

## ВІДГУК

офіційного опонента Щербак Олени Валентинівни  
на дисертаційну роботу Пилипенко Дар'ї Михайлівни  
за темою «Розробка складу та технології ліпосомальної комплексної  
композиції гідрофобних антиоксидантів мембранопротекторної дії»,  
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії  
за спеціальністю 162 - Біотехнології та біоінженерія

**Актуальність теми.** Окислювальний стрес передує або супроводжує велику кількість хвороб: серцевосудинних, онкологічних та ін. Для гальмування його розвитку та нормалізації функціонального стану організму застосовують антиоксиданти різної природи, тому розширення арсеналу лікарських антиоксидантних препаратів є актуальним завданням фармацевтичної біотехнології та має велике соціальне значення. Перспективним напрямком створення нових високоефективних антиоксидантних препаратів є підвищення їх біодоступності за рахунок інкапсуляції у бішар ліпосом.

Фармакологічна активність ліпофільних антиоксидантів куркуміну та кверцетину доведена в онкології, кардіології, офтальмології та ін. сферах медицини. Проте суттєвим недоліком цих сполук є низька біодоступність. Розробка ліпосомальної форми цих двох антиоксидантів забезпечить підвищення їх біодоступності та ефективності. Крім того, ідея створення саме комплексного препарату, який містить два антиоксиданти є перспективною, оскільки дозволить створити високоефективний засіб за рахунок синергізму активних фармацевтичних інгредієнтів.

Таким чином, вважаю, що дисертаційна робота Пилипенко Д.М. присвячена розробці ліпосомальної комплексної композиції із мембранопротекторною і антиоксидантною дією є важливою та актуальною.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційну роботу виконано згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Національного технічного університету «ХПІ» за темою «Комплексне дослідження і оптимізація промислових та фармацевтичних біотехнологій» (номер державної реєстрації № 0118U002336).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Здобувачем уперше теоретично та експериментально обґрунтовано склад і технологію комплексної ліпосомальної композиції гідрофобних антиоксидантів з антиоксидантною та мембранопротекторною дією на підставі комплексу біотехнологічних, мікробіологічних, фармакотехнологічних, фізико-хімічних та фармакологічних досліджень.

Здобувачем уперше обґрунтовано спосіб одержання етанольного екстракту куркуміну із кореневища *Curcuma Longa* з вмістом куркуміноїдів не менше 98% та вмістом диферулометану не менше 70 %. Визначені умови проведення технологічного процесу. Розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення куркуміноїдів у складі екстракту методом високоефективної рідинної хроматографії.

Здобувачем уперше обґрунтовано склад та технологічні параметри одержання комплексної ліпосомальної композиції на основі куркуміну, кверцетину та фосфатидилхоліну у формі ліофілізату, що забезпечує високий ступінь інкапсуляції гідрофобних антиоксидантів, розмір ліпосом не більше 300 нм та стабільність протягом терміну зберігання. Запропоновано методики ідентифікації та кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у складі препарату та розроблено специфікацію контролю якості.

Здобувачем уперше на тест-культурі *Paramecium caudatum* проведено скринінг токсичності ліпосомальних форм антиоксидантів та ліпідів, що входять до складу досліджуваних препаратів, підтверджено антиоксидантну активність ліпосомальних форм куркуміну та кверцетину.

Здобувачем уперше на моделі ішемічної хвороби серця щурів підтверджено синергетичний ефект куркуміну та кверцетину у складі ліпосомального комплексного препарату, що проявляється у нормалізації рівня продуктів перекисного окислення ліпідів у порівнянні з монопрепаратами.

За результатами досліджень подана заявка на патент України на корисну модель «Спосіб отримання комплексної ліпосомальної композиції, що містить кверцетин та куркумін» № u202100468 від 08.02.2021 р.

**Практичне значення отриманих результатів** полягає в створенні та запропонованні для практичної медицини та фармації нової ліпосомальної композиції, що містить ліофілізати куркуміну та кверцетину для терапії станів, пов'язаних із оксидативним стресом, зокрема при лікуванні ішемічної хвороби серця.

Розроблено проекти технологічного регламенту та методик контролю якості розчину куркуміну в етанолі 10 мг/мл у флаконі. Здійснено їх апробацію в умовах дослідної дільниці ДП «Завод хімічних реактивів» (акт апробації від 24.11.2020 р.).

Розроблено проекти технологічного регламенту та методик контролю якості комплексного ліпосомального препарату куркуміну та кверцетину у формі ліофілізату для приготування розчину для інфузій 15 мг у флаконі. Здійснено їх апробацію в умовах дільниці виробництва цеху готових лікарських форм АТ «Фармак» (акт апробації від 08.12.2020 р.).

