

ВІДГУК

офіційного опонента професора кафедри фізичної електроніки факультету радіофізики, електроніки та комп'ютерних систем Київського національного університету імені Тараса Шевченка доктора фізико-математичних наук, професора **ЧЕРНЯКА Валерія Яковича** на дисертаційну роботу **Шафраньоша Мирослава Івановича** на тему **«Непружні зіткнення електронів з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот»**, яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.04 - фізична електроніка.

Актуальність теми дисертації

Дисертаційна робота М.І. Шафраньоша присвячена вивченню фізичних та хімічних аспектів різноманітних процесів взаємодії таких важливих компонентів нуклеїнових кислот як молекул азотистих основ цитозину, тиміну, урацил (похідних піримідину), аденіну, гуаніну (похідних пуринів) з низькоенергетичними частинками – електронами та фотонами. Серед вказаних фізичних процесів особливо важливими є такі: збудження, іонізація, дисоціація та дисоціативні іонізація і збудження, захоплення частинок з подальшою фрагментацією. Особливо актуальним, насамперед, представляється експериментальне вивчення фізичних характеристик перебігу цих реакцій, ймовірностей, енергетичних характеристик, порогів реакцій, ефективних перерізів взаємодій.

На сьогодні відомо, що при проходженні високоенергетичних частинок (електронів, фотонів, іонів) крізь біоструктури в них генерується велика кількість так званих вторинних електронів з енергіями від десятків долей до десятків електронвольт. В свою чергу вторинні електрони ефективно непружньо взаємодіють з азотистими основами нуклеїнових кислот, кардинально змінюючи їх природний енергетичний стан який забезпечує стабільність зв'язків у комплементарних пар азотистих основ, синтез білків і функціонування нуклеїнових кислот як генетичних носіїв інформації. Саме тому з вторинними електронами пов'язана лівова частина деструктивних змін в носіях генетичної інформації в макромолекулах ДНК та РНК. В прикладному аспекті широке використання радіаційної терапії в таких областях, як медицина, генетика, хімічна інженерія та біомедична інженерія потребує пошуку нових та удосконалення наявних методів радіотерапевтичного впливу на живі організми, в тому числі радіосенсибілізації онкопатологічних тканин людини та розкриття механізмів різних генетичних відхилень. Поряд з цим, кількість досліджень, направлених на вивчення процесів непружних

взаємодій складових молекул НК під дією фотонів та електронів є невеликим.

Вищенаведене визначає незаперечну актуальність тематики виконаних у дисертаційній роботі досліджень процесів непружної взаємодії повільних електронів та фотонів з біологічними молекулами, зокрема, з точки зору встановлення механізмів руйнування структури первинних молекул.

Оцінка обґрунтованості наукових результатів дисертації, їх достовірності та новизни.

Наукова новизна дослідження та отриманих результатів. Серед наукових результатів, отриманих у дисертаційній роботі М.І. Шафраньоша, за науковою новизною, на мою думку, заслуговують особливої уваги такі основні пункти:

1. Вперше оптичним та електричним методами здійснені комплексні дослідження процесів збудження, іонізації та дисоціації молекул основ нуклеїнових кислот у газовій фазі низькоенергетичними монокінетичними електронами.

2. 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. Переважна частина спектральних артефактів пов'язана із процесами дисоціативного збудження та дисоціативного збудження з іонізацією. Показано, що найбільш інтенсивні молекулярні смуги із максимумами при довжинах хвиль 275–290 нм зумовлені радіаційним розпадом першого збудженого електронно-коливного стану молекулярного іону в його основний стан. Встановлені енергетичні залежності перерізів збудження (функції збудження) молекулярних смуг та проаналізовано їхні особливості: енергетичні пороги, форму функцій, положення максимумів. Аналіз функцій збудження показав наявність інтеркомбінаційних переходів з утворенням триплетних метастабільних станів молекул нуклеотидних основ. Виявлено пряме збудження триплетних метастабільних станів біомолекул електронним ударом.

