

ОТЗЫВ

официального оппонента д.ф.-м.н. Чуева Геннадия Николаевича на диссертационную работу Неруха Дмитрия Александровича «Сложная динамика больших биомолекулярных систем в водных растворах», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.4 Биохимия и 1.5.8 Математическая биология, биоинформатика

Актуальность темы исследования

Биологические системы характеризуются широким разнообразием пространственно-временных масштабов. Но, по-видимому, наибольшую роль для функционирования биофизических объектов играют субмикронные (клеточные) размеры. Такие объекты включают миллиарды атомов. Быстрый прогресс в вычислительных возможностях позволяет надеяться, что такие системы начнут исследоваться уже в ближайшем будущем. Уже сейчас современные суперкомпьютеры способны моделировать молекулярные системы размером в сотни миллионов атомов в рамках классической молекулярной динамики (МД). Однако концептуальные физические ограничения алгоритма МД позволяют увеличивать масштабы систем лишь по пространству, тогда как рост временных интервалов значительно скромнее. На сегодняшний день максимально достижимые времена моделирования не превышают нескольких микросекунд, что делает атомистическое моделирование сложных макроскопических биологических объектов на больших временных масштабах принципиально невозможным. Одним из решений данной фундаментальной проблемы является переход к гибридным подходам, сочетающим атомистическое и непрерывное гидродинамическое описание среды в рамках единой вычислительной модели. Разработка и внедрение таких методов, основанных на корректном сопряжении дискретного и континуального подходов с сохранением фундаментальных законов сохранения (массы, импульса и энергии), представляет собой чрезвычайно актуальную задачу для современной биохимии, биофизики и молекулярной биологии. Практическая апробация подобных решений на макромолекулярных объектах — от простых водных растворов до полноатомных вирусных капсидов достаточно сложна и требует большого мастерства от исполнителя. Но ее успешный результат открывает принципиально новые возможности для понимания механизмов функционирования живых систем, исследования процессов сборки вирусов, а также направленного поиска новых фармакологически активных соединений.

Достоверность и новизна результатов диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования Неруха Д.А. обеспечивается совершенным теоретическим обоснованием разработанных подходов, корректной математической формулировкой уравнений движения, а также множественными и чрезвычайно аккуратными сопоставлениями расчетных параметров как с результатами классической молекулярной динамики и гидродинамики, так и с обширным массивом независимых экспериментальных биохимических данных. Масштабные вычисления выполнены на крупнейших мировых суперкомпьютерных комплексах (включая K-computer, Fugaku, MDGRAPE-4), что гарантирует высокую статистическую сходимость траекторий.

Научная новизна работы заключается в том, что в ней впервые:

- Разработана и программно реализована в пакете GROMACS универсальная гибридная модель жидкости, связывающая атомистическое описание с флуктуационной гидродинамикой Ландау-Лифшица с обеспечением консервативности по массе и импульсу в переходной зоне.
- Построены полноатомные МД-модели капсидов вирусов PCV2 и MS2, позволившие выявить критическую роль распределения ионов в обеспечении структурной устойчивости капсида и количественно оценить транспортные потоки воды и ионов через полупроницаемую вирусную оболочку.
- Обнаружен детерминированный хаотический характер молекулярных траекторий воды, а также доказано существование аномально долговременных временных корреляций, вносящих непосредственный вклад в конформационную динамику биомолекул.
- С использованием развитых подходов достигнуто количественное совпадение расчетных термодинамических и кинетических параметров (констант диссоциации, свободной энергии связывания лекарственных лигандов, механизмов поверхностной диффузии) с экспериментальными величинами.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертация Неруха Д.А. характеризуется высокой строгостью научной аргументации, логичностью и последовательностью построения этапов исследования — от фундаментальной теории и разработки программного кода до его применения в решении прикладных биохимических задач. Выносимые на защиту положения полностью обоснованы результатами проведенных численных экспериментов и валидированы независимыми методами. Выводы автора детально обсуждаются с привлечением современных литературных источников и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Ценность для науки и практики результатов работы

