

ВІДГУК

офіційного опонента, завідувачки фармакогнозії та нутриціології Національного фармацевтичного університету, доктора фармацевтичних наук, професора **Кисличенко Вікторії Сергіївни** на дисертаційну роботу **Корабеля Івана Михайловича «Пошук сировинних джерел сквалену і їх комплексне дослідження»**, подану у разову спеціалізовану вчену раду при ДНТ «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького» МОЗ України на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»

Актуальність теми

Ненасичений ациклічний вуглеводень тритерпенового ряду сквален в організмі людини утворюється з мевалонової кислоти. Він є компонентом шкірного сала людини та синтезується організмом для зволоження, захисту від ультрафіолету, антиоксидантного захисту та є попередником ланостерину, з якого синтезується холестерин. Але з віком вироблення власного сквалену зменшується, що потребує його поповнення. У медицині цей вуглеводень використовується для регуляції ліпідного обміну, в дерматології, у вакцинах тощо. Актуальність застосування сквалену підвищилася під час пандемії Covid-19.

На сьогодні основним природним сировинним джерелом одержання сквалену є жир печінки морських тварин, зокрема глибоководних акул, де його вміст може сягати 60–90 %. Але через загрозу екосистемі океану, забруднення тваринного джерела токсинами та складності очистки сквалену, промисловість активно переходить на джерела рослинного походження та біотехнології. Альтернативним джерелом одержання сквалену є жирні олії такі, як амарантова та оливкова. Ба більше, в останні роки сучасна біотехнологія використовує для одержання сквалену генетично модифіковані або відібрані штами дріжджів та бактерій, певні види мікрободоростей здатних синтезувати сквален, а також вирощування клітинних культур рослин, багатих на сквален.

Отже, труднощі, пов'язані з одержанням сквалену з тваринної сировини, збільшення попиту в медицині та косметології, а також необхідність захисту морської фауни зумовлюють доцільність пошуку нових сировинних джерел одержання сквалену, зокрема з культурних рослин, які вирощуються в необхідній кількості.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом комплексної науково-дослідної роботи ДНТ «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького» (державна реєстрація № 0121U107504).

Наукова новизна одержаних результатів

Розроблена методика комплексної переробки плодів щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) в один технологічний цикл – одержання ліпофільних, водних і спиртових екстрактів, а також методика одержання біологічно активних речовин з надземної частини щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.), яка залишається після відокремлення насіння.

Проведено аналіз 20 видів грибів класу агарикоміцети (Agaricomycetes) та обрано перспективне джерело одержання сквалену й інших біологічно активних речовин – вид класу пецицоміцети (Pezizomycetes). Проведено визначення вмісту сквалену на різних стадіях зрілості грибів та встановлено, що максимальний його вміст спостерігався на ранніх стадіях зрілості.

Детальні дослідження одних з найбільш перспективних джерел сквалену, а саме грибів – трутовика сірчано-жовтого (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill), гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) і трутовика березового (*Fomitopsis betulina* (Bull.) V.K. Cui) класу агарикоміцети (Agaricomycetes) показали, що культивовані форми містять значно меншу кількість сквалену, ніж дикорослі. Одержані дані зумовлюють доцільність проведення досліджень щодо визначення оптимальних умов проростання плодових тіл для збільшення виходу сквалену з сировини.

З метою комплексного використання сировини проведено визначення вмісту хітину в шроті плодових тіл грибів, що залишається після попередніх екстракцій сировини. Розроблено методики виділення й очищення хітину з

плодових тіл грибів видів: трутовика сірчано-жовтого (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill), трутовика білосніжного (*Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst.), удемансієлли слизистої (*Mucidula mucida* (Schrad.) Pat.), дощовика їстівного (*Lycoperdon perlatum* Pers.) та трутовика березового (*Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui). Проведено визначення молекулярної маси та ІЧ-спектроскопію одержаного хітину.

Проведені дослідження щодо збільшення вмісту сквалену в плодових тілах плевроту черепитчастого показали, що інгібування скваленоксидази тербінафіном гідрохлоридом дозволяє в рази збільшити вихід сквалену на 100 г. сухої сировини, ніж з найбільш поширеного рослинного джерела сквалену роду щиріці.

Практичне значення одержаних результатів

Розроблено методику одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів, захищена патентом України на корисну модель. № 126361, опубл. 11.06.2018 (Додаток В).

