

ОТЗЫВ

официального оппонента Ефремова Романа Гербертовича на диссертационную работу Май Бить Зунг «Изучение методами ИК-спектроскопии, квантовой химии и молекулярной динамики строения и спектральных особенностей сильных Н-связей в водных растворах аминокислот и комплекса гуанидин-ацетат», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика».

Понимание на атомистическом уровне структурных, динамических, энергетических и др. характеристик формирования водородных связей в водных растворах биологических молекул является крайне важной и актуальной задачей, поскольку именно водородные связи вносят основной вклад в самоорганизацию сложнейших биологических макромолекулярных систем, определяют их динамическое поведение в среде и, в конечном счете, позволяют понять механизмы их работы в клетке. Помимо фундаментальной ценности, указанная информация имеет и важное прикладное значение, т.к. в перспективе позволит осуществлять рациональный дизайн новых (в т.ч. искусственных) материалов, обладающих заданными физико-химическими свойствами и биологической активностью, - за счет формирования необходимых паттернов водородных связей с требуемыми параметрами. Особое внимание при этом уделяют т.н. «сильным» межмолекулярным водородным связям, среди которых – взаимодействия аминокислотных остатков белков с водой, водородные связи в ионных парах и т.д. Несмотря на обилие накопленных экспериментальных и расчетных данных о таких системах, ряд важнейших атомистических деталей указанных процессов по-прежнему остается не исследованным. Кроме того, существующая информация требует тщательной систематизации и, главное, разработки эффективных – экспериментальных и теоретических – методов изучения таких связей. Решению этих задач с помощью методов молекулярного компьютерного моделирования и посвящена работа Май Бить Зунг, что определяет значимость и актуальность темы диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах и включает: Список сокращений, Введение, Обзор литературы (Глава 1), Раздел «Материалы и методика исследований» (Глава 2), описание результатов и их обсуждение (Главы 3 и 4), Заключение, Выводы, Рекомендации,

Список литературы из 154 источника. Диссертация содержит 37 рисунков и 10 таблиц.

Во Введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, представлены сведения о научной значимости и достоверности результатов, обсуждается практическая значимость работы. Кроме того, здесь же изложены положения, выносимые на защиту, а также информация об апробации диссертации, о публикациях автора, о структуре и объеме работы. Глава 1 представляет собой литературный обзор, включающий 4 раздела, которые затрагивают следующие основные тематики: 1) Экспериментальные и теоретические исследования сильных водородных связей в водных растворах аминокислот и комплекса гуанидин-ацетат (раздел 1.1); 2) Квантовохимические методы расчета с неявным учетом растворителя (раздел 1.2); 3) Методы молекулярной динамики с классическими силовыми полями (раздел 1.3); 4) Метод спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (раздел 1.4). Литературный обзор завершает раздел «Выводы» (1.5). Из литературных данных, приведенных в разделе 1.1, следует, что выбранная автором область исследования развивается быстрыми темпами, накоплен большой объем информации, которая может быть использована при планировании вычислительных экспериментов и анализе получаемых результатов. Именно этот раздел является наиболее информативным с точки зрения понимания современного состояния проблемы. Он содержит необходимую информацию о параметрах водородных связей в изучаемых системах, а также о результатах их исследования как в квантовомеханическом, так и в классическом вычислительном экспериментах. Кроме того, приведен большой объем экспериментальных данных ИК-спектроскопии. Напротив, разделы 1.2 и 1.3 выглядят гораздо более академично – в них даны основные фундаментальные сведения о двух типах вычислительных подходов, которые автор использует в работе. Эти разделы изложены четко, что делает их незаменимыми при начальном ознакомлении с проблематикой диссертации. Вместе с тем, как указано в одном из моих замечаний (см. ниже), было бы полезно обсудить результаты, полученные с помощью этих методов применительно к анализу водородных связей в сходных молекулярных

системах. В целом, представленный критический обзор литературных источников дает основание автору сделать вывод о необходимости проведения расчетов методами квантовой химии с неявным учетом эффектов среды, и, параллельно, с помощью метода молекулярной динамики (МД). Кроме того, очень важно сравнить рассчитанные спектральные (ИК) характеристики с получаемыми в биофизическом эксперименте.

Представленный в Главе 1 материал непосредственно связан с темой работы, содержит свежие (вплоть до источников 2016 года) данные. На мой взгляд, эта информация будет полезна как начинающим исследователям, так и специалистам в данной области. Изложенный в обзоре литературы материал подводит читателя к логически обоснованным выводам относительно целей диссертационной работы и к формулировке конкретных задач, которые необходимо решить. Описанию полученных результатов и их обсуждению посвящены Главы 3 и 4 диссертационной работы Май Бить Зунг.