3. 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 ~ 365 – 380 нм та додаткового максимуму при довжині хвилі $\lambda \sim 410$ нм. Показано, що максимуми в інтервалі довжин хвиль ~ 365 – 380 нм відображають флуоресценцію, а максимуми при $\lambda \sim 410$ нм фосфоресценцію.

4. Вперше експериментальним шляхом визначені абсолютні величини ефективних перерізів утворення позитивних іонів пуринових основ нуклеїнових кислот аденіну та гуаніну та енергетичні залежності перерізів іонізації (функції іонізації) в інтервалі енергій бомбардуючих електронів від порогу до 200 еВ. Визначені енергетичні пороги утворення позитивних іонів. Досліджені мас-спектри молекул аденіну та гуаніну при їх іонізації в умовах молекулярного та електронного пучків, що перетинаються. Детально проаналізовані шляхи фрагментації азотистих основ нуклеїнових кислот під дією електронів. Визначені парціальні перерізи (перерізи утворення іонних фрагментів) молекул основ. Показано, що найбільші перерізи (ймовірності) утворення позитивних іонів при даних енергіях електронів властиві молекулярним іонам, що свідчить про відносну стабільність молекулярних носіїв генетичної інформації. Визначені абсолютні величини парціальних перерізів іонізації аденіну та гуаніну.

5. Вперше експериментальним шляхом 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. На основі співставлення теоретичних розрахунків, виконаних напівемпіричним квантово-хімічним методом AM1, із експериментальними результатами встановлені домінуючі шляхи дисоціації негативних іонів нуклеотидних основ. Показано, що електронне захоплення молекулами аденіну і гуаніну відбувається за механізмом Фешбахівського коливально-збудженого резонансу.

6. Вперше отримані плівки цитозину, гуаніну та їх комплексу методом вакуумного термічного напилення. Також вперше виміряні інфрачервоні спектри поглинання контрольних та підданих дії ультрафіолетового світла ($E = 3,68$ еВ) плівок у діапазоні від 1100 до 3600 cm^{-1} . З'ясовано, що в усіх плівках наявні різнотипні гідратовмісні асоціати. Запропоновано можливі механізми впливу ультрафіолету з $E = 3,68$ еВ на молекулярні плівки: опромінення провокує перерозподіл відносного вмісту гідратоасоціатів азотистих основ, імовірно за рахунок УФ-стимульованої додаткової абсорбції плівками молекул води з повітря.

7. Виконане квантово-хімічне вивчення різнотипних асоціатів цитозину для моделювання міжмолекулярних взаємодій у плівках. Встановлено, що розраховані частоти та інтенсивності нормальних коливань суттєво залежать від кількості молекул в асоціаті. Важливо, що при збільшенні кількості молекул в асоціаті зростає інтенсивність поглинання у довгохвильовій області ($E < 4$ еВ), що вказує на можливість прямої дії на досліджувані молекули ультрафіолету даного діапазону.

8. Кінетичні та діелектрометричні дослідження ДНК *in vitro* показали, що ультрафіолетове випромінювання (лазерне і некогерентне) спричинює зміни вторинної структури ДНК і кластеризацію розчинів.

9. Вплив довгохвильового ультрафіолетового випромінювання на ДНК *in vivo* досліджений на біологічній моделі за критеріями зміни швидкості регенерації. Показано, що УФ промені з $E = 3,68$ eV сповільнюють швидкість регенерації, що свідчить про те, що наведений фактор впливу пригнічує функціональну активність ДНК, в тому числі і завдяки зміні міжмолекулярних взаємодій.