Розроблено спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щиріці хвостатої, який захищено патентом України на корисну модель №148769, опубл. 15.09.2021 (Додаток Г).

Розроблено спосіб підвищення вмісту сквалену у ліпофільних екстрактах плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.), на який подано заявку на патент України на корисну модель (номер заявки: u202600666 від 10.02.2026).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дослідження, проведені в рамках дисертаційної роботи, виконані на сучасному науковому рівні. Усі наукові положення, висновки та практичні рекомендації базуються на експериментальному матеріалі та логічно витікають з одержаних результатів. Загальні висновки до дисертації викладені чітко, стисло і повністю відображають результати проведеної роботи, а їх достовірність не викликає сумніву. Матеріал, викладений у дисертаційній роботі Корабеля І. М., є новим та перспективним для впровадження у практичну фармацію.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях

За темою дисертації опубліковано 12 наукових робіт, з них: 5 статей у наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Scopus і Web of Science, 5 тез доповідей на науково-практичних конференціях, 2 патенти України на корисну модель і 1 заявка на одержання патенту України на корисну модель.

Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків

Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках друкованого тексту та складається із вступу, огляду літератури, розділу, присвяченого опису матеріалів і методів, п'ятих розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури, що налічує 155 найменувань, та додатків. Робота ілюстрована 32 таблицями і 31 рисунком.

Анотація (6 стор.) містить узагальнені дані результатів дисертаційних досліджень. Анотація англійською мовою повністю відповідає за змістом анотації українською.

У *вступі* (5 стор.) дисертант обґрунтовує вибір теми дослідження, формулює мету та завдання дослідження, наводить наукову новизну, практичне значення одержаних результатів, інформацію про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації, кількість публікацій, а також обсяг і структуру дисертаційної роботи.

У *першому розділі* (огляд літератури, 15 стор.) дисертантом наведено аналіз наукових джерел літератури щодо фізико-хімічних властивостей сквалену, його синтезу та біосинтезу, застосування в медицині, а також речовин, що впливають на його вміст. Також охарактеризовано найбільш перспективні природні джерела сквалену.

Другий розділ (9 стор.) містить інформацію про загальну методологію досліджень, характеристику сировини, апаратури, реактиви, методики та методи якісного та кількісного аналізу, які використовували при проведенні дисертаційних досліджень.

У *третьому розділі* (18 стор.) представлено результати дослідження біологічно активних речовин насіння щиряці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.).

Дисертантом наведено схему комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щириці хвостатої за один технологічний цикл, а також методику одержання біологічно активних речовин з надземної частини рослини, яка залишається після відокремлення насіння. Ба більше, у розділі наводяться результати якісного та кількісного аналізу одержаних сполук.

Проаналізовано труднощі, що виникали під час виділення речовин, та обґрунтовано оптимальні методи їх одержання. Отже, тритерпеноїди насіння щириці не розчинні у воді, а лектин чутливий до осадження спиртом, тому його слід екстрагувати після знежирення насіння, а тритерпенові речовини – екстракцією метанолом після одержання лектину. Така послідовність операцій призводить до збереження активності лектину та додаткового очищення тритерпеноїдів насіння від водорозчинних речовин. Ця схема одержання біологічно активних речовин також дозволяє виділити суму водорозчинних сполук насіння – амінокислоти та вуглеводи, що дозволяє більш раціонально використовувати досліджувану сировину щириці.

Розроблена автором методика комплексної переробки надземної частини щириці хвостатої дозволяє одержати такі біологічно активні речовини, як пігменти, полісахариди та білки. Встановлено, що пізній збір надземної частини щириці приводить до дуже низького виходу флавоноїдів. Тому оптимальним періодом збору сировини обрано фенофази бутонізації та початку цвітіння рослини.