Полученные автором научные результаты разбиты на десять разделов – шесть из них относятся к Главе 3 и четыре – к Главе 4. Глава 3 посвящена анализу данных, полученных с использованием ИК-спектроскопии, расчетов методами МД и теории функционала плотности о строении первой сольватной оболочки аминокислот в воде. В итоге автором получен большой объем новой, оригинальной, информации о сильных водородных связях в водных растворах глицина, пролина и фенилаланина. Большое внимание в расчетах МД было уделено выбору адекватного силового поля. Критерием в данном случае послужили данные дифракции нейтронов для пролина в воде – рассчитанные для этой аминокислоты в силовых полях AMBER и OPLS-AA функции радиального распределения (ФРР) сравнивали с соответствующими экспериментальными зависимостями. Показано, что наилучшее соответствие наблюдается при использовании силового поля AMBER. Поэтому именно оно в дальнейшем было использовано как наиболее подходящее к расчетам таких систем. На основании данных МД автором сделан важный вывод о том, что наиболее стабильными в воде являются кластеры глицина, содержащие 6 или 7 молекул связанной воды. С целью более

детального описания характеристик таких кластеров и, особенно, реализующихся в них водородных связей, методом теории функционала плотности были проведены квантовохимические расчеты этих двух надмолекулярных комплексов – как в пустоте, так и с применением модели неявно заданной среды (PCM). Результат оказался интересным – показано, что водное окружение слабо влияет на строение кластера глицин-6H₂O и сильно искажает гидратную оболочку кластера глицин-7H₂O. Кроме того, сделан важный вывод о том, что полоса в области ~2300 см⁻¹ в ИК-спектре водных растворов глицина и фенилаланина обусловлена валентными колебаниями их NH₃⁺ группы, формирующей сильные водородные связи с молекулами воды.

В Главе 4 описаны результаты расчетов методами МД и квантовой химии ионной пары гуанидин-ацетат в воде. Особое внимание при этом уделено возможным конфигурациям сильных водородных связей в получаемых комплексах. Несомненный интерес представляет набор полученных в МД наиболее устойчивых конфигураций взаимодействующих молекул – аналогов заряженных групп боковых цепей остатков аргинина (гуанидин) и аспарагиновой/глутаминовой кислот (ацетат) и результаты анализа заселенностей указанных состояний. Проведено детальное сравнение спектральных линий в экспериментально полученном ИК-спектре ионной пары и в рассчитанных спектрах. В результате автором сделан вывод о том, что наблюдаемые в ИК-спектрах интенсивные линии в областях ~1670, ~1550, ~1410 см⁻¹ обусловлены валентными и деформационными колебаниями групп, образующих в воде т.н. бидентантные структуры гуанидин-ацетат, характеризующиеся наличием двух межмолекулярных водородных связей. Кроме того, представляется интересным предположение автора о том, что малоинтенсивная широкая полоса в области 2100 – 2300 см⁻¹ обусловлена колебаниями групп ⁺N-H, формирующих сильные водородные связи с атомами кислорода ацетат-иона.

Считаю, что цель и задачи, сформулированные в работе, достигнуты в ходе её выполнения. Выводы и заключения, представленные автором, логически обоснованы и

убедительно показывают новизну и применимость полученных результатов.

По материалам диссертации считаю необходимым сформулировать ряд вопросов и замечаний.

1. В обзоре литературы (Глава 1) два больших раздела (1.2 и 1.3) посвящены изложению основ квантовохимических методов расчета молекулярных систем с использованием моделей неявно заданной среды (1.2) и метода молекулярной динамики (МД) в классическом приближении (1.3). Оба раздела дают четкое представление об основах методов, но, к сожалению, в них не рассматриваются примеры использования в решении задач диссертационной работы – расчетам параметров водородных связей. На мой взгляд, было бы полезно эти разделы посвятить именно особенностям применения методов квантовой химии и МД к анализу структурных, динамических и энергетических характеристик водородных связей, особенно для молекулярных систем, сходных с рассматриваемыми в работе.

2. В разделе 2.3 не указано, какие стартовые конфигурации системы гуанидин-ацетат были использованы при проведении расчетов ИК-спектров с помощью метода теории функционала плотности. Осуществляли ли при этом оптимизацию геометрии комплекса? Поскольку в растворе реализуется как минимум несколько состояний с высокой заселенностью, их учет необходим для корректного расчета ИК-спектра ионной пары. Вопрос о выборе стартового состояния системы, а также о воспроизводимости результатов в независимых запусках в полной мере относится и к расчетам МД, учитывая небольшую (до 15 нс) длину траекторий.

