

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
**Шафраньоша Мирослава Івановича «Непружні зіткнення електронів
з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот»,**
подану на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук
за спеціальністю 01.04.04 – фізична електроніка

Дисертаційна робота Шафраньоша Мирослава Івановича «Непружні зіткнення електронів з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот» присвячена з'ясуванню механізмів перебігу фізичних процесів і структурних змін у такому біологічно значущому об'єкті як азотисті основи нуклеїнових кислот, спричинених низькоенергетичними електронами та фотонами, що й становить мету дослідження.

Актуальність теми дисертації Шафраньоша М.І. пов'язана з тим, що традиційні дослідження впливу високих доз радіації та високоенергетичного випромінювання на різні об'єкти, у першу чергу біологічного походження, не надали пояснення низці фізичних явищ на основі припущення лінійної залежності «доза-ефект», яка порушується за малих значень інтенсивності діючого чинника. Крім того, важливою тенденцією сучасних наукових досліджень, є застосування фізичних підходів та методів не тільки для розробки нових технологій, а й для безпосереднього захисту здоров'я людини за умов сучасного техногенного впливу довкілля. Тому застосування методів фізичної електроніки до дослідження такого важливого біологічного об'єкту як основи нуклеїнових кислот є актуальним вибором: знання усіх можливих фізичних механізмів пошкодження носія генетичної інформації конче необхідно для забезпечення безпечних умов існування людини.

Наукові роботи Шафраньоша М.І. є логічним продовженням досліджень процесів взаємодії низькоенергетичних електронів з біомолекулярними структурами, започаткованих в Ужгородському національному університеті кілька десятиріч тому. Вони базуються на застосуванні нових методичних підходів та технологій, які було розроблено останніми роками, і які дозволяють отримувати якісно нову інформацію. Дисертаційна робота включає результати досліджень, які проводилися Шафраньошом М.І. у Проблемній науково-дослідній лабораторії фізичної електроніки і які є складовими частинами чотирьох держбюджетних науково-дослідних тем (перелічених у рефераті), затверджених Міністерством освіти і науки України на конкурсній основі з ретельним фаховим рецензуванням.

Повнота викладу результатів в наукових публікаціях. Наукові результати докторської дисертації Шафраньоша М.І. представлено у монографії, двох підручниках, у 24 публікаціях у вітчизняних і міжнародних наукових журналах, з яких 10 – у фахових виданнях, а 14 – у виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus,

включаючи журнали, віднесені до першого і третього кuartилів (Q1 і Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal & Country Rank, зокрема стаття у Journal of Physical Chemistry, Q1, прирівнюється до трьох публікацій, а три статті у журналах третього кuartилю Q3 - Surface Engineering and Applied Electrochemistry, Journal of Physical Studies, Ukrainian Journal of Physics - зараховуються як шість публікацій. Наукові результати пройшли апробацію на національних та міжнародних конференціях та опубліковані у 53 тезах у збірниках доповідей, виданих на цих наукових заходах.

Докторська дисертація Шафраньоша М.І. **оформлена** у відповідності до Вимог до оформлення дисертації, затверджених наказом МОН України № 40 від 12 січня 2017 року. Представлена робота складається із вступу, огляду літературних джерел, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів досліджень і їхнього обговорення, які структуровані у п'яти розділах, висновків і переліку використаних джерел, який налічує 403 найменування. Обсяг дисертації становить 381 сторінок машинописного тексту. Дисертація містить 167 рисунків і 30 таблиць.

У **вступі** дисертації обґрунтовано актуальність теми дисертації, сформульовано мету та задачі досліджень, описано новизну, наукове й практичне значення роботи. Визначено особистий внесок здобувача, наведено дані стосовно публікації наукових праць за темою дисертації та апробації результатів роботи.