Четвертий розділ (20 стор.) містить результати дослідження плодових тіл грибів як потенційних сировинних джерел сквалену. Встановлено, що вміст сквалену в ліпофільних екстрактах з плодових тіл грибів трутовика білосніжного (*Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst.), трутовика березового (*Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui), плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) та постії в'язучої (*Postia stiptica* (Pers.) Jülich) може перевищувати вміст сквалену в жирній олії з насіння щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.). Але маса ліпофільного екстракту, одержаного з висушених плодових тіл грибів, невелика, а вміст сквалену на різних стадіях розвитку, як показали дослідження, проведені на ксилотрофних грибах трутовика білосніжного (*Tyromyces chioneus*

(Fr.) P. Karst.), трутовика сірчано-жовтого (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill), плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.), трутовика березового (*Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui), удемансієлли слизистої (*Mucidula mucida* (Schrad.) Pat.) зменшується в міру дозрівання плодових тіл грибів. Однак, вихід ліпофільного екстракту з плодових тіл удемансієлли слизистої (*Mucidula mucida* (Schrad.) Pat.) є високим (9–15 %) та зростає в процесі їх дозрівання. Тому зменшення вмісту сквалену в старіших плодових тілах цього гриба не таке сильне, як в інших грибів.

П'ятий розділ (23 стор.) присвячений вивченню хімічного складу плодових тіл трутовика сірчано-жовтого (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill), плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) та трутовика березового (*Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui) різних стадій зрілості.

Встановлено, що протягом вегетаційного періоду (3-4 тижні) спостерігається значне варіювання маси та хімічного складу плодових тіл трутовика сірчано-жовтого (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill). Основними сполуками ліпофільних екстрактів є насичені (пальмітинова та стеаринова) та ненасичені (олеїнова та ліноленова) жирні кислоти, насичені вуглеводні (докозан, трикозан, тетракозан і пентакозан) та ненасичений вуглеводень сквален. Вміст пальмітинової та стеаринової кислот у ліпофільних екстрактах з плодових тіл різних стадій вегетації залишається приблизно однаковим. Щодо вмісту ненасичених кислот, то кількість олеїнової кислоти збільшується з віком плодових тіл, а вміст лінолевої кислоти, навпаки, зменшується. Найвищий вміст сквалену визначено у молодих грибах, найменший – у старих. Отже, при аналізі хімічного складу плодових тіл грибів необхідно зазначати стадію їх розвитку.

Встановлена суттєва різниця у якісному складі та кількісному вмісті біологічно активних речовин ліпофільних екстрактах молодих, зрілих та перестиглих плодових тіл плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.). У міру росту грибів спектр хімічних речовин збільшується, а потім зі старінням зменшується: з віком кількість жирних кислот та стероїдів збільшується. Спостерігалось поступове зменшення кількості сквалену та біс(2-етилгексил)фталату у ліпофільних екстрактах від молодих до перестиглих

грибів. У молодих грибах визначено високий вміст фітогормону гібереліну А₃, тоді як він відсутній у зрілих та перестиглих грибах. Але у перестиглих грибах відмічається значний вміст ергоста-5,7,22-трієн-3-олу (18 %), попередником якого є сквален. Молоді гриби не містять жирні кислоти, тоді як у їх вміст збільшується від зрілих до перезрілих плодових тіл грибів, зокрема пальмітинової, стеаринової та ліноленої кислот. Ба більше, встановлено, що вихід ліпофільного екстракту з лісових грибів у 5 разів вищий, ніж з культивованих (0,98 % і 0,14–0,35 % відповідно). Ліпофільний екстракт з лісових грибів відрізнявся наявністю вітаміну Е, підвищеним вмістом ергостеролів, сквалену та ліноленої кислоти.

Хімічний склад плодових тіл трутовика березового (*Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui) значно змінюється під час зростання на відмерлих або ослаблених стовбурах видів берези протягом нетривалого часу (близько 30 днів). Встановлено, що найбільший вміст водорозчинних полісахаридів спостерігався у молодих плодових тілах, гіменофор яких ще не має темного забарвлення. При пізніших термінах збору полісахариди ковалентно зв'язуються з фенолами, що практично унеможлиблює їх очистку.

У шостому розділі (7 стор.) наведено результати визначення якісних та кількісних змін хітину в залежності від стадії дозрівання плодових тіл грибів, які переважно належать до ряду афілофорові (Aphyllophorales).

Встановлено, що вміст хітину у плодових тілах грибів цього ряду невисокий, а його виділення потребує використання сильних кислот або агресивних розчинників при низьких температурах. При цьому спостерігався його гідроліз. За результатами дослідження запропоновано проводити лужний гідроліз хітинвмісного матеріалу плодових тіл грибів з подальшим виробництвом хітозану як більш раціонального. Одержаний грибний хітозан відрізняється від хітозану креветок меншою молекулярною масою, ступенем деацетилювання та наявністю домішок фенольної та вуглеводної природи.