3. В расчетах МД основным критерием уравнивания изучаемых молекулярных систем являлся выход на режим равновесных флуктуаций значений полной энергии и ее составляющих – потенциальной и кинетической энергии. Однако известно, что именно эти параметры сходятся наиболее быстро, в то время как ряд других (например, энергия взаимодействий с водой и др.) могут сходиться гораздо

медленнее, что увеличивает временной интервал выхода системы на равновесный режим. Считаю, что следовало бы проанализировать процесс релаксации систем с учетом этих параметров.

4. Результаты квантовохимических расчетов систем глицин-6H₂O и глицин-7H₂O сильно отличаются. При этом не сказано, сколько независимых расчетов было сделано для каждой из систем. Как правило, в таких случаях единственного вычислительного эксперимента недостаточно, нужно иметь необходимую статистику. Следовательно, непонятно, насколько это фундаментальный результат или это артефакт расчета.

5. Для эффективного сравнения экспериментального и расчетных ИК-спектров пары гуанидин-ацетат было бы очень полезно привести их на одном рисунке (они находятся на разных страницах). Это тем более важно, что между спектрами существуют сильные различия, причем сразу в нескольких диапазонах. Чем обусловлены такие различия? Автор пытается прояснить этот вопрос для конкретных узких спектральных участков, но не обсуждает сходство/различие спектров в целом.

6. Одной из причин, побудивших автора взяться за данную работу, являлось то, что «сведения о структуре и спектральных особенностях этих (сильных водородных – *E.P.G.*) связей носят бессистемный характер» (стр. 7). Однако в итоге автор не поясняет, насколько полученные им результаты позволяют выправить ситуацию, внести «системную» компоненту в существующие представления по этому вопросу. Соответствующую дискуссию было бы очень полезно привести в заключительной части работы.

Технические вопросы и замечания:

7. В таблицах 3 и 4 значения величин даны с разной точностью. В каких единицах приведены значения среднеквадратичного отклонения? Учитывая, что значения энергии даны с точностью один знак после запятой, нет смысла для значений разности энергий («дрейф энергии») использовать 6 (!) знаков после запятой.

8. Единственным критерием выбора силового поля (AMBER vs OPLS-AA) служит сравнение с экспериментально измеренными функциями радиального распределения (ФРР), полученными для раствора пролина методом дифракции нейтронов. Однако при этом не сказано, в каких именно условиях проводили эксперимент (концентрация, рН и пр.). Насколько параметры наблюдаемых ФРР зависят от этих условий?

9. Ссылки приведены в нестандартном формате – имя первого автора фигурирует в них дважды.

10. Надписи по осям для целого ряда рисунков (например, 18-21, 27, 37) представлены на английском языке.

К недостаткам работы относятся и некоторые погрешности оформления. Отмечу, что автор использует ряд неудачных, жаргонных и некорректных выражений, например: «радиальная функция распределения» (стр. 3 и далее по тексту) вместо «функция радиального распределения», «имеют тенденцию к переносу протона водорода Н» (стр. 11), «в настоящее время большой популярностью применяются гибридные функционалы» (стр. 24), «вакуумный потенциал» (стр. 25), «атомно-молекулярных систем распределения электронной плотности» (стр. 43), «термостатированная система» (стр. 50 и далее по тексту), «газофазный комплекс» (стр. 51), «автокоррелятор» (стр. 63), «удлинение расстояний» (стр. 71).

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают высокой в целом оценки работы Май Бить Зунг. Высказанные замечания носят рекомендательный характер и служат для того, чтобы подчеркнуть сложность поставленных задач, которые были успешно решены автором. Работа выполнена на современном методическом уровне и содержит новые интересные научные данные. Полученные автором результаты, наряду с богатым справочным материалом, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся анализом структурных, динамических и спектральных свойств водородных связей в водных растворах биомолекул, но и специалистам в других областях – молекулярной биофизике, структурной биологии, медицинской химии. Подобные лаборатории и группы существуют в ВУЗах и научно-

исследовательских организациях – на ряде естественнонаучных факультетов МГУ им. М.В. Ломоносова, СПбГУ, НГУ и др., в Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и др.

Выносимые на защиту результаты опубликованы в виде одной статьи в реферируемом международном журнале (индексируется в библиографической базе данных Web of Science) и двух статей в профильных российских журналах из списка ВАК РФ, докладывались на российских научных конференциях. Автореферат правильно отражает содержание диссертации. Диссертация полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор, Май Бить Зунг, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика».

Официальный оппонент
доктор физико-математических наук, профессор,
Заведующий лабораторией моделирования биомолекулярных систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)



Р.Г. Ефремов

Адрес: ИБХ РАН, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия
Телефон: +7 495 330 58 74
Адрес электронной почты: r-efremov@yandex.ru

10 ноября 2016 г.

Подпись проф. Р.Г. Ефремова удостоверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН
д.ф.-м.н.



В.А. Олейников