

ВІДГУК

Офіційного опонента, професора закладу вищої освіти кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, доктора фармацевтичних наук, професора Марчишин Світлани Михайлівни на дисертаційну роботу Корабеля Івана Михайловича на тему «Пошук сировинних джерел сквалену і їх комплексне дослідження», подану до спеціалізованої вченої ради 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 дисертації

Дисертаційна робота Корабеля Івана Михайловича присвячена пошуку нових сировинних джерел сквалену і дослідженню його вмісту в рослинах і грибах. Сквален – ациклічний тритерпен, на основі якого у тварин синтезується холестерин, у рослин – різноманітні стероїдні речовини, зокрема, сапоніни, кардіоглікозиди та ряд інших. Сквален знайшов застосування в медицині, косметології та фармації; він має позитивний вплив на ліпідний обмін; сприяє зниженню вмісту холестерину й тригліцеридів у крові. Встановлено, що сквален проявляє антиоксидантні, протизапальні, антиканцерогенні, кардіозахисні властивості. Інтерес до сквалену посилюється під час пандемії Covid-19, коли його почали застосовувати як ад'ювант у вакцинах проти цього вірусу. Додавання сквалену до вакцин стимулює імунну відповідь і підсилює реакцію пацієнта. Через глобальну світову пандемію це потребувало значної кількості сквалену.

Найбагатшим джерелом сквалену є печінка глибоководних акул. Проте більш екологічно вигідним варіантом сьогодні є одержання сквалену

рослинного походження, наприклад, із оливкової чи амарантової олій. Це корисно, і не завдає шкоди доквіллю.

Проте пошук більш зручних і багатих природних джерел сквалену і надалі залишається актуальним.

Отже, тема дисертаційної роботи Корабеля Івана Михайловича «Пошук сировинних джерел сквалену і їх комплексне дослідження», мета, яку поставив дисертант – здійснити пошук джерел сквалену в природній сировині і розробити комплексну методику одержання сквалену та інших біологічно активних речовин з цієї сировини – є своєчасною, науково обґрунтованою та відповідає потребам сучасної фармацевтичної науки.

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" «Синтез та перетворення нових фізіологічно-активних речовин - похідних неконденсованих і конденсованих сульфур- і нітрогеновмісних гетероциклів та споріднених гетероциклічних систем, з використанням методів *in silico* моделювання, вивчення фізико-хімічних властивостей та проведення фармакологічного скринінгу одержаних сполук, дослідження різних видів дикорослих та культивованих рослин західного регіону України з метою одержання нових лікарських засобів, розробка технології лікарських засобів нових складів та опрацювання сучасних методик фармацевтичного та токсикологічного аналізу» (державна реєстрація № 0121U107504).

Наукова новизна отриманих результатів

Автором розроблено комплексну методику отримання ліпофільних, водних та етанольних екстрактів з одного зразка сировини плодів шириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) в один технологічний цикл і методику отримання біологічно активних речовин з надземної частини даного виду, яка залишається після одержання насіння.

Досліджено 20 видів грибів класу Агарикоміцети (*Agaricomycetes*) і один вид класу Пецицоміцети (*Pezizomycetes*), встановлено наявність і визначено у

досліджуваних об'єктах вміст сквалену та інших біологічно активних речовин. Поставлено акцент на тому, що найбільший вміст сквалену міститься у досліджуваних зразках на ранніх стадіях зрілості плодових тіл грибів.

Показано найперспективніші джерела сквалену з грибів класу Агарикоміцети (*Agaricomycetes*), якими є трутовик сірчано-жовтий (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill), плеврот черепитчастий (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) і трутовик березовий (*Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui.). Новими, цікавими і важливими є дослідження дисертанта, що стосуються шляхів збільшення вмісту сквалену в плодових тілах плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) внаслідок інгібування ферменту скваленепоксидази тербінафіном гідрохлоридом. Встановлено, що такий спосіб дає можливість збільшити у декілька разів вихід сквалену на 100 г сухої сировини, і він стає економічно вигідним джерелом сквалену.

Практичне значення отриманих результатів

Дисертаційна робота має практичне значення, оскільки отримані дисертантом експериментальні дані обґрунтовують доцільність подальших досліджень нових джерел одержання сквалену та інших біологічно активних речовин з нових рослинних об'єктів і грибів.

На розроблену методику одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів автором одержано патент України на корисну модель «Спосіб одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів» № 126361, опубл. 11.06.2018; на розроблений спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щириці хвостатої – патент України на корисну модель «Спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.)» № 148769, опубл. 15.09.2021.

Прийнятий до розгляду патент на корисну модель, що стосується способу підвищення кількості сквалену у ліпофільних екстрактах плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm.).

