

РЕЦЕНЗІЯ

професора кафедри технології ліків та фармакогнозії ДНТ "Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького", докторки фармацевтичних наук, професорки Гудзь Наталії Іванівни на дисертаційну роботу Корабля Івана Михайловича на тему: "Пошук сировинних джерел сквалену і їх комплексне дослідження" подану у спеціалізовану вчену раду ДФ 35.600.158 ДНТ "Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького" МОЗ України, що утворена для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 "Охорона здоров'я" за спеціальністю 226 "Фармація, промислова фармація".

Актуальність теми.

Дисертаційну роботу присвячено пошуку нових сировинних джерел сквалену, який є важливою біологічно-активною сполукою передусім для косметології. Він утворюється в організмі людини в процесі біосинтезу холестерину, стероїдних гормонів і низки інших сполук. Проявляє антиоксидантні, протизапальні, антиканцерогенні, кардіозахисні та інші біологічні властивості. Сквален широко використовують у виробництві косметологічних засобів і дієтичних добавок. Завдяки імуностимулюючим властивостям сквалену цього використовують у виробництві вакцин, як компонент ад'ювантів.

Основне джерело отримання сквалену – це жир з печінки глибоководних акул. Однак збільшення попиту на сквален у виробництві вакцин у часи пандемії, Covid-19 і як наслідок збільшення вилову глибоководних акул, викликало стурбованість природоохоронних організацій і підняло питання щодо пошуку інших сировинних джерел сквалену.

У дисертаційній роботі Іван Корабель як перспективу сировину для добування сквалену розглядає ксилотрофні гриби, які є невибагливі до умов культивування. Також дисертант досліджує методи якими можна збільшити вміст сквалену, зокрема шляхом інгібування ферментних перетворень в біосинтезі ергостеролу. Заслугує на увагу комплексний підхід у переробці сировини, який дозволяє отримувати різні продукти з однієї сировини і мінімізувати відходи.

Заслугує на увагу різноманіття об'єктів для дослідження (рослини і гриби) та методів аналізу (газова хроматографія, візкозиметрія для визначення молекулярної маси, інфрачервона спектроскопія для визначення функціональних груп, тонкошарова хроматографія для виявлення певних груп біологічно активних сполук, у тому числі сквалену, та інші).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційну роботу виконано згідно з планом комплексної науково-дослідної роботи ДНТ "Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького" (державна реєстрація № 0121U107504).

Наукова новизна отриманих результатів.

Розроблено методика комплексної переробки сировини плодів шириці хвостатої шляхом почергових екстракцій різними розчинниками, для отримання ліпофільних, водних і спиртових екстрактів.

Проаналізовано 21 вид ксилотрофних грибів як потенційних сировинних джерел сквалену. Дослідження плодових тіл на різних стадіях зрілості дозволило встановити, що вміст сквалену в сировині на ранніх стадіях зрілості є найбільший.

Проведені детальні дослідження *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus* і *Fomitopsis betulina* на різних стадіях зрілості. Для *Pleurotus ostreatus* проведено порівняльний аналіз культивованих і дикорослих форм. Встановлено, що культивовані *Pleurotus ostreatus* містять суттєво менше сквалену, ніж дикорослі форми.

Проведені дослідження на вміст хітину в шроті з плодових тіл грибів, який залишається після попередніх екстракцій в рамках комплексного використання сировини. Розроблені методики виділення і очищення хітину з плодових тіл п'яти видів грибів. Проведено визначення молекулярної маси і ІЧ-спектроскопію отриманого хітину.

Проведені дослідження по збільшенню вмісту сквалену в культивованих плодових тілах *Pleurotus ostreatus* шляхом інгібування скваленоксидази тербінафіном гідрохлоридом. Встановлено, що таким способом можна отримати суттєво більший вихід сквалену ніж з плодів шириці.

Практичне значення отриманих результатів.

Розроблена методика одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів (патент України на корисну модель. № 126361, опубл. 11.06.2018).

Розроблений спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння шириці хвостатої (патент України на корисну модель №148769, опубл. 15.09.2021).

Розроблений спосіб підвищення кількості сквалену у ліпофільних екстрактах плевроту черепитчастого (патент України на корисну модель прийнятий до розгляду 10.02.2026, номер заявки: u202600666).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність.