До **основних задач**, які були поставлені та успішно розв'язані у даній роботі, слід віднести: створення експериментального комплексу для дослідження фізичних взаємодій низькоенергетичних електронів з біомолекулами у газовому стані; розробку експериментальних методик для вивчення процесів збудження, іонізації та дисоціації молекул основ нуклеїнових кислот електронним ударом; проведення спектральних досліджень збуджених електронним ударом молекул основ нуклеїнових кислот; отримання та аналіз енергетичних залежностей перерізів збудження (функцій збудження) біомолекул; здійснення мас-спектрометричного аналізу особливостей формування позитивних і негативних іонів молекул компонентів нуклеїнових кислот при їх взаємодії з низькоенергетичними електронами; дослідження іонізації молекул азотистих основ для визначення: а) повних ефективних перерізів утворення позитивних іонів і їх функцій іонізації; в) парціальних перерізів формування позитивних іонів; г) повних ефективних перерізів утворення негативних іонів досліджуваних молекул та їх енергетичних залежностей. Автором було поставлено та вирішено важливу задачу дослідження спектрів люмінесценції складових ДНК

Крім того, отримні дисертантом експериментальні результати доповнені теоретичними *ab initio* розрахунками. За допомогою такого підходу можна дослідити природу зв'язків, геометрію та електронну структуру біомолекул та надати фундаментальні знання, які у подальшому можна використовувати при створенні біоінтерфейсів.

Вибір досліджуваних молекул – основ ДНК та РНК – є обґрунтованим та виправданим, оскільки, як зазначено вище, ці об'єкти є одними з найбільш "вразливих" мішеней пагубної дії іонізуючого випромінювання та вторинних заряджених частинок.

Практична доцільність дисертаційної роботи визначається принциповою можливістю використання результатів досліджень у радіаційній біології, для розробки нових методів радіотерапії, оцінки ефективності використання іонізуючого випромінювання у сучасній медицині. Крім того, одержані результати можуть стати корисними при

розробці нових матеріалів біо- та наноелектроніки, у створенні нових методик біологічної та генної інженерії.

У дисертації отримано ряд нових і цікавих результатів. Серед них слід особливо відмітити спектри люмінесценції нуклеотидних основ тиміну, урацилу, цитозину, аденіну і гуаніну в діапазоні довжин хвиль від 200 до 600 нм, абсолютні величини повних утворення позитивних іонів молекул основ нуклеїнових кислот; 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, абсолютні величини ефективних перерізів утворення позитивних іонів пуринових основ нуклеїнових кислот аденіну та гуаніну та енергетичні залежності перерізів іонізації (функції іонізації) в інтервалі енергій бомбардуючих електронів від порогу до 200 еВ. енергетичні пороги утворення позитивних іонів вищевказаних молекул, мас-спектри молекул аденіну та гуаніну при їх іонізації в умовах молекулярного та електронного пучків, що перетинаються, проаналізовані шляхи фрагментації азотистих основ нуклеїнових кислот під дією електронів, 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. При виконанні роботи була розроблена та реалізована оригінальна абсорбційна методика визначення концентрації молекул у пучку за масою утвореного конденсату досліджуваної речовини.

Достовірність отриманих у роботі нових даних, їх новизна і наукова вагомість не викликають сумнівів. Це підтверджується багаточисельними дослідженнями, результати яких мають високу відтворюваність, а застосування сучасних методик виділення корисного сигналу, накопичення і обробки даних досліджень, залучення теоретичних методик і співставлення отриманих результатів з наявними у літературі (у тому числі у сучасних базах даних). При проведенні експериментів були реалізовані умови однократності зіткнень, було забезпечено багатократність та циклічність вимірювань, проведено ретельний аналіз похибок експерименту, якому присвячено окремий пункт дисертаційної роботи. Отримання наукових результатів у дисертаційній роботі М.І. Шафраньоша спиралося на значний досвід Ужгородської наукової школи з фізики електрон-атомних (молекулярних) зіткнень та, зокрема, на багаторічний досвід експериментальної групи, де виконувалася робота, у області дослідження молекул біологічного призначення.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій; сформульованих у дисертації.