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

Дисертаційна робота Корабеля Івана Михайловича виконана на сучасному науковому рівні із залученням адекватних методів дослідження та ґрунтується на значному обсязі експериментальних даних. Наукові положення, що наведено в роботі, мають достатній рівень обґрунтованості, а коректна статистична обробка даних із використанням сучасного програмного забезпечення дозволила отримати достовірні результати.

Результати експериментальних досліджень, які представлені у дисертаційній роботі Корабеля І. М., є новими як з наукової точки зору, так і перспективним для впровадження у практичну фармацію та медицину.

Повнота викладення дисертації в опублікованих працях

Основні положення та результати дисертації повною мірою відображені в опублікованих працях автора. Результати дослідження опубліковано у журналах, індексованих у міжнародній наукометричній базі даних *Scopus*, зокрема двох статей у *Biomedical chromatography* (Q3), у *Italian Journal of Mycology* (Q3), у *Asian Journal of Mycology* (Q3) та у *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* (Q4).

Публікації охоплюють ключові аспекти роботи – пошук нових сировинних джерел сквалену, комплексне дослідження різних видів сировини, що містить сквален та розробку методів одержання біологічно активних речовин з досліджуваних об'єктів.

Матеріали дисертації також пройшли апробацію на наукових форумах різного рівня, що забезпечило їх фахове обговорення у професійному середовищі.

Таким чином, дисертаційна робота повною мірою відображена в опублікованих працях, а кількість і рівень публікацій відповідають чинним вимогам щодо апробації результатів дисертаційних досліджень.

Основний зміст дисертації та його структура

Дисертація відповідає вимогам до оформлення дисертації, затвердженими наказом Міністерства освіти та науки України. Дисертація викладена на 170

сторінках друкованого тексту та складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу, з описом використаних матеріалів і методів, 5 розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел, який містить 155 наукових джерел, і додатків. Робота ілюстрована 32 таблицями і 31 рисунком.

Анотація (6 стор.) до дисертаційної роботи оформлена згідно з вимогами наказу № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій». Анотація англійською мовою повністю відповідає за змістом анотації українською.

У **вступі** (5 стор.) дисертаційної роботи наведено дані, що обґрунтовують актуальність обраної теми із залученням сучасних даних наукової літератури, міститься формулювання мети та завдань дослідження. У вступі охарактеризована наукова новизна досліджень та їх практична цінність. Презентовано дані щодо апробації результатів дослідження та публікацій, у яких вони висвітлені, а також щодо особистого внеску автора.

У **першому розділі** (огляд літератури, 15 стор.) проведено аналіз джерел літератури з питань щодо фізико-хімічних властивостей сквалену, природних джерел сквалену, його синтезу, застосування в медицині, а також речовин, що впливають на його вміст. Огляд даних літератури, в цілому, висвітлює сучасний стан досліджуваної проблеми.

Другий розділ (9 стор.) містить інформацію про загальну методологію досліджень, характеристику сировини, апаратури, реактивів, а також інформацію про методики та методи якісного та кількісного аналізу, які використовували при проведенні дисертаційного дослідження. Застосовані методи є адекватними поставленим меті та завданням дисертаційного дослідження та відповідають сучасному науковому рівню.

У **третьому розділі** (18 стор.) наведено результати експериментальних досліджень щодо отримання біологічно активних речовин з насіння *Amaranthus caudatus* L. та методику одержання біологічно активних речовин з надземної частини рослини, яка залишається після відокремлення насіння.

У даному розділі також проаналізовано складнощі, які виявлено під час виділення сквалену і лектину в один технологічний цикл, обґрунтовано оптимальні методи їх одержання. Представлено результати ідентифікації сквалену і тритерпеноїдів у метанольному екстракті методом ГХ-МС.

Розроблена дисертантом методика комплексної переробки рослинної сировини дозволяє одержати такі біологічно активні речовини як флавоноїди, пігмент амарантин, полісахариди та хлорофіли.

Четвертий розділ (20 стор.) містить результати дослідження плодових тіл грибів як потенційних сировинних джерел сквалену. Це переважно гриби, які належать до класу Агарикоміцети (*Agaricomycetes*). 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) перевищує вміст сквалену в жирній олії з насіння щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.).

Дисертантом встановлено, що молоді, швидкоростучі плодові тіла ксилотрофних грибів містять сквалену значно більше, ніж на заключних стадіях розвитку. На основі проведених досліджень, автором відмічено найперспективніші види грибів для одержання сквалену.