Обсяг наукового матеріалу, комплекс використаних методів

дослідження, оцінка отриманих результатів і характер їх тлумачень достатні для обґрунтування наукових положень дисертації. Достовірність даних підтверджена, зауважень щодо упорядкування первинної документації немає. Рукопис дисертації отримав позитивну оцінку при перевірці на академічний плагіат. Дисертант провів численні експериментальні дослідження по вилученню біологічно активних сполук з рослинної сировини.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових публікацій, з них: 5 статей у журналах, проіндексованих у базах даних Scopus і Web of Science; 5 праць у тезах науково-практичних конференцій і 2 патенти на корисну модель.

Оцінка структури та змісту дисертації.

Дисертаційну роботу викладено українською мовою на 170 сторінках машинописного тексту, робота складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, 7 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел і додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 113 сторінок друкованого тексту. Роботу ілюстровано 32 таблицями та 31 рисунком. Список використаних джерел налічує 155 найменувань. Структура роботи, яка за складом та послідовністю розділів логічна, і стиль викладення дисертації забезпечують легке сприйняття матеріалів досліджень, наукових положень, висновків і рекомендацій.

Дисертація за структурою, мовою та стилем викладення задовольняє вимоги наказу Міністерства освіти і науки України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 р.

У вступі обґрунтовується тема дослідження, вказується мета і завдання, наукова новизна і практичне значення роботи, особистий внесок здобувача, зазначається кількість публікацій за результатами дисертації, а також обсяг і структура дисертації.

Заслуговує на увагу широкий спектр експериментальних досліджень дисертанта, пов'язаний з отриманням сквалену з різних джерел.

Перший розділ являє собою огляд літератури, де описані фізико-хімічні властивості сквалену, природні джерела які використовують для його отримання на сьогоднішній день і перспективні джерела з грибною сировини, які досліджувалися в даній роботі, хімічний синтез сквалену в лабораторних умовах і біосинтез в організмі, а також застосування сквалену в медицині.

Другий розділ містить загальну методологію досліджень, використану в дослідженнях сировину, апаратуру, розчинники і реактиви. Описані тонкошарова і газова хроматографія-мас спектрометрія, як основні методи

які використовувалися для якісного і кількісного аналізу в даній роботі.

Третій розділ присвячено комплексній переробці рослинної сировини щириці хвостатої. Описані складнощі, які виникли в процесі вибору оптимальної схеми для такої переробки і способи їх вирішення. Розроблена методика комплексної переробки насіння щириці дозволяє отримати з одного зразка сировини три різних продукти: ліпофільний екстракт з високим вмістом сквалену, водний екстракт із високим вмістом лектину і спиртовий екстракт з сумою тритерпенових сполук. Таким чином, розроблена технологічна схема очищення біологічно активних речовин насіння щириці може сприяти більш раціональному використанню рослинної сировини. Додатково проаналізовано надземну частину щириці хвостатої, яка залишилася після видалення насіння, на вміст корисних біологічно-активних сполук в рамках комплексного дослідження сировини.

Четвертий розділ багатий на експериментальні дослідження і представляє результати досліджень 21 виду грибів для вибору найбільш перспективних видів для подальших досліджень. У процесі досліджень виявлено, що вміст сквалену в плодових тілах може сильно відрізнятись залежно від стадії зрілості. Також проведено аналіз на вміст біологічно-активних речовин, які можна отримати різними розчинниками для комплексного дослідження сировини. Проведені дослідження вказують на залежність між вмістом сквалену й стадію життєвого циклу грибів.

П'ятий розділ описує детальні дослідження на різних стадіях зрілості плодових тіл трьох найбільш перспективних видів грибів відібраних за результатами попередніх досліджень, а саме: *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus*, *Fomitopsis betulina*. Для грибів виду *Pleurotus ostreatus* також проведено порівняльний аналіз між культивованими і дикорослими формами. Завдяки використанню газової хроматографії-мас-спектрометрії було проаналізовано динаміку змін вмісту сквалену і інших сполук в ліпофільних екстрактах, отриманих із плодових тіл досліджуваних грибів на різних стадіях зрілості.

Шостий розділ містить результати досліджень на вміст хітину в шроті з плодових тіл, що залишився після попередніх екстракцій в рамках комплексного використання сировини. Так як для отримання хітину використовують досить агресивні розчинники, дану екстракцію слід проводити останньою для оптимального виділення інших речовин. Власне тільки при комплексній переробці сировини екстракція хітину з плодових тіл може бути доцільною, тому що вихід хітину був незначний, через високий ризик його гідролізу. Більш раціонально проводити лужний гідроліз з подальшим отриманням хітозану.

