

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, Львов Вячеслав Леонидович, к.х.н., заведующий лабораторией
препаративной биохимии ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА,
согласен быть официальным оппонентом диссертационной работы Науменко
Олеси Игоревны на тему «Установление строения и характеристика
генных кластеров биосинтеза О-специфических полисахаридов нового
вида энтеробактерий *Escherichia albertii*, близкородственного *Escherichia
coli*», 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».

Заведующий лабораторией
препаративной биохимии

ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА



к.х.н. В.Л. Львов

Подпись В.Л. Львова заверяю
ученый секретарь
ГНЦ Института Иммунологии ФМБА



к.м.н. А.А. Власов

25.04.2023г.

Сведения об официальных оппонентах

1. ФИО оппонента: Львов Вячеслав Леонидович

2. Ученая степень и наименование отрасли науки, по которым им защищена диссертация: к.х.н., 02.00.10 – биоорганическая химия

3. Список публикаций оппонента:

1. Ledov V.A., Golovina M.E., Markina A.A., Kovalchuk A.L., Aparin P.G. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection // *Vaccine*, 2019, 37(8), pp. 1062–1072
2. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The dual NOD1/NOD2 agonism of mucopeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue // *PLoS ONE*, 2016, 11(8),
3. L'vov V.L., Filatov A.V., Perepelov A.V., Chizhov A.O., Knirel Y.A. Solvolysis with trifluoroacetic acid: an efficient method for selective cleavage of polysaccharides // *Mendeleev Communications*, 2016, 26(4), pp. 279–281
4. Ledov V.A., Golovina M.E., Luchina N.N., L'vov V.L., Aparin P.G. Immunogenicity and protective efficacy of lipopolysaccharides *shigella flexneri* 2a with chemically modified lipid A // *Immunologiya*, 2015, 36(2), pp. 99–104
5. Perepelov A.V., Filatov A.V., Wang Q., Wang L., Knirel Y.A. Structure elucidation and gene cluster annotation of the O-antigen of *Escherichia coli* O39; Application of anhydrous trifluoroacetic acid for selective cleavage of glycosidic linkages // *Carbohydrate Research*, 2014, 388(1), pp. 30–36
6. Perepelov A.V., Shekht M.E., Liu B., Wang L., Knirel Y.A. *Shigella flexneri* O-antigens revisited: Final elucidation of the O-acetylation profiles and a survey of the O-antigen structure diversity // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2012, 66(2), pp. 201–210
7. Дагиль Ю.А., Арбатский Н.П., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Пашенков М.В. Структурные особенности селективных и неселективных агонистов под-рецепторов // *Медицинская иммунология*. 2017. Т. 19. № 6. С. 705-714.
8. Апарин П.Г., Львов В.Л., Книрель Ю.А., Шашков А.С., Николаева И.А. Способ получения комплексного шигеллезного препарата // Патент на изобретение RU 2614123 С1, 22.03.2017. Заявка № 2015141760 от 01.10.2015.
9. Степаненко Р.Н., Львов В.Л., Андреев И.В., Новикова Е.М., Козырева О.В., Разваляева Н.А.,

10. Попилок С.Ф., Вернер И.К., Львов В.Л., Свитич О.А., Калюжин О.В. Композиция растворимых мономерных и олигомерных фрагментов пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий, способы ее получения и применения // Патент на изобретение 2765270 С1, 27.01.2022. Заявка № 2020131974 от 28.09.2020.

4. Полное наименование организации, являющееся основным местом работы на момент написания отзыва: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Институт иммунологии» ФМБА

5. Занимаемая должность: заведующий лабораторией препаративной биохимии №54

Заведующий лабораторией препаративной биохимии
ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА

 к.х.н. В.Л. Львов

Подпись В.Л. Львова заверяю
к.х.н., ученый секретарь
ГНЦ Института Иммунологии ФМБА



 к.м.н. А.А. Власов

25.04.2023г.