У **п'ятому розділі** (23 стор.) наведено результати вивчення хімічного складу ліпофільних екстрактів плодових тіл трутовика сірчано-жовтого (*Laetiporu sulphureus* (Bull.) Murrill), плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) та трутовика березового (*Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui), зібраних на різних стадіях зрілості. Автором зазначено, що протягом вегетаційного періоду (3-4 тижні) спостерігається значне варіювання маси та хімічного складу плодових тіл трутовика сірчано-жовтого (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill). В одержаних ліпофільних фракціях цього гриба виявлено насичені (пальмітинова та стеаринова) та ненасичені (олеїнова та ліноленова) жирні кислоти, насичені вуглеводні (докозан, трикозан, тетракозан і пентакозан) та ненасичений вуглеводень сквален. Відмічено, що вміст

пальмітинової та стеаринової кислот у ліпофільних екстрактах з плодів різних стадій вегетації залишається приблизно однаковим, а вміст ненасичених кислот змінюється з віком плодів тіл (кількість олеїнової кислоти збільшується, а вміст лінолевої кислоти зменшується). Сквалену найвищий вміст спостерігається у молодих грибів, найменший – у старих.

Аналогічно змінюється в залежності від віку якісний склад і кількісний вміст біологічно активних речовин плодів тіл плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.).

У даному розділі також наведено результати дослідження водних екстрактів ксилотрофних грибів і показано, що вони містять полісахариди та білки-ферменти, серед яких є глікозидази, що спричиняють розщеплення деревини. Встановлено, що найбільший вміст водорозчинних полісахаридів спостерігався у молодих плодів тілах.

У шостому розділі (7 стор.) наведено результати дослідження хітину, показано як змінюється його склад у залежності від стадії дозрівання плодів тіл грибів, які переважно належать до ксилотрофних. Також у даному розділі є інформація про те, чим хітин грибів відрізняється за своїми властивостями від хітину ракоподібних.

Сьомий розділ (12 стор.) містить важливу інформацію про методи підвищення вмісту сквалену в екстрактах грибів. Дисертантом встановлено, що при обробці плодів тіл плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) 1 % розчином тербінафіну (протягом їх росту, це триває близько 7 діб) вміст сквалену може збільшуватись від 2 до 28 разів (в залежності від умов вирощування та оприскування тербінафіном). Деякі значення можуть перевищувати у 2,2 рази кількість сквалену, яку можна одержати зі 100 г насіння щиріці. Аналогічний спосіб збільшення кількості сквалену в сировині грибів можна буде застосовувати і для інших ксилотрофних грибів, які можуть стати 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).

Робота справляє враження цілісного, виваженого і науково вагомого дослідження, результати якого мають як фундаментальне, так і прикладне значення. Слід зазначити, що її експериментальна частина написана 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.

Матеріал дисертаційної роботи якісно проілюстрований.

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

1. У вступі відсутні такі обов'язкові складові цього розділу як «Об'єкт дослідження», «Предмет дослідження», «Методи дослідження».
2. У розділі 2 «Матеріали і методи» подекуди наведена стара номенклатура хімічних елементів та реактивів («соляна кислота» - хлоридна кислота; «сірчана кислота» - сульфатна кислота), «дистильована вода» - за ДФУ «вода очищена Р», «системи розчинників» - за ДФУ «рухомі фази», «свідки» - «стандартні фармакопейні зразки» та ін.).
3. На мою думку, не було необхідності у розділах власних досліджень, першим підрозділом ставити «Мету досліджень», яка вже сформульована у вступі.
4. Підрозділи у розділах власних досліджень дуже роздрібнені (наприклад, с. 52 – розділ 3.1. і 3.2 та ін.).
5. У тексті дисертаційної роботи зустрічаються орфографічні та стилістичні неточності, окремі невдалі конструкції, а також повтори формулювань.

Але, вказані зауваження не впливають на загальну високу оцінку виконаної роботи і не зменшують її наукової та практичної цінності.

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

1. Чим обумовлено, що гриби, культивовані на деревних відходах містять менше сквалену ніж дикорослі?
2. Обґрунтуйте, з якою метою Ви надали в роботі інформацію про гіркокаштан звичайний і його біологічно активні речовини.
3. Які ще підходи, окрім застосування тербінафіну, на вашу думку можна використати для підвищення вмісту сквалену у плодових тілах грибів?
4. Які ксилотрофні гриби, на ваш погляд, є найперспективнішими джерелами біологічно активних речовин?

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» є завершеною самостійною науковою працею, виконана з використанням сучасних методів аналізу, має наукову і практичну значимість; у ній відсутні порушення академічної доброчесності.

Таким чином, за актуальністю, науковою новизною, обсягом проведених експериментальних досліджень, а також за ступенем обґрунтованості наукових положень та повнотою викладення матеріалів у фахових наукових виданнях, робота відповідає вимогам Постанови КМУ від 12 січня 2022 року № 44 (зі змінами), а її автор, Корабель Іван Михайлович, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

Професор закладу вищої освіти кафедри
фармакогнозії з медичною ботанікою
Тернопільського національного медичного
університету імені І. Я. Горбачевського
Міністерства охорони здоров'я України,
доктор фармацевтичних наук,
професор



Світлана МАРЧИШИН