Сьомий розділ представляє розробку методики по збільшенню вмісту сквалену в плодових тілах культивованого виду *Pleurotus ostreatus*. Для цього плодове тіла обприскували розчином тербінафіну гідрохлориду

протягом їх дозрівання. Ця субстанція здатна інгібувати скваленоксидазу і зупиняти подальші перетворення сквалену, що приводить до його накопичення в плодових тілах. Встановлено, що таким способом можна суттєво збільшити вихід сквалену.

Список використаних джерел наведено у порядку їх згадування в тексті дисертації.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації.

До дисертації є низка зауважень, які не зменшують наукової цінності наукової роботи дисертанта. Одночасно ці зауваження слугують для наукової дискусії.

1. У підрозділі 1.3 (стор. 37) доцільно було подати хімічні реакції синтезу сквалену. Описового характеру недостатньо для дисертаційних робіт фітохімічного напрямку.

2. Робота насичена хімічними реакціями, наприклад, рис. 1.6, 1.7 і 1.8. З власного досвіду опублікування наукових статей доцільно хімічні перетворення представляти за допомогою спеціальної програми, а не шляхом копіювання.

3. На стор. 41 дисертант зазначає, що "Сквалан проявляє себе як ефективний ранозагоювальний засіб, а також захищає шкіру від пошкодження вільними радикалами та запобігає її старінню, яке відбувається внаслідок перекисного окислення ліпідів під впливом УФ-випромінювання". Було б добре подати механізм дії сквалану для ліпшого розуміння біологічних властивостей сквалану.

Запитання до здобувача.

1. Як технічно виглядала дериватизація хроматограми? Для утворення солей міді хроматограми поміщали в 7% водний розчин ацетату міді на 45 хвилин. Після цього пластину тричі промивали водою та поміщали на 10-15 хвилин у 5% водний розчин $K_3[Fe(CN)_6]$. Для проявлення використовували також УФ-лампу (стор. 48). Чому використовували саме метод занурення, а не традиційний метод обприскування?

2. Фракції об'ємом 2,0 мл. збирали у попередньо зважені пробірки Епендорфа. Сквален виходить з першими фракціями елюату (стор. 54). Немає кількісних характеристик процесу елюації, на основі чого зроблено саме такий висновок?

3. Яка мета представлення в роботі кори крушини і з якою метою було проведено якісні реакції на сапоніни, які дали негативний результат? (стор. 56-57).

4. З чим можна пов'язати, що вміст ненасичених сполук (ненасичених жирних кислот і сквалену) зменшується під час старіння гриба? Чи зустрічали ви в літературі таке пояснення? Питання стосується твердження, поданого на стор. 81. "Ненасичені жирні кислоти (олеїнова та

ліноленова) складають близько половини всього асортименту цих кислот. Зі старінням плодкових тіл вміст ненасичених жирних кислот зменшується".

5. Чому проводили осадження 96% етанолом в морозильній камері при температурі -30°C в співвідношенні на 1 мл. екстракту 2 мл. етанолу. (стор. 82).

6. Цікавими є дослідження з виявлення похідних фталату у грибах. Чи не розглядали ви результати цих досліджень, що внаслідок забруднення навколишнього середовища продуктами переробки полімерів? Чи зустрічали ви в наукових публікаціях, що фталати є метаболітами в грибах?

7. Чи можна пояснити зменшення молекулярної маси гідрофільної фракції березової губки (*Fomitopsis betulina*), визначеної віскозиметричним методом, наслідком ензимного гідролізу полісахаридів? (стор. 110-111).

Відповідність дисертації вимогам, що пред'являються до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація відповідає вимогам наказу МОН України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 р. (із змінами, внесеними згідно з наказом МОН № 759 від 31.05.2019 р.) та постанові КМ України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» № 44 від 12.01.2022 р. (із змінами, внесеними згідно із постановою КМ України № 341 від 21.03.2022 р.).

Професорка кафедри технології
ліків та фармакогнозії
ДНТ "Львівський національний
медичний університет
імені Данила Галицького"

докторка фармацевтичних наук
професорка



| | |
|----------------------|--|
| Підпис | |
| Засвідчую | |
| Посвідчений фовіаець | |

Гудзь Наталія Іванівна

Підпис проф. Гудзь Наталія Іванівна засвідчую:

1 030"