Отзыв официального оппонента Львова Вячеслава Леонидовича
на диссертационную работу Науменко Олеси Игоревны

**«УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕННЫХ КЛАСТЕРОВ
БИОСИНТЕЗА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ НОВОГО ВИДА
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA ALBERTII*, БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ
ESCHERICHIA COLI»**

представленной на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Диссертационная работа Науменко О.И. посвящена изучению строения ранее неизученных О-специфических полисахаридов (ОПС), которые являются составной частью эндотоксических липополисахаридов (ЛПС) энтеробактерий *Escherichia albertii* вызывающих ряд заболеваний желудочно-кишечного тракта. ЛПС грамотрицательных бактерий, располагаясь на внешней поверхности бактериальной клетки, не только осуществляет защитную функцию, но и играет роль триггера, инициирующего мощный иммунный ответ макроорганизма на появление патогена, а его ОПС, обладая уникальной для каждого микроорганизма структурой, обеспечивает специфичность этого ответа. Результаты изучения химического строения и биологических свойств иммунологически активных ЛПС и ОПС клинически и эпидемически значимых микроорганизмов, актуальны и важны не только для совершенствования приемов структурной биоорганической химии, но и для более глубокого понимания тонких механизмов взаимодействия бактериальной клетки с иммунной системой организма хозяина.

Структурный анализ ОПС, принимающих непосредственное участие во взаимодействии бактерий с иммунной системой организма хозяина, играет важную роль при создании препаратов для диагностики, вакцинопрофилактики и лечения заболеваний, вызываемых болезнетворными микроорганизмами. Результаты такого рода исследований необходимы также для исследования механизмов биосинтеза ОПС и его генетического контроля.

С учетом того, что *E. albertii* относится к категории эпидемически важных возбудителей кишечных инфекций, тема настоящей работы является актуальной, а результаты проведенного исследования имеют практическое значение, так как установленные структуры могут послужить основой для разработки схемы

классификации, а также эффективных методов молекулярного типирования природных и клинических изолятов *E. albertii*.

Работа выполнена на современном методическом уровне с рациональным сочетанием химических и спектральных подходов к анализу ОПС и их олигосахаридных фрагментов. Так, использование продвинутых методов спектроскопии ЯМР в случае устойчивых даже к жесткому кислотному гидролизу ОПС позволило провести установление их моносахаридного состава без использования этого традиционного подхода. А рациональное комбинирование специфических и неспецифических методов расщепления ОПС обеспечило возможность выделения олигосахаридных фрагментов, при анализе ЯМР- и масс-спектров которых удалось реконструировать и, таким образом, установить строение химического повторяющегося звена каждого из изучаемых биополимеров.

Анализ результатов в части исследования, посвященной характеристике генных кластеров биосинтеза ОПС *E. albertii*, позволил не только подтвердить правильность установления строения химического повторяющегося звена ОПС, но позволил выяснить, остаток какого моносахарида первым принимает участие в его биосинтезе, т.е. однозначно установить строение биологического повторяющегося звена ОПС *E. albertii*.

Тема хорошо составленного «Литературного обзора» направленно коррелирует с экспериментальным материалом исследования. Использованные в работе методики грамотно описаны в разделе «Экспериментальная часть». Выводы работы соответствуют поставленным целям и основываются на результатах экспериментов.

Полученные в работе результаты могут стать основой разработки серологических тестов для диагностики энтеробактерий. Не менее важным аспектом рецензируемой работы является успешная попытка систематизирования данных, полученных при избирательно сольволизе ОПС *E. albertii*, которые содержат моносахаридные остатки с различной устойчивостью гликозидной связи. Описанные в диссертации методики сольволиза полисахаридов уже в настоящее время находят применение не только в структурных исследованиях, но и в прикладных областях, связанных с избирательной деполимеризацией природных полисахаридных объектов.

Диссертационная работа О.И. Науменко оформлена традиционным образом. Материал диссертации изложен на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы на тему «Химические методы избирательного расщепления гликозидных связей в структурном анализе бактериальных полисахаридов», результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложения с табулированными данными ЯМР спектров, полученных при выполнении работы.