Теоретическая значимость исследования заключается в создании нового физически обоснованного подхода к многомасштабному моделированию биомолекулярных систем, эффективно преодолевающего временной барьер классической молекулярной динамики. Практическая ценность состоит в интеграции разработанных алгоритмов в общедоступный пакет GROMACS, что делает их готовым инструментом для широкого круга исследователей. Полученные атомистические модели вирусных оболочек имеют критически важное значение для корректной интерпретации и валидации данных современной криоэлектронной микроскопии высокого разрешения. Результаты исследования взаимодействия перспективных производных тиазолопиримидина с альбумином, а также изониазида с каталазой, вносят существенный вклад в медицинскую химию и создают платформу для доклинической оптимизации противоопухолевых и противотуберкулезных препаратов.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа Неруха Д.А. полностью соответствует паспортам заявленных научных специальностей 1.5.4 (Биохимия) и 1.5.8 (Математическая биология, биоинформатика) в части разработки математических моделей биологических

процессов, компьютерного анализа биомолекулярных систем и получения их количественных биохимических и физико-химических характеристик.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Основные результаты диссертационного исследования отражены в 59 печатных изданиях, включая 49 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, а также высокоцитируемых международных изданиях (Q1/Q2), что демонстрирует безусловное признание результатов работы мировым научным сообществом.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа изложена на 317 страницах, содержит 162 рисунка и 14 таблиц. Работа имеет классическую структуру и состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы (394 наименования) и 10 приложений. Автореферат полностью и адекватно отражает основное содержание и логику диссертации.

ГЛАВА 1. ГИБРИДНОЕ АТОМИСТИЧЕСКИ-ГИДРОДИНАМИЧЕСКОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ЖИДКОСТЕЙ И РАСТВОРОВ

Первая глава диссертации посвящена детальному изложению математической теории, выводу уравнений движения и программной реализации гибридного метода сопряжения атомистических и континуальных полей жидких сред. Автором постулируется, что на нанометровом и наносекундном масштабах классическая гидродинамика и атомистическое описание взаимно перекрываются, порождая необходимость в создании корректных интерфейсов связи.

Математический базис и законы сохранения

Существующие в литературе подходы типа *Coarse Graining* (крупнозернистые огрубленные модели, такие как силовое поле MARTINI или диссипативная динамика частиц DPD) зачастую нарушают локальный закон сохранения импульса или массы из-за нефизического характера квазичастиц и трудностей описания перетока масс между дискретной и непрерывной фазами. В противовес этому Д. А. Нерух строит модель на строгом сопряжении гамильтоновых уравнений МД и уравнений флуктуационной гидродинамики Навье-Стокса, модифицированных Ландау и Лифшицем для учета микроскопических флуктуаций посредством введения случайных тензоров напряжений.

Для плавного пространственного переключения между атомистической зоной (где растворитель представлен в виде молекул) и гидродинамической зоной (где жидкость описывается непрерывными полями плотности $\rho(r, t)$ и скорости $v(r, t)$) автором конструируется специальная пространственная функция переключения $s(r)$. Функция принимает значение 0 в зоне чистой МД (например, в непосредственной близости от

биомолекулы), плавно возрастает в промежуточной (гибридной) буферной зоне и достигает 1 в области чистой гидродинамики.

В приложении Б и В автором приводится строгий математический вывод гибридных уравнений движения в дифференциальной форме, базирующийся на законах сохранения массы и импульса:

1. **Сохранение массы:** Реализовано через непрерывное перераспределение плотности растворителя в ячейках гидродинамической сетки, согласованное с исчезновением или появлением атомистических молекул воды в буферной зоне.
2. **Сохранение импульса:** Обеспечивается введением двусторонней связи (*two-way coupling*), при которой силы, действующие со стороны гидродинамических потоков на атомы в гибридной зоне, в точности равны и противоположны по направлению силам отдачи, передаваемым от атомов в континуальное поле скоростей.

Помимо полной двусторонней модели, автором разработана и более экономичная упрощенная модель односторонней связи (*one-way coupling*), в которой макроскопический гидродинамический поток навязывает граничные условия атомистической системе, но обратное влияние атомов на макропоток игнорируется.