Фрагменти роботи впроваджено до навчального процес ряду закладів вищої освіти України, що підтверджується актами впровадження.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, що сформульовані у дисертаційній роботі та їх достовірність.** Робота виконана на відповідному методичному та науковому рівні, базується на достатньому фактичному матеріалі й за результатами досліджень повністю відповідає поставленій меті. Наукові положення і висновки, сформульовані у дисертаційній роботі є експериментально

обґрунтованими, мають об'єктивний характер і логічно витікають з отриманих автором результатів. Достовірність отриманих результатів підтверджена достатньою кількістю оброблених дослідів, отримані дані не викликають сумнівів. Дисертаційна робота добре оформлена та має цілком логічну структуру.

#### **Повнота викладу дисертаційних досліджень у наукових працях.**

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 26 наукових праць, в тому числі 2 статті в іноземних виданнях, які індексуються у міжнародній наукометричній базі даних Scopus, 7 статей у наукових фахових виданнях України, 1 розділ монографії, 1 навчальний посібник, 15 тез доповідей.

Участь здобувача у роботах, що опубліковані у співавторстві зазначена у дисертаційній роботі.

За темою дисертації зараховано 10 публікацій: 7 статей у наукових фахових виданнях України, 2 статті в іноземних виданнях, які індексуються у міжнародній наукометричній базі даних Scopus та 1 розділ монографії.

Опубліковані матеріали повністю відображають зміст дисертації та відповідають вимогам пункту 11 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, Затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 р. № 167.

Також необхідно зазначити, що матеріали роботи мають високий рівень **апробації**. Найважливіші положення та висновки дисертації доповідались і обговорювались на міжнародних науково-практичних конференціях і висвітлені у 15 тезах доповідей.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота складається із анотації двома мовами, вступу, шести розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації становить 228 сторінки, у тому числі 166 сторінок основного тексту дисертації. Список використаних джерел налічує 284 найменування на викладений на 33 сторінках. Робота містить 3 додатки на 23 сторінках та ілюстрована 31 таблицею й 38 рисунками.

У **вступі** дисертаційної роботи наведено обґрунтування актуальності теми, сформульовано мету, яка полягає у біотехнологічній розробці складу та технології ліпосомальної комплексної композиції гідрофобних антиоксидантів мембранопротекторної дії. Відповідно до мети визначені завдання, об'єкт, предмет і методи досліджень, а також зазначена наукова новизна отриманих результатів, їх практичне значення, особистий внесок дисертанта, дані щодо апробації результатів роботи та публікацій.

У **першому розділі** «Сучасний стан виробництва нанопрепаратів на основі гідрофобних антиоксидантів та куркуміну (огляд літератури)» наведено аналіз вітчизняних та закордонних літературних джерел стосовно проблеми впливу оксидативного стресу на протікання захворювань, зокрема у кардіології, а також стосовно застосування антиоксидантів куркуміну та кверцетину при їх лікуванні. Особливу увагу здобувачка приділила питанню перспективності ліпосомальних антиоксидантних препаратів з метою підвищення біодоступності та можливості створення ін'єкційних лікарських форм ліпофільних сполук. Розглянуто технологічні основи одержання ліпосомальних форм, їх переваги та недоліки, вимоги нормативної документації до якості ліпосом.

У **другому розділі** «Вибір загальної схеми, матеріалів та методів дослідження» обґрунтовано методологію розробки комплексних ліпосомальних антиоксидантних препаратів, що включає послідовне виконання технологічних, аналітичних та біологічних досліджень. Наведено характеристику сировини і матеріалів, а також представлено біотехнологічні, фармакотехнологічні, фізико-хімічні, мікробіологічні та фармакологічні методи дослідження, що були використані у роботі.

У **третьому розділі** «Розробка технології одержання екстракту куркуміну» представлено результати експериментальних досліджень з розробки технології одержання екстракту куркуміну. У результаті досліджень технологічних показників, що впливають на повноту екстракції куркуміну здобувачем запропонована статична екстракція при температурі

50±2 °C протягом 3–4 годин із використанням етанолу 96% із додаванням 1% 0,1М хлоридної кислоти. Встановлені оптимальні умови очистки екстракту, що забезпечують вихід 1,0±0,2% із вмістом куркуміну не менше 98%. Розроблено специфікацію на екстракт куркуміну та вивчено його стабільність.

У четвертому розділі «Розробка технології одержання ліпосомальної форми куркуміну» наведено результати експериментальних досліджень з розробки біотехнології ліпосомальної форми куркуміну. Вивчені технологічні параметри одержання ліпосомальної форми куркуміну, а саме тиск, температура, співвідношення куркуміну та мембраноутворюючих фосфоліпідів, кількості циклів та