Порівняння висновків, одержаних на основі результатів, здобутих різними методами, а також з результатами інших дослідницьких груп для об'єктів подібного типу, забезпечує об'єктивність і збалансованість

проведеного аналізу і зроблених на його основі висновків. Отже, в дисертаційній роботі поставлене наукове завдання виконано повністю, здобувач повною мірою оволодів методологією наукової діяльності.

За своїм змістом дисертаційна робота здобувача повністю відповідає Стандарту вищої освіти зі спеціальності 104 «Фізика та астрономія» та напрямкам досліджень відповідно до освітньо-наукової програми «Фізика та астрономія».

Дисертаційна робота є завершеною науковою працею і свідчить про наявність особистого внеску здобувачки у науковий напрям «Фізика та астрономія»

Розглянувши звіт подібності за результатами перевірки дисертаційної роботи на текстові співпадіння, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Шафраньоша Мирослава Івановича є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів фальсифікації, компіляції, фабрикації, плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають належні посилання на відповідне джерело.

Мова та стиль викладення результатів

Дисертаційна робота написана гарною українською мовою, добре оформлена, містить наглядні ілюстрації. Викладення матеріалу є послідовним і логічним, супроводжується обґрунтованими висновками. В тексті є окремі стилістичні огріхи, які не заважають сприйняттю та розумінню матеріалу. Представлена робота складається із вступу, огляду літературних джерел, матеріалів та методів дослідження, особистих результатів досліджень і їхнього обговорення, які викладено у п'яти розділах, висновків і переліку використаної літератури, який налічує 403 найменувань. Зміст дисертації викладено на 381 сторінках машинописного тексту. Робота містить 167 рисунків і 30 таблиць.

У вступі обґрунтована актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовані мета та завдання досліджень, відзначена наукову новизна та практичне значення отриманих результатів. Поданий зв'язок роботи з науковими програмами, відмічений особистий внесок автора, апробацію результатів роботи та публікації наукових праць за темою дисертації, дані про структуру та обсяг дисертаційної роботи.

В першому розділі приведений аналіз наукової літератури за темою дисертації. Порівнюються первинні процеси поглинання енергії при фізичних взаємодіях з речовиною для електромагнітних і корпускулярних випромінювань.

Другий розділ містить опис експериментального комплексу та методики та техніки проведення досліджень. Особливістю роботи є дослідження молекул в ізольованому (газоподібному) стані і в конденсованому стані (плівки, розчини, біотканини), що дає змогу співставити дані, виділити первинні фізичні процеси і глибше зрозуміти роль міжмолекулярних взаємодій. Автором для досліджень були вибрані молекули НК та їх складові – канонічні азотисті основи: цитозин, тимін, урацил, аденін та гуанін. Вивчення збудження та іонізації біомолекул при їх взаємодії з повільними електронами проводилися на експериментальних установках з використанням методу електронного і молекулярного пучків, що перетинаються.

Третьому розділ присвячений спектральному вивченню люмінесценції молекулярних складових НК при дії електронного пучка, енергія якого сканувалась у діапазоні 0–200 еВ. У роботі експериментально отримані спектри випромінювання цитозину, тиміну, урацилу, метилцитозину, аденіну та гуаніну в області довжин хвиль 200–600 нм для різних енергій налітаючих електронів.

В четвертому розділі представлені та обговорюються результати досліджень утворення позитивних і негативних іонів аденіну та гуаніну в інтервалі енергій налітаючих електронів від порогових значень до 200 еВ. На думку опонента, інформація про ефективні перерізи іонізації є важливою для моделювання поглинання і розподілу енергії у біологічному середовищі та для розуміння електронних процесів у молекулах.

В п'ятому розділі приведені результати досліджень особливостей дії ультрафіолету (УФ) різних енергій на НК та їх компоненти *in vitro* та *in vivo*. З використанням методів інфрачервоної спектроскопії та діелектрометрії проведено вивчення впливу ультрафіолетового випромінювання довжиною хвилі 337 нм (лазерного і некогерентного) на молекули нуклеотидних основ у конденсованому стані (плівки, розчини).