Тестовые модели и верификация метода

Для первичной верификации и отладки разработанного гибридного алгоритма автором использована двухмерная (2D) модель воды типа «Mercedes Benz» (MB), детально описывающая водородные связи в плоской геометрии. В подразд. 1.3.1–1.3.3 и 1.4.1 показано, что гибридная МД/гидродинамическая реализация модели MB строго воспроизводит термодинамические параметры, плотность и профили скоростей течения реальной жидкости.

Далее метод был масштабирован на трехмерные (3D) системы различной сложности:

- **Моделирование жидкого аргона:** Продемонстрировало сохранение импульса и корректное воспроизведение профилей сдвиговых течений на стыке зон.
- **Гибридное моделирование воды (модели SPC/E и TIP3P):** Автокорреляционные функции скоростей и среднеквадратичные смещения (MSD) молекул воды в гибридной схеме продемонстрировали расхождение с эталонной полноатомной МД в пределах всего 20%. Данное отклонение подробно объясняется автором эффектом малости МД-зоны и граничными эффектами взаимодействия на стыке фаз.
- **Раствор пептида диаланина:** Внутри МД-сферы ($s=0$) размещался цвиттерион диаланина, окруженный атомистической водой, переходящей на периферии в гидродинамическое поле. Конформационные флуктуации пептида полностью совпали с контрольными полноатомными расчетами.
- **Капсид вируса PCV2 в гибридном окружении:** Показана принципиальная применимость метода к суперкомпьютерному моделированию вирусов, где внешняя водная среда заменялась гидродинамическим континуумом, снижая размерность системы на миллионы атомов.

ГЛАВА 2. СЛОЖНОСТЬ РАСТВОРОВ БИМОЛЕКУЛ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ НЕЛИНЕЙНОЙ ДИНАМИКИ

Вторая глава диссертации представляет собой глубокое междисциплинарное исследование, лежащее на стыке статистической физики, теории динамического хаоса и теории информации. Автор ставит задачу отойти от тривиального описания траекторий МД через усредненные термодинамические показатели и взглянуть на молекулярное движение как на сложный детерминированный нелинейный процесс, обладающий внутренней структурой и памятью.

Количественная оценка долговременной памяти атомистических траекторий

В разделе 2.1 вводится оригинальная методология оценки «памяти» системы. Под памятью понимается способность текущего конформационного или динамического состояния системы сохранять информацию о своих прошлых состояниях на временах, существенно превышающих времена единичных атомных столкновений. С помощью анализа временных автокорреляционных функций и функций выживания конформационных состояний соискатель доказывает существование нетривиальной немарковской динамики в растворах. Траектории движения молекул воды вокруг белков демонстрируют выраженные долговременные степенные «хвосты» затухания корреляций, что указывает на сильное кооперативное влияние биомакромолекулы на структуру растворителя.

Оценка молекулярной сложности методами вычислительной механики

Ключевым инновационным элементом главы является применение теории вычислительной механики (*Computational Mechanics*) к анализу МД-траекторий. Метод базируется на дискретном разбиении молекулярного фазового пространства на конечные области (символьная динамика). Непрерывная многомерная траектория системы преобразуется в бесконечную символьную последовательность (временной ряд), которая затем анализируется алгоритмами построения так называемых ϵ -машин (причинных состояний системы).

ϵ -машины представляют собой минимальные и оптимальные марковские модели, способные полностью воспроизводить статистические закономерности исходного символьного ряда. Энтропия Шеннона, рассчитанная на распределении вероятностей этих причинных состояний, определяет **статистическую сложность** системы C_μ . Она задает количество информации в битах, которое необходимо удерживать о прошлом системы, чтобы эффективно прогнозировать ее будущее состояние.

Дифференциация динамического хаоса и стохастических процессов

Автор выдвигает и детально проверяет гипотезу о марковости траекторий. Главной проблемой классического анализа сложных сигналов является невозможность отличить истинно детерминированный динамический хаос высокой размерности от полностью случайного некоррелированного стохастического процесса (белого или цветного шума).