Хітин, екстрагований з плодових тіл концентрованою хлористоводневою кислотою, містить пігмент, який не видаляється повністю навіть після

повторного розчинення. Вихід хітину із застосуванням даного способу становив 25–30 % від початково екстрагованого хітину.

Сьомий розділ (12 стор.) присвячений пошуку методів підвищення вмісту сквалену в екстрактах грибів.

Дисертантом встановлено, що при обробці плодових тіл плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) 1 % розчином тербінафіну (протягом 7 днів в залежності від умов вирощування) вміст сквалену може збільшуватись від 2 до 28 разів і досягати 0,82 г на 100 г висушених плодових тіл. Останнє значення перевищує у 2,2 рази кількість сквалену, яка може бути одержана зі 100 г насіння щириці хвостатої (*Amaranthus cruentus*). Такий спосіб збільшення кількості сквалену в грибній сировині може бути застосований і для інших ксилотрофних грибів. А при штучному вирощуванні ксилотрофні гриби можуть бути цінним джерелом сквалену.

Список використаних джерел наведено у порядку їх згадування по тексту дисертації.

У **додатках** представлено список публікацій здобувача, відомості про апробацію результатів дисертації, патенти України на корисну модель, ілюстративний матеріал (ІЧ-спектри хітину, ВЕРХ-МС спектри амінокислот).

Аналізуючи дисертаційну роботу, слід зазначити, що її експериментальна частина має системний, комплексний підхід з використанням сучасних методів дослідження, а актуальність, новизна, теоретичне та практичне значення її не викликають сумнівів. Сформульовані автором висновки базуються на власних експериментальних результатах, є обґрунтованими та відповідають завданням, поставленим на початку дослідження.

Дисертаційна робота Корабеля І. М. не має суттєвих недоліків та не містить ознак академічного плагіату.

У цілому оцінюючи дисертаційну роботу позитивно, необхідно висловити деякі зауваження:

Зауваження і пропозиції

1. У вступі відсутні об'єкт і предмет дослідження, які є його обов'язковими елементами.

2. Після розділу 1 відсутні висновки (або узагальнення).
3. На мій погляд, розділи з 4 по 7 слід об'єднати в один і для кращого сприйняття зробити підрозділи, наприклад, 4.1, 4.2 тощо.
4. Також вважаю, що повторювання схеми біосинтезу сквалену в декількох розділах не доцільно. Достатньо навести її в огляді літератури.
5. Оформлення списку використаних джерел не відповідає вимогам ДСТУ 8302:2015. Ба більше, зустрічаються застарілі літературні джерела (понад 10 років).
6. По тексту дисертації зустрічаються орфографічні та стилістичні помилки.

Проте наведені зауваження не є принциповими, не зменшують позитивне враження від дисертаційної роботи, яка є закінченим дослідженням з достатньою науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів.

У порядку проведення наукової дискусії вважаю доцільним, щоб дисертант відповів на такі запитання:

1. Чи достатні площі листяних лісів для вирощування видів грибів, що досліджувалися? Й оскільки вихід ліпофільних екстрактів з плодових тіл лісових грибів вищий, ніж з культивованих, чи не буде вирощування цих грибів наносити шкоду лісовим насадженням?

2. Чи здійснювали Ви обробку грибів розчином тербінафіну гідрохлориду для збільшення кількісного вмісту сквалену в них?

3. Як Ви пропонуєте застосовувати хітозан, одержаний з плодових тіл грибів, що досліджувалися?

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

Дисертаційна робота Корабеля Івана Михайловича «Пошук сировинних джерел сквалену і їх комплексне дослідження» за актуальністю, новизною, повнотою досліджень, теоретичною та практичною значимістю відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого

постановою КМУ від 12 січня 2022 року № 44, а її автор, Корабель Іван Михайлович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

**Завідувачка кафедри фармакогнозії та
нутриціології Національного фармацевтичного
університету, доктор фармацевтичних наук,
професор**

Вікторія КИСЛИЧЕНКО

Підпис проф. Вікторії КИСЛИЧЕНКО засвідчую.

**Провідний фахівець з питань кадрової
роботи Національного фармацевтичного
університету**

Віра ДВЕРНИЦЬКА