У **Розділі 1** “Основні закономірності взаємодії випромінювання з біомолекулами” виконано аналіз стану проблеми на базі критичної оцінки інформації з сучасних літературних джерел. Порівнюються первинні процеси поглинання енергії при фізичних взаємодіях з речовиною для електромагнітних і корпускулярних випромінювань і постулюється, що найістотнішою особливістю іонізуючого випромінювання різної природи є його здатність прямо або побічно приводити до виникнення іонізованих атомів і молекул. Представлено сучасні погляди на проблему впливу низькоенергетичних електронів та ультрафіолетового (УФ) випромінювання на важливі біомолекулярні структури, нуклеїнові кислоти в першу чергу. Показано, що метод газозфазної мас-спектрометрії з іонізацією електронами надає можливість виконувати прямі високоточні дослідження процесів зіткнень повільних електронів з молекулярними складовими нуклеїнових кислот. Розділ закінчується резюме літературного огляду та постановкою задачі дослідження.

Розділ 2 “Експериментальний комплекс та методики проведення досліджень” присвячено характеристиці об'єктів та опис техніки і методів експериментів. У якості біологічно-значущих молекул, на прикладі яких досліджували вплив електронів та УФ опромінення, були обрані складові нуклеїнових кислот - канонічні азотисті основи: цитозин, тимін, урацил, аденін та гуанін, а також деякі їх похідні. Ці молекули досліджували у різних станах: в ізольованому газоподібному та конденсованому, у розчинах, у

плівках та біологічних тканинах, що дозволяє отримати комплексну інформацію як про прямі процеси, так і про опосередковані, зокрема з участю міжмолекулярних взаємодій

Далі приведено опис експериментальних установок для вивчення збудження та іонізації біомолекул при їх взаємодії з повільними електронами з використанням методу електронного і молекулярного пучків, що перетинаються; для визначення повних перерізів утворення позитивних і негативних іонів; для визначення парціальних перерізів утворення позитивних іонів. Мас-спектри позитивних іонів, що утворились внаслідок зіткнень повільних електронів із складовими нуклеїнових кислот, вивчалися за допомогою експериментальної установки на базі мас-спектрометра МІ-1201. Вплив УФ випромінювання на біоструктури аналізували методами абсорбційної ІЧ та УФ спектроскопії, а також діелектрометричним методом. Розрахунки здійснювали за допомогою методів AM1, PM3, DFT.

У **Розділі 3** “Процеси збудження азотистих основ нуклеїнових кислот повільними електронами” приводяться результати спектрального вивчення люмінесценції молекулярних складових нуклеїнових кислот при дії електронного пучка, енергія якого сканувалась у діапазоні 0-200 еВ. Спектри випромінювання молекул основ та продуктів їх іонізації свідчать про те, що електронний удар ініціює у молекулах кілька фізичних процесів: збудження електронних станів як цілої молекули, так і її іонізованих чи нейтральних фрагментів – дисоціативне збудження та дисоціативне збудження з іонізацією. Для коректної ідентифікації спектральних смуг були враховані дані про ефективні перерізи збудження окремих фрагментів досліджуваних молекул електронним ударом та дані про їх ефективні перерізи повної та дисоціативної іонізації, а також результати мас-спектрометричних досліджень. Крім цього були розраховані енергетичні рівні електронного збудження, порядки зв'язків та розподіл густини електричних зарядів у молекулах.

Розділ 4 “Іонізація молекулярних складових нуклеїнових кислот електронним ударом” присвячено результатам досліджень енергетичних залежностей (функцій іонізації) повних перерізів (імовірностей) утворення позитивних і негативних іонів аденіну та гуаніну в інтервалі енергій електронів, що налітають, від порогових значень до 200 еВ. Серед методично отриманих та ретельно оброблених даних найбільш важливим і, в деякій мірі неочікуваним, є спостереження резонансного захоплення електрону при його досить низьких енергіях: енергетичне положення максимуму резонансу для аденіну – 1,2 еВ, для гуаніну – 1,2 еВ. Визначено пороги утворення позитивних іонів для аденіну – $8,8 \pm 0,2$ еВ, та для гуаніну – $8,3 \pm 0,2$ еВ. Отримані результати мають чіткий фізичний та біофізичний сенс а саме: фактором, що пошкоджує азотні основи нуклеїнових кислот, є не тільки утворення збуджених позитивних іонів під дією електронів відносно високих енергій, а й утворення негативних іонів при захопленні низько енергетичних електронів. Обидва типи іонів стають центрами деградації біомолекул. Експериментальні дані підкріплені результатами квантово-хімічних