Для решения этой задачи Д. А. Нерух проводит численные эксперименты с генерацией «суррогатных» траекторий. Суррогатные ряды строятся путем случайного

перемешивания фаз исходного сигнала или перетасовки символов, что полностью разрушает временные детерминированные связи (память), но строго сохраняет одномерное статистическое распределение и спектральную плотность мощности исходной траектории.

Результаты анализа:

- Для чисто стохастических процессов статистическая сложность C_{μ} исходного и суррогатного рядов оказывается идентичной, стремясь к нулю или константе в зависимости от шага разбиения фазового пространства.
- Для реальных атомистических траекторий воды обнаружено резкое, статистически значимое расхождение между величинами сложности исходной траектории и ее суррогата.
- Это строго доказывает, что динамика молекул воды в растворе биомолекул представляет собой именно **детерминированный динамический хаос** с жесткой топологической структурой аттрактора и наличием скрытых нетривиальных долгоживущих корреляций, которые принципиально теряются при попытке описания системы простыми марковскими моделями случайных блужданий.

ГЛАВА 3. СТРУКТУРА И ДИНАМИКА ВИРУСОВ В МОДЕЛЯХ С АТОМИСТИЧЕСКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ

Третья глава посвящена практическому применению разработанных МД и гибридных подходов к моделированию целых вирусных оболочек (капсидов) в физиологических растворах. Это одна из наиболее вычислительно емких частей диссертации, потребовавшая привлечения суперкомпьютеров Fugaku и специализированного комплекса MDGRAPE-4.

Обзор полноатомного моделирования вирусов

В подразд. 3.1 автор приводит глубокий исторический и методологический анализ развития данной области. Первой вехой полноатомного моделирования вирусов в явном растворителе стала работа группы Клауса Шультена (2006 г.) по симуляции вируса сателлита табачной мозаики (STMV) диаметром 17 нм. Позднее симуляции полиовируса (размер системы около 4.5 млн атомов) выявили, что за времена порядка 200 нс молекулы воды активно диффундируют сквозь белковую стенку капсида, выравнивая внутреннее и внешнее давления, тогда как неорганические ионы проникнуть внутрь не способны, что определяет капсид как классическую полупроницаемую мембрану. Время полного обмена внутренней воды внешней составило около 25 мкс, что объясняет феноменальную механическую устойчивость вируса к гидростатическим ударам.

Полноатомное моделирование капсида бактериофага MS2

Автор осуществил сборку и расчет полной атомистической модели капсида бактериофага MS2, включающей структурно асимметричные элементы, такие как белок созревания (*maturation protein*), деформированные окружающие мономеры белка оболочки и экспериментально неразрешенную ранее петлю из аминокислотных

остатков 68–77. Координаты пропущенных гибких петель были реконструированы автором вручную и оптимизированы методом наискорейшего спуска до падения максимальной остаточной силы ниже 5000 кДж/(нм моль).

Основные результаты симуляции MS2:

- После длительного этапа релаксации структура капсида при комнатной температуре оказалась стабильной и продемонстрировала минимальные среднеквадратичные отклонения (RMSD) от экспериментальных данных крио-ЭМ. Небольшие отклонения зафиксированы лишь для трех лабильных аминокислотных остатков на внешней поверхности.
- Проведен детальный анализ распределения зарядов и динамики противоионов. Обнаружено пространственное расслоение: ионы хлора (Cl^-) формируют жестко локализованный конденсированный слой на внутренней поверхности капсида, нейтрализуя положительные заряды белковых доменов, тогда как противоионы натрия (Na^+) образуют размытый, диффузный слой на внешней стороне оболочки.
- Поры в капсиде MS2, в отличие от полиовируса, обеспечивают свободный двусторонний транспорт не только молекул воды, но и ионов солей.

Моделирование капсида свиного цирковируса типа 2 (PCV2)

Цирковирус PCV2 является одним из самых мелких известных вирусов, поражающих млекопитающих, его капсид обладает икосаэдрической симметрией и собран из 60 копий одного капсидного белка. Общий размер моделируемой системы составил 1.9 миллиона атомов. Расчеты проводились параллельно методами классической полноатомной МД и оригинальным гибридным методом МД/гидродинамики.

