


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

Я, **Курочкин Илья Николаевич**, профессор, доктор химических наук,
Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук,
согласен быть официальным оппонентом диссертационной работы **Крылова
Вадима Борисовича «Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и
приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных
патогенов»**, представленной на соискание ученой степени доктора 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.
Я согласен на обработку моих персональных данных.

Профессор, доктор химических наук,
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
Российской академии наук


И.Н. Курочкин
24.11.2022

Подпись доктора химических наук,
профессора **И.Н. Курочкина** заверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН
кандидат биологических наук



Скалацкая С.И.

Сведения об официальном оппоненте
по диссертационной работе **Крылова Вадима Борисовича**
«Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов»,
представленной на соискание ученой степени доктора 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

Фамилия, имя, отчество оппонента	Курочкин Илья Николаевич
Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация	02.00.15 — Кинетика и катализ 03.00.23 — Биотехнология
Ученая степень и отрасль науки	Доктор химических наук
Год защиты диссертации	2003
Ученое звание	Профессор
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук
Занимаемая должность	директор
Почтовый индекс, адрес	119334, г. Москва, ул. Косыгина, 4
Телефон	+7 499 137-64-20
Адрес электронной почты	inkurochkin@gmail.com

Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации за последние 5 лет

1) Boginskaya I., Safiullin R., Tikhomirova V., Kryukova O., Nechaeva N., Bulaeva N., Golukhova E., Ryzhikov I., Kost O., Afanasev K., Kurochkin I. Human Angiotensin I-Converting Enzyme Produced by Different Cells: Classification of the SERS Spectra with Linear Discriminant Analysis //Biomedicines. – 2022. – Т. 10. – №. 6. – С. 1389

2) Sigolaeva L. V., Nechaeva N. L., Ignatov A. I., Filatova L. Y., Sharifullin T. Z., Eichhorn J., Schacher F.H., Pergushov D.V., Merzlikin A.M., Kurochkin I.N. In Situ SERS Sensing by a Laser-Induced Aggregation of Silver Nanoparticles Templated on a Thermoresponsive Polymer //Biosensors. – 2022. – Т. 12. – №. 8. – С. 628.

3) Sigolaeva L. V., Pergushov D. V., Gladyr S. Y., Kurochkin I. N., Richtering, W. Microgels in Tandem with Enzymes: Tuning Adsorption of a pH and Thermoresponsive Microgel for Improved Design of Enzymatic Biosensors //Advanced Materials Interfaces. – 2022. – Т. 9. – №. 17. – С. 2200310.

4) Nechaeva N.L., Sorokina O.N., Konstantinova T.S., Vasil'eva A.D., Yurina L.V., Byzova N.A., Bugrova A.E., Podoinitsyn S.N., Eremenko A.V., Kurochkin I.N. Rapid Automatic Determination of Four Cardiomarkers in the Blood Plasma of Patients with Cardiopathologies //Journal of Analytical Chemistry. – 2022. – Т. 77. – №. 5. – С. 531-536.

5) Sigolaeva L. V., Konyakhina A. Y., Pergushov D. V., Kurochkin I. N., Electrochemical biosensor based on nanosized polymer-enzyme films composed of linear poly (n, n-dimethylaminoethyl methacrylate) and choline oxidase //Moscow University Chemistry Bulletin. – 2021. – T. 76. – C. 334-342.

6) Nechaeva N. L., Sorokina O. N., Konstantinova T. S., Vasilyeva A. D., Yurina L. V., Byzova N. A., Yanovich S. V., Eremenko A. V., Kurochkin I. N. Simultaneous express immunoassay of multiple cardiac biomarkers with an automatic platform in human plasma //Talanta. – 2021. – T. 224. – C. 121860.

7) Guliev, R. R., Suntsova, A. Y., Vostrikova, T. Y., Shchegolikhin, A. N., Popov, D. A., Guseva, M. A., Shevelev A. B., Kurochkin, I. N. Discrimination of Staphylococcus aureus strains from coagulase-negative staphylococci and other pathogens by Fourier transform infrared spectroscopy //Analytical chemistry. – 2020. – T. 92. – №. 7. – C. 4943-4948.