розрахунків. Отримана інформація вельми важлива для моделювання поглинання і розподілу енергії у біологічному середовищі і для розуміння електронних процесів у біомолекулах.

У **Розділі 5** “Вплив ультрафіолетового випромінювання на нуклеїнові кислоти” приведено результати досліджень особливостей дії УФ випромінювання різних енергій на нуклеїнові кислоти та їх компоненти *in vitro* та *in vivo*. Методи інфрачервоної спектроскопії та діелектрометрії застосовано для вивчення впливу ультрафіолетового випромінювання довжиною хвилі 337 нм (лазерного і некогерентного) на молекули нуклеїнових кислот у конденсованому стані – у плівках та у розчинах. Досліджена кінетика деспіралізації ДНК у розчинах при опроміненні УФ різної природи та встановлено, що, на відміну від ультрафіолетового некогерентного випромінювання, лазерне випромінювання тих же енергій може спричинювати істотні пошкодження в біомолекулах за рахунок нелінійних ефектів, а саме – двоквантового поглинання світла молекулами барвників. Виявлені зміни у системі водневих зв’язків, стабілізуючих вторинну структуру ДНК.

На основі узагальнення отриманих даних запропоновано модель дії повільних електронів у механізмах генодеструктивної дії радіації, яка включає етапи збудження, іонізації та фрагментації компонентів нуклеїнових кислот.

У **Висновках** перелічується основний фактичний матеріал, який дозволив вирішити поставлену на меті наукову проблему з’ясування особливостей фізичних процесів та структурних змін у молекулах нуклеїнових кислот, спричинених низькоенергетичними випромінюваннями, на основі якого робляться узагальнення стосовно механізмів біофізичної дії повільних електронів та УФ опромінення.

Зміст дисертаційної роботи Шафраньоша М.І. повністю відповідає паспорту спеціальності 01.04.04 – фізична електроніка.

Дисертаційна робота Шафраньоша М.І. написана фаховою українською мовою з дотриманням вимог наукового стилю. Дисертація супроводжується рефератом, який містить загальну характеристику роботи та чітко висвітлює основний зміст проведених досліджень та отриманих результатів.

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій дисертаційної роботи Шафраньоша М.І. визначається застосуванням в дослідженнях комплексу надійних експериментальних методик та теоретичних квантово-механічних розрахункових методів, що дозволило отримати достовірні результати та зробити чіткі та логічні висновки. Надані в роботі рекомендації щодо застосування отриманих результатів, зокрема у біофізичній галузі, є обґрунтованими та мають значну практичну цінність.

Новизна, загальнонаціональне та світове значення отриманих результатів. Новизна та оригінальність представлених в дисертаційній роботі Шафраньоша М.І. результатів та їх значення для розвитку національної та міжнародної науки об'єктивно підтверджується фактом їх публікації в високореєтингових спеціалізованих наукових виданнях, де статті пройшли ретельне незалежне фахове рецензування.

Отримані у роботі результати частково увійшли до складу кількох підручників, що використовуються у навчальному процесі Ужгородського національного університету при читанні лекцій з фізичної електроніки, атомної фізики, фізики електронних зіткнень, біофізики, радіобіології, екології. Відзначу, що експериментальні дані, отримані Шафраньошем М.І. з співавторами використовуються також у спецкурсі «Біофізична мас-спектрометрія», який викладається безпосередньо мною для магістерського рівня на кафедрі молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна; відповідний розділ щорічно поповнюється новими даними, що надходять з Ужгорода. Результати дисертації можуть бути або вже знайшли застосування і в інших наукових закладах України, де є спеціалізації «Фізична електроніка» та «Біофізика».