Результаты исследования стабильности и ионных потоков:

- Капсид сохраняет идеальную геометрию на протяжении всего времени симуляции. Подтверждено, что стенка капсида PCV2 функционирует как строгая полупроницаемая мембрана: зафиксирован непрерывный поток воды через поры, однако за все время симуляции ни один ион натрия или хлора не пересек белковую оболочку.
- Внутри пустого капсида (без вирусного генома ДНК) генерируется устойчивое отрицательное гидростатическое давление, обусловленное кулоновским притяжением ионов избыточными зарядами на внутренних аминокислотных остатках белка.
- Сопоставление траекторий чистой МД и гибридного метода МД/гидродинамики (рис. 3.15) показало практически полную идентичность профилей проникновения воды и пространственной стабильности вируса, что служит важнейшим актом валидации гибридной теории автора.

МД-моделирование капсидного белка PCV2 при постоянном значении pH

Для раскрытия тонких механизмов самосборки вирусной частицы соискатель применил передовой метод молекулярной динамики при постоянном значении pH (*constant-pH MD*). Данный подход позволяет аминокислотным остаткам (в первую очередь гистидинам, глутаматам и аспартатам) динамически менять свой заряд

(протонироваться и депротонироваться) в ходе симуляции в зависимости от локального электростатического окружения.

Была детально изучена сходимость значений констант кислотности pK_a ключевых остатков. Установлено, что изменение уровня pH среды индуцирует строго направленные конформационные перестройки в мономерных и димерных блоках капсидного белка. При физиологических значениях pH электростатический профиль интерфейсов связывания комплементарен, что катализирует спонтанную самосборку капсида. Сдвиг pH в кислую или щелочную сторону приводит к перезарядке ключевых аминокислот, возникновению кулоновского отталкивания на интерфейсах и блокированию процессов сборки оболочки, что раскрывает молекулярный механизм регуляции жизненного цикла вируса в клетке-хозяине.

ГЛАВА 4. БЕЛКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛОК-ЛИГАНД

Четвертая глава посвящена исследованию конформационной подвижности изолированных белков и пептидов, а также решению важнейшей прикладной задачи современной биохимии — расчету термодинамических и кинетических параметров комплексообразования белков с малыми молекулами (лигандами).

Немарковская динамика пептидов и роль растворителя

В подразд. 4.1 и 4.2 соискатель развивает немарковскую модель конформационной динамики пептидов на примере цвиттер-иона диаланина в воде. Традиционный анализ предполагает, что переходы между конформациями на карте Рамачандрана (между α -спиральной и β -складчатой областями) носят случайный характер с преодолением фиксированного энергетического барьера.

Д. А. Нерух математически доказывает, что динамика переходов жестко коррелирована с локальным движением молекул воды в первой гидратной оболочке пептида. Молекулы воды выступают в роли активного триггера и проводника конформационных перестроек, формируя долгоживущие сетки водородных связей, при этом сама траектория пептида обладает выраженной немарковской памятью.

Гипотеза «разбитого стекла» при самосборке трегалозы на лизоциме

В разделе 4.3 исследуется феномен криопротекторного действия дисахарида трегалозы на структуру белков. Методом МД смоделирован процесс спонтанной самосборки молекул трегалозы из пересыщенного водного раствора на поверхности модельного белка лизоцима.

На основании анализа траекторий автором сформулирована оригинальная гипотеза «разбитого стекла» (*broken glass hypothesis*). Согласно этой концепции, молекулы трегалозы при высушивании или замораживании не формируют регулярный кристалл, а образуют вокруг белка аморфную, стеклообразную матрицу. Данная матрица геометрически идеально адаптируется к сложной топологии поверхности белка, «консервирует» его нативную конформацию, жестко ограничивая крупномасштабные денатурационные флуктуации, и одновременно изолирует белок от деструктивного воздействия формирующихся макрокристаллов льда.