8) Ryzhkov V.V., Zverev A.V., Echeistov V.V., Andronic M., Ryzhikov I.A., Budashov I.A., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Rodionov I.A. Cyclic on-chip bacteria separation and preconcentration //Scientific reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 1-12.

9) Nechaeva, N. L., Boginskaya, I. A., Ivanov, A. V., Sarychev, A. K., Eremenko, A. V., Ryzhikov, I. A., Lagarkov A.N., Kurochkin, I. N. Multiscale flaked silver SERS-substrate for glycated human albumin biosensing

//Analytica Chimica Acta. – 2020. – Т. 1100. – С. 250-257.

Профессор, доктор химических наук,
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
Российской академии наук

И.Н. Курочкин
27.02.2023

Подпись доктора химических наук,
профессора **И.Н. Курочкина** заверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН
кандидат биологических наук



Скалацкая С.И.

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Крылова Вадима Борисовича «Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия, оформленную в виде научного доклада.

Углеводы – важный класс органических соединений. Углеводы можно обнаружить в растениях, животных организмах и микроорганизмах. Углеводы имеют огромное значение и для человеческого организма, неся в себе сразу несколько функций: энергетическую, гидроосмотическую, структурную и защитную. Олигосахариды (вид полимерных углеводов, молекулы которых содержат небольшое количество моносахаридов, соединенных O-гликозидными связями) представляют собой одну из важнейших групп углеводов. Гликобиологические исследования гликанов и гликоконъюгатов показали значительные различия в биосинтезе этих соединений между бактериями, грибами и млекопитающими. В частности, структуры, содержащие галактофуранозу, исключительно важны для жизнедеятельности бактерий и грибов, но в тоже время, гликаны млекопитающих и человека не содержат остатки галактозы в фуранозной форме. Это обстоятельство дает ключ к потенциальным лекарственным и диагностическим мишеням в случае бактериальных и грибковых патогенов.

С учетом сказанного выше, представляется весьма значимым выбор в качестве объектов исследования серии олигосахаридов, обладающих структурным родством со следующими биомолекулам: галактоманнана, галактоксилманнана, галактана I и дигетерогликана. Выбранные биомолекулы содержат в своей структуре остатки галактозы в фуранозной форме и являются компонентами клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans* и бактерий *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* соответственно. Группы разнообразных по строению олигосахаридов фактически обеспечивают изучение молекулярных механизмов и топологии

их связывания с клеточными рецепторами и белками иммунной системы, распознающими углеводные антигены бактериальных и грибковых патогенов. В этой связи исключительно важной является проблема разработки новых методов синтеза сложных избирательно защищенных фуранозидных производных в качестве блоков для получения сложных олигосахаридов.

Таким образом, можно утверждать, что тема диссертационной работы Крылова Вадима Борисовича «Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов» представляется вполне актуальной и направлена на решение важнейших задач биоорганической химии в части структурно-функциональных и синтетических исследований полисахаридов.

В соответствии с выбранной темой соискатель провел исследование нового процесса в химии углеводов – пиранозид-фуранозидной перегруппировки (ПФП), протекающей при исчерпывающем сульфатировании полигидроксильных производных углеводов в присутствии сильных кислот, с изучением границ применения ПФП в синтезе сложных галактофуранозилсодержащих олигосахаридов, родственных антигенным полисахаридам грибковых и бактериальных патогенов, охарактеризовал конформационные и иммунохимические свойства полученных соединений. В рамках диссертационной работы были сформулированы и успешно решены следующие задачи:

- установлен механизм ПФП, её движущая сила и зависимость от структуры пиранозных субстратов;
- на основе ПФП разработаны методы получения сложных избирательно защищенных галактофуранозидных синтетических блоков для сборки олигосахаридов;
- с использованием ПФП синтезирована широкая группа разнообразных по строению олигосахаридов, структурно родственных грибковым и бактериальным полисахаридам;

