!) на фрагменты, соответствующие биологическому повторяющемуся звену полисахарида, не задействован ли здесь механизм горизонтального переноса генов (и если да, то от кого к кому?); 3) чем бактериям данного вида понравились нонулозоновые кислоты в качестве модификантов основной полисахаридной цепи?
4. В продолжение пункта 2: в диссертации (и в Автореферате тоже) отсутствует общее обсуждение полученных результатов, которое можно было бы написать как раздел «Заключение»; полученные данные по структуре полисахаридов обсуждаются отдельно, данные по действию бактериофагов на КПС – отдельно, а робкая попытка осмыслить весь огромный экспериментальный материал появляется только в кратко написанных «Выводах».

Замечания, которые приведены выше, нельзя квалифицировать как недостатки проделанной и осмысленной работы, их следует отнести к шероховатостям, которые привередливый оппонент всегда обнаружит в любой диссертации; иными словами – несколько не умаляют положительную оценку этой замечательной работы.

Содержание **Автореферата** полностью соответствует (включая отмеченные выше недостатки) содержанию диссертации, в нем имеются все необходимые разделы.

**Цель** настоящей работы, сформулированная как «Установление строения капсульных полисахаридов, продуцируемых грамотрицательными бактериями вида *Acinetobacter baumannii*, и изучение расщепления их капсульных полисахаридов деполимеразами бактериофагов», безусловно выполнена.

**Практическая ценность** выполненного исследования очевидна: во-первых, его результаты востребованы инфекционной диагностикой. создана основа для классификации штаммов *A. baumannii*, необходимая для точной диагностики и эпидемиологического мониторинга патогенов этого вида; во-вторых, изучение действия деполимераз бактериофагов на капсульные полисахариды является несомненным вкладом в продвижение фаготерапии, - не только антибиотикорезистентного патогена *A. baumannii*, но и всей стратегии фаготерапии в целом, которая остается в значительной мере эмпирической, недостаточно подкреплённой знаниями молекулярного уровня.

**Научная новизна** исследования стопроцентна; и еще диссертанту (за его настойчивость) немного повезло - не каждому химику выпадает удача обнаружить природные молекулы (имеются в виду две нонулозоновые кислоты), ранее неизвестные.

**Опубликована** проделанная работа не просто хорошо, а исключительно хорошо: 25 статей.

**Выводы** диссертации (их шесть) сформулированы лаконично и точно, полностью отражая суть проделанной работы.

Считаю, что диссертационная работа **Касимовой Анастасии Алексеевны** «Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: строение и расщепление деполимеразами бактериофагов» полностью соответствует квалификационным критериям, установленным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 355. В диссертации Касимовой А.А. решена задача установления структуры 25 капсульных полисахаридов из бактерий *Acinetobacter baumannii*, и систематически изучено расщепление полисахаридов серией бактериофагов. Автор диссертации, Касимова Анастасия Алексеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Заведующий лабораторией Углеводов  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Институт  
биоорганической химии РАН им. академиков  
М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» доктор  
химических наук (специальность  
02.00.10 – биоорганическая химия)

  
Николай Владимирович Бовин

Почтовый адрес: 117997, г. Москва,  
ул. Миклухо-Маклая, дом 16/10  
ФГБУ Институт биоорганической химии РАН  
им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова

тел. 8(916) 474-9382  
e-mail: professorbovin@yandex.ru

Подпись зав. лаб. д.х.н. Н.В.Бовина заверяю.  
Зам. директора ИБХ РАН

06.05.2024г.

  
чл.-корр. РАН, И.В. Смирнов