Серед нових, отриманих вперше найбільш вагомих наукових результатів можна виділити наступні.

1. Вперше експериментально визначені абсолютні величини ефективних перерізів утворення позитивних іонів пуринових основ нуклеїнових кислот аденіну і гуаніну та енергетичні залежності перерізів іонізації (функції іонізації) в інтервалі енергій бомбардуючих електронів від порогу до 200 еВ. Досліджені мас-спектри молекул аденіну та гуаніну при їх іонізації в умовах молекулярного та електронного пучків, що перетинаються. Показано, що найбільші перерізи (ймовірності) утворення позитивних іонів при даних енергіях електронів властиві молекулярним іонам, що свідчить про відносну стабільність молекулярних носіїв генетичної інформації.

2. Вперше визначені абсолютні величини ефективних перерізів утворення негативних іонів компонентів нуклеїнових кислот, аденіну та гуаніну, та енергетичні залежності перерізів іонізації (функції іонізації) у діапазоні енергій електронів від 0,3 до 5 еВ. Показано, що процеси утворення негативних іонів при зіткненнях низькоенергетичних електронів з біомолекулами мають нелінійний резонансний характер, а електронне захоплення молекулами аденіну і гуаніну відбувається за механізмом Фешбахівського коливально-збудженого резонансу.

3. Вперше отримані спектри люмінесценції нуклеотидних основ тиміну, урацилу, цитозину, аденіну і гуаніну в діапазоні довжин хвиль від 200 до 600 нм. Здійснено ідентифікацію інтенсивних молекулярних смуг в емісійних спектрах вказаних молекул. Показано, що переважна частина спектральних артефактів пов'язана із процесами дисоціативного збудження та дисоціативного збудження з іонізацією.

4. Вперше досліджено фотолюмінесценцію нейтральних розчинів цитозину та гуаніну при одночасній дії випромінювання ксенонової лампи з довжиною хвилі $\lambda = 280$ нм та лазера з довжиною хвилі $\lambda = 530$ нм. Виявлено, що для кривих люмінесценції характерним є наявність широкого максимуму в спектральному інтервалі $\sim 365\text{--}380$ нм та додаткового максимуму при довжині хвилі $\lambda \sim 410$ нм. Показано, що максимуми в інтервалі довжин хвиль $\sim 365 - 380$ нм відображають флуоресценцію, а максимуми при $\lambda \sim 410$ нм фосфоресценцію.

Для подальших наукових досліджень важливо, що виявлені фізичні процеси, ініційовані впливом низькоенергетичного випромінювання у біоорганічних структурах, можуть призвести до різноманітних біологічних наслідків. Зокрема, електрони, руйнуючи молекули основ, викликатимуть появу точкових мутацій: делецій, трансверсій, транзицій. Порушення процесів транскрипції і трансляції може спричинити генотоксичні і мутагенні ефекти у клітинах, генетичні і соматичні зміни організму.

Відсутність (наявність) академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Дисертація «Непружні зіткнення електронів з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот», як кваліфікаційна наукова праця, підготовлена здобувачем самостійно. Використані в дисертації та в наукових публікаціях ідеї та результати досліджень інших науковців мають відповідні посилання. В дисертації та наукових публікаціях наводяться оригінальні експериментальні спектри та графіки, які незалежно можуть бути проаналізовані читачем. Зроблені в роботі висновки добре узгоджуються з існуючими (описаними в літературі) фізичними уявленнями. Все це вказує на відсутність ознак фабрикації або фальсифікації в проведених дослідженнях та на повну відповідність дисертації вимогам академічної доброчесності.