- установлены основные закономерности пространственного строения фуранозидов и их сульфатированных производных, важные для их реакционной способности и распознавания белковыми рецепторами;
- с использованием набора синтетических лигандов, родственных грибковым полисахаридам, исследован профиль углеводной специфичности сывороточных иммуноглобулинов у пациентов с грибковыми инфекциями;
- исследовано иммуномодулирующее действие галактофуранозилсодержащих олигосахаридов, а также клеточную экспрессию цитокинов и хемокинов в их присутствии;
- с использованием наборов модельных олигосахаридов, родственных грибковым антигенным полисахаридам, установлена специфичность антител в существующих коммерческих диагностикумах;
- синтезированы гликоконъюгатные иммуногены и покрывающие антигены, позволяющие получить и отобрать эффективные диагностические антитела, обладающие требуемой углеводной специфичностью и высокой аффинностью для использования в составе иммуноферментных диагностикумов;
- разработаны диагностические тест-системы на базе различных физических платформ для определения антиуглеводных антител углеводных антигенов как маркеров грибковых заболеваний.

Основное содержание диссертации в форме научного доклада содержит 4 главы, посвященные решению упомянутых выше задач. Кроме того, работа содержит общую характеристику работы, 17 рисунков, заключение и выводы, список литературы, содержащий ссылки на 45 источников, в которых изложены основные научные результаты диссертации и благодарности. Всего 52 страницы.

Анализ раздела **Основное содержание работы** (4 главы) позволяет сделать заключение, что автором проведено масштабное систематическое исследование, основой которого является открытие ПФЛ. Отмечу, что впервые сужение шестичленного цикла до пятичленного при

сульфатировании углеводов автор опубликовал в 2011 году как любопытную побочную реакцию. Спустя 3 года в 2014 году вышла фактически основная статья, описывающая этот химический процесс. Далее в 2015 году были исследованы рамки применимости и ограничения данной реакции. Сейчас можно смело говорить, что предложенная в 2014 году методика, оказалась крайне успешной и практически в неизменном виде была многократно использована в синтетических работах (общее число ссылок на эту работу более 200). На основе ПФП автору удалось впервые провести препаративный синтез широкого ряда избирательно модифицированных фуранозных производных. Итогом этой части работы Вадима Борисовича являются следующие важнейшие моменты:

- открыт новый процесс в химии углеводов, исследован его механизм, движущая сила и ограничения;

- на основе ПФП предложен метод получения избирательно защищенных галактофуранозидных синтетических блоков, синтезированы олигосахариды, структурно родственных грибковым и бактериальным полисахаридам и содержащих в своем составе галактофуранозидные звенья.

Важно отметить, что автор не ограничился открытием нового процесса и синтезом уникальных полисахаридов. Вадим Борисович провел детальное исследование пространственного строения и конформационный анализ фуранозидов и их замещенных производных.

Особый блеск и целостность данной работе придает её заключительная часть, связанная с иммунохимическими исследованиями синтезированных в работе олигосахаридов, родственных полисахаридам клеточной стенки грибов, и разработка на их основе прототипов диагностических тест-систем, использующих различные физические платформы для детектирования биологического сигнала. Проведенные иммунохимические исследования позволили создать новую методологию идентификации эпитопов или лигандов полисахаридов клеточной стенки грибов и бактерий, влияющих на иммунный ответ при действии этих патогенов. Такой подход позволил точно

определить медиаторы, отличные от иммуноглобулинов, которые могут играть роль в индукции иммунного ответа против компонентов клеточной стенки. С использованием впервые синтезированных в рамках данной работы олигосахаридов, родственных галактоманнану из *Aspergillus fumigatus*, а также полученных и отобранных гомологичных антител был создан диагностический набор GalMAg-ИФА для определения опасного грибкового заболевания инвазивного аспергиллеза. Данный продукт был лицензирован компании «ХЕМА», зарегистрирован в качестве медицинского изделия (МИ РЗН 2019/8791), серийно производится и используется в России и за рубежом. Это большой успех! Но парадокс в том, что именно к этой части работы у меня возникает наибольшее количество вопросов, связанных с интерпретацией проведенных экспериментов.

Так изложение существа разработок диагностических тест-систем на базе различных физических платформ уместилось всего на одной трети страницы (стр. 38) и проиллюстрировано одним рисунком (рис. 14). Этого конечно маловато для описания решения одной из заявленных в работе задач. Анализ статей, на которые автор сослался, показал, что при описании систем на основе поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа, оптического наносенсора и сенсора на основе органического полевого транзистора допущен ряд спорных утверждений и выводов.