Диффузия лигандов на поверхности белка и расчет свободной энергии связывания (ABFE)

В подразд. 4.4–4.5 исследованы процессы стохастического поиска лигандами сайтов связывания на поверхности белков. В качестве прикладного объекта была выбрана серия новых синтетических соединений — производных тиазолопиримидина, рассматриваемых как перспективные кандидаты в противоопухолевые препараты, а в качестве белка-мишени — сывороточный альбумин.

Для расчета абсолютной свободной энергии связывания (ABFE) автором использован продвинутый автоматизированный протокол моделирования на базе программного модуля **BAT2** (*Binding Affinity Tool 2*). Процедура включала:

1. Подготовку высокоточных полноатомных структур белка альбумина и лигандов.
2. Проведение серии независимых МД-запусков с постепенным введением ограничивающих гармонических потенциалов на степени свободы лиганда в связывающем кармане.
3. Расчет энтальпийных и энтропийных вкладов методом термодинамического интегрирования.

Параллельно для верификации теоретических расчетов были проведены прямые биохимические эксперименты методом изотермического калориметрического титрования (ИКТ). Получено беспрецедентное количественное совпадение: теоретически рассчитанные значения свободной энергии взаимодействия серии веществ с альбумином совпали с экспериментальными калориметрическими данными в пределах стандартных погрешностей, что доказывает высочайшую предсказательную силу развитого МД-протокола.

Расчет константы скорости диссоциации белок-лиганд методом τ -RAMD

Финальный раздел главы (подразд. 4.6) посвящен расчету важнейшей кинетической характеристики — константы скорости диссоциации (k_{off}) комплекса белок-лиганд на примере противотуберкулезного препарата изониазида и его белковой мишени — каталазы. Прямой расчет времени диссоциации в классической МД невозможен, так как реальные времена жизни комплексов составляют секунды или минуты, что недостижимо даже для суперкомпьютеров.

Для преодоления временного барьера автором применен метод случайно ускоренной молекулярной динамики (τ -RAMD — *random acceleration molecular dynamics*). К центру масс лиганда прикладывается дополнительная искусственная сила фиксированной величины F , направление которой случайно флуктуирует во времени, что помогает лиганду преодолевать высокие активационные барьеры и покидать связывающий карман за наносекундные времена.

Замечания и пожелания к работе

Несмотря на общую фундаментальную и практическую значимость работы, по тексту диссертации и автореферата можно высказать следующие замечания:

1. В ряде разделов, посвященных гибридизации шкал (Глава 1), следовало бы представить более детальные рекомендации по выбору оптимального пространственного шага эйлеровой сетки для LL-FH фазы при переходе к существенно гетерогенным белковым средам.
2. При анализе хаотических траекторий воды во Второй главе используется разбиение непрерывного сигнала на 27 дискретных символов; автору следовало бы явно обосновать выбор именно такого размера алфавита в рамках подхода «Computational Mechanics».
3. На рисунках 3 и 4 графики функций радиального распределения и автокорреляции скорости приведены для широкого диапазона параметров s , однако из-за высокой плотности кривых визуальное дифференцирование промежуточных режимов несколько затруднено.
4. По тексту работы встречаются отдельные стилистические неточности и кальки с английского языка в специализированных терминах (например, использование сочетаний вроде «полноатомное представление капсида» вместо более традиционного «полноатомная модель капсида»).


Заключение

Диссертационная работа Неруха Дмитрия Александровича на тему «Сложная динамика больших биомолекулярных систем в водных растворах» является законченным фундаментальным научно-квалификационным исследованием, в котором решена серьезная научная проблема, имеющая важное значение для биохимии, биофизики и вычислительной биологии.

По объему, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация полностью удовлетворяет всем требованиям Положения о присуждении ученых степеней, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а её автор, Нерух Дмитрий Александрович, безусловно заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.4 Биохимия и 1.5.8 Математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент:

д.ф.-м.н., главный научный сотрудник ИТЭБ РАН

 Чуев Г.Н.

Подпись Чуева Г.Н. заверяю

*Учёной секретарь ИТЭБ РАН,
К.Б.И. Д.Д. Перевирва
17.06.2022*