Особистий внесок здобувача детально розписаний у рефераті для кожної з опублікованих статей і він є вирішальним. Він полягає в ініціюванні нового напрямку досліджень з вивчення особливостей взаємодії низькоенергетичних електронів з молекулами, які мають біологічне значення; у постановці експериментів для моделювання фізичних наслідків фізичних процесів (а саме: збудження, іонізації та дисоціації), викликаних в біомолекулах електронним ударом та ультрафіолетовим випромінюванням, в узагальненні отриманих результатів та написанні статей.

Зауваження, дискусійні питання та рекомендації стосовно положень докторської дисертації.

Високо оцінюючи новизну, наукове та практичне значення отриманих в рамках докторської дисертації Шафраньоша М.І. результатів, хотілося б надати наступні зауваження та рекомендації, які виникли під час вивчення тексту дисертації:

1. Одночасно з появою нової наукової інформації відбувається формування та удосконалення наукової термінології - як англомовної, так і мовами незалежних держав. Історично у публікаціях та далі в тексті дисертації використовувався термін «електронний удар» (“electron impact”), який, за останніми рекомендаціями IUPAC, вважається застарілим і повинен замінюватися більш фізичним терміном «іонізація електронами» (“electron ionisation”).
2. Незважаючи на те, що дослідження дисертаційної роботи носять суто фізичний характер, отримані результати інтерпретуються з точки зору впливу фізичних факторів на біомолекули – компоненти нуклеїнових кислот. Але на носії генетичної інформації впливає ще багато чинників, зокрема хімічних (модифікації, мутагенез, тощо), тому бажано було б побачити в тексті дисертації більш ґрунтовне порівняння впливу фізичних та хімічних факторів. А саме, чим відрізняються відповідні механізми, та який з них – фізичний або хімічний – наносить більше пошкоджень або робить більший внесок у загальні пошкодження нуклеїнових кислот. Також можна рекомендувати розглянути отримані результати у контексті сучасних методів променевої терапії онкологічних захворювань і, можливо, сформулювати поради стосовно оптимізації відповідних біомедичних приладів.
3. До ключових слів можна було б додати таку важливу складову експериментальних досліджень як «елементарні процеси іонізації» або «взаємодія електронів з молекулами», а також «перерізи утворення а позитивних і негативних іонів».
4. У маркуванні осей на Рис.1.22 – 1.24 розмірність «а.о.м.» є зайвою, бо величина m/z за домовленістю є безрозмірною.
5. На зображеннях мас-спектрів на Рис. 3.24, п. 4.1, 4.2 в тексті дисертації та на Рис. 8 в рефераті для полегшення сприйняття поруч з піками бажано додати позначення відповідних структур – молекулярного іону M^+ та встановлений склад фрагментних іонів.
6. Деякі з дванадцяти висновків, які займають більш ніж 10 рядків та перевантажені цифровим матеріалом, важко сприймаються.

Надані зауваження та рекомендації ніяким чином не впливають на загальну високу позитивну оцінку докторської дисертації Шафраньоша М.І.

Таким чином, за обсягом та якістю проведених досліджень, актуальністю вирішених проблем, новизною та обґрунтованістю наукових положень та висновків, за достовірністю отриманих наукових результатів, повнотою їх висвітлення в наукових публікаціях та їх викладення у тексті дисертації та авторефераті з дотриманням принципів академічної доброчесності, дисертаційна робота **«Непружні зіткнення електронів з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот»**, повністю відповідає всім вимогам пп. 7 та 9 Порядку присудження та позбавлення наукового

ступеня доктора наук, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197, щодо докторських дисертацій, а її автор **Шафраньош Мирослав Іванович** заслуговує на присудження йому наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.04 – фізична електроніка.

Провідний науковий співробітник
відділу молекулярної біофізики
Фізико-технічного інституту низьких
температур ім. Б.І.Веркіна НАН України,
доктор фізико-математичних наук,
старший науковий співробітник

Косевич / КОСЕВИЧ М.В. /

30 серпня 2024 року