В работе [Возможности поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения галактоманнана *Aspergillus fumigatus* / **В.Б. Крылов**, М.И. Петрук, М.Р. Каримова, Л.И. Мухаметова, А.Л. Матвеев, Н.В. Тикунова, С.А. Еремин, Н.Э. Нифантьев/ Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019 – С. 2365-2369.] допущено упрощенное толкование данных ПФИА в отношении предела обнаружения и вычисления константы аффинности. Значение предела обнаружения явно занижено в 3-4 раза, а кинетика процесса связывания трейсера и линеаризация градуировочных зависимостей в координатах Скэтчарда свидетельствуют в пользу двух центров связывания трейсера, а не одного.

В работе [Nano-biosensor based on the combined use of the dynamic and static light scattering for *Aspergillus galactomannan* analysis / M. K. Alenichev, A. D. Levin, A. A. Yushina, E. S. Kostrikina, Y. S. Lebedin, I. P. Andreeva, V. G. Grigorenko, **V. B. Krylov**, N. E. Nifantiev // Sensing and Bio-Sensing Research – 2022. – V. 35. – P. 100475.] используется сенсорная система на основе регистрации процесса агрегации. Такого рода процессы характеризуются принципиально нелинейными градуировочными зависимостями с выраженным лагом (это хорошо видно на соответствующих кривых в статье), на величину которого неспецифически влияет большое количество факторов. Именно поэтому такого рода системы используются для качественного анализа. Поэтому выбор этой системы мне кажется не совсем удачным.

В работе [Biorecognition layer based on biotin-containing [1] benzothieno [3, 2-b][1] benzothiophene derivative for biosensing by electrolyte-gated organic field-effect transistors / E. Y. Poimanova, P. A. Shaposhnik, D. S. Anisimov, E. G. Zavyalova, A. A. Trul, M. S. Skorotetcky, O. V. Borshchev, D. Z. Vinnitskiy, M. S. Polinskaya, **V. B. Krylov**, N. E. Nifantiev, S.A. Ponomarenko // ACS applied materials & interfaces – 2022. – V. 14. – P. 16462–16476.] некорректно используется термин «изотерма Лэнгмюра» в отношении изотермы поверхностного натяжения, эмпирическое уравнение для которой в 1908 году предложил Б. Шишковский.

Вместе с тем, высказанные замечания не искажают общего положительного впечатления от работы В.Б. Крылова. Результаты, полученные автором, содержат очевидные признаки научной новизны и имеют неоспоримую практическую значимость.

Таким образом, диссертационная работа В.Б. Крылова «Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов» является научно-квалификационной работой, в которой проведены систематические синтетические исследования по получению разнообразных олигосахаридов и изучены их физико-химические и иммунобиологические

характеристики. Совокупность полученных результатов можно квалифицировать как научное достижение. Это научное достижение имеет важное социально-экономическое значение в деле развития химии олигосахаридов, создания иммуноаналитических систем и востребованных вакцин.

Основное содержание работы отражено в 45 статьях в рецензируемых журналах, из них 33 статьи за период 2013-2022 гг. в журналах из списков Q1 и Q2, индексируемых Scopus и Web of Science. По теме работы опубликовано 6 обзоров в специализированных научных журналах. Публикации автора подтверждают его высокий профессиональный уровень. Результаты работы были доложены на международных и всероссийских конференциях, конгрессах и симпозиумах.

Результаты исследования могут быть использованы в Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Институте биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, а также в учебных курсах Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева и других ВУЗов.

Диссертационная работа, оформленную в виде научного доклада, по новизне, практической значимости, достоверности результатов и обоснованности выводов удовлетворяет всем требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г.

№ 650; 20.03.2021 г. № 426), а её автор Крылов Вадим Борисович заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия.

**Официальный оппонент,
доктор химических наук, профессор,
директор ФГБУН «Институт биохимической
физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук»
119334, Москва, ул. Косыгина д.4,
+7(499) 137-64-20, director@sky.chph.ras.ru**



И.Н. Курочкин

27.02.2023

Подпись доктора химических наук,
профессора И.Н. Курочкина заверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН
кандидат биологических наук



Скалацкая С.И.