Библиографический список состоит из 92 наименований. Диссертация содержит 15 таблиц и 56 рисунков (в приложении содержится дополнительно ещё 10 таблиц).

Литературный обзор посвящён химическим методам частичного расщепления гликозидных связей в структурном анализе бактериальных полисахаридов. Обзор занимает 59 страниц диссертации и охватывает 58 литературных источников. Основная часть обзора посвящена подробному анализу известных специфических и неспецифических методов избирательной фрагментации углеводов-содержащих биополимеров с примерами их применения для установления строения бактериальных полисахаридов.

К числу наиболее важных научно-практических достижений рецензируемой работы можно отнести следующие:

- 1) Установлена не описанная ранее структура химического и биологического повторяющегося звена девяти ОПС, выделенных из бактериальных ЛПС *Escherichia albertii*, что позволило получить сведения о разнообразии ОПС представителей этого ранее неизученного бактериального вида.
- 2) Продемонстрированы преимущества использования безводной трифторуксусной кислоты в качестве сольвента при избирательном расщеплении полисахаридов с целью получения олигосахаридных фрагментов.
- 3) Полученные данные о строении ОПС являются основой для структурной классификации штаммов *Escherichia albertii*. В частности, они подтверждают обоснованность отнесения изученных штаммов к отдельным O-серогруппам.
- 4) Показано соответствие установленных структур ОПС составу генных кластеров O-антигенов *Escherichia albertii*.

Диссертационная работа выполнена на научном и экспериментальном уровне (спектроскопия ^1H - и ^{13}C -ЯМР, масс-спектрометрия высокого разрешения), полученные результаты отмечены высоким уровнем доказательности.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Основное содержание диссертационного исследования отражено в 16 работах, в том числе в 11 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, и в 5 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Таким образом, на основании анализа текста работы и публикаций автора можно утверждать, что цель работы, сформулированная в разделе «Введение», автором достигнута. Представленные в работе научные положения, выводы и рекомендации являются

обоснованными. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации, которое соответствует теме диссертации и научной специальности.

По оформлению работы могут быть сделаны следующие замечания:

- 1) Не приведено данных об установлении абсолютной конфигурации некоторых моносахаридов.
- 2) Не вся информация подкреплена указанием ссылок на литературные источники. Например, в тексте раздела 3.1.1 (страница 61) отсутствует ссылка на литературные данные химических сдвигов ацетимидоильного остатка, в ЯМР-спектре а на страницах 64 и 67 не приведены ссылки на строение ОПС близкородственных *E.albertii* микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* O5 и *Providencia alcalifaciens* O28.
- 3) В разделе 3.1.8 на странице 82 не указаны условия гидролиза, который привел к полному отщеплению остатка колитозы в полисахариде *Escherichia albertii* O8.
- 4) Отсутствует объяснение обнаружения в ОПС *E. albertii* O9 полисахарида, идентичного по структуре ранее изученному ОПС *E. albertii* O8.
- 5) Отмечено некоторое количество стилистических шероховатостей и неточностей, что связано, главным образом, с неуместным использованием внутрिलाбораторных терминов.
- 6) В работе имеется незначительное количество опечаток, не сказывающихся на понимании приведённых данных.

В целом, несмотря на отмеченные замечания, диссертация представляет собой завершённую объёмную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком научном уровне, на актуальную тему, разрабатываемую во многих лабораториях мира. По своей научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа удовлетворяет всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым диссертационным работам на соискание степени кандидата наук, а её автор, Науменко Олеся Игоревна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 — биорганическая химия.

Официальный оппонент:

к.х.н., заведующий лабораторией препаративной биохимии

ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА

Каширское шоссе, 24,

г. Москва 115522,

тел. 8 (499) 311-67-78

E-mail: lvovslava@gmail.com

ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА

В.Л. Львов



Подпись В.Л. Львова заверяю:

к.б.н., ученый секретарь

ГНЦ Института Иммунологии ФМБА

25 апреля 2023 г.



А.А. Власов

25.04.2023г.