Висновки, сформульовані у дисертаційній роботі, є обширними, вичерпними і достатньою мірою обґрунтованими. Їх зміст не викликає сумнівів і дозволяє підкреслити значну наукову цінність і завершеність дисертації.

Оприлюднення результатів дисертаційної роботи

Основні результати дисертації опубліковані у монографії, двох підручниках, у 20 (24) статтях у вітчизняних і міжнародних наукових

журналах, з яких 10 (14) реферуються науково-метричними базами даних Scopus і Web of Science (з яких 1 стаття у виданні, віднесеному до першого квартиля (Q1), 3 статті у виданнях, віднесених до третього квартиля (Q3) та 6 статей у виданнях, віднесених до четвертого квартиля (Q4) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports), 10 – у фахових виданнях, а також у 53 тезах доповідей на національних та міжнародних конференціях. До даного переліку не входять публікації, що ввійшли до кандидатської дисертації.

Недоліки та зауваження до дисертаційної роботи.

В цілому дисертаційна робота Шафраньоша М.І. справляє враження цілісного дослідження, виконаного на належному науковому рівні, яке втім, не позбавлене окремих недоліків, до яких можна віднести наступні рекомендації та зауваження:

1. При аналізі наявних методів мас-спектрометрії біологічних молекул абсолютно не розглянуті такі сучасні мас-спектрометричні методи, як електророзпилення (ESI), хімічної іонізації (CI), матричної лазерної іонізації (MALDI), іонізації швидкими атомами (FAB), що дещо збіднює аргументацію автора щодо вибору саме методики іонізації електронним ударом для аналізу масового складу молекул.
2. Експериментальний метод визначення концентрації молекулярного пучка включає у себе осадження конденсату досліджуваних молекул на поверхні колектора, його розчинення, дослідження спектрів поглинання отриманого розчину в УФ-області та вимірювання оптичної густини розчину. На думку опонента, автором не зазначені такі можливі джерела похибок запропонованого методу, як неврахування коефіцієнта акомодатії досліджуваних молекул на поверхні колектора.
3. Мас-спектри аденіну та гуаніну, отримані автором, якісно узгоджуються з даними інших авторів. В той же час має місце розбіжність у відносних інтенсивностях окремих ліній у приведених мас-спектрах. Слід було вказати причину цього феномену.
4. В оптичних спектрах чітко проявляється спектральна лінія H_{β} серії Бальмера атома гідрогену. Це свідчить, що при опроміненні біотканин у них виникають у значній кількості атоми гідрогену. Вартим було проаналізувати вплив цього ефекту на функції біоклітин.
5. При визначенні актуальності теми дисертації та практичної значимості результатів автор не звернув увагу, що дослідження особливостей взаємодії електронів малих енергій з біомолекулами

становить особливий інтерес також для плазмової медицини, яка сьогодні поєднує плазмову терапію і плазмову фармакологію.

Водночас слід відзначити, що вищевказані зауваження не впливають на загальне позитивне враження від дисертаційної роботи.

Реферат достатньою мірою відображає матеріал, викладений у дисертації.

Висновок про дисертаційну роботу

Вважаю, що дисертаційна робота Шафраньоша М.І. «Непружні зіткнення електронів з молекулами азотистих основ нуклеїнових кислот» за науковим рівнем, практичною та теоретичною цінністю одержаних результатів і положень, а також кількістю та якістю публікацій, дотриманням принципів академічної доброчесності повністю відповідає вимогам п. 7, 9 Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук (Постанова Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197), а її автор Шафраньош Мирослав Іванович заслуговує присудження йому наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.04 - фізична електроніка.

Офіційний опонент:

Професор кафедри фізичної електроніки
факультету радіофізики, електроніки та
комп'ютерних систем Київського національного
університету імені Тараса Шевченка,
доктор фізико-математичних наук, професор

Валерій ЧЕРНЯК

(підпис)

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР НАЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
30.08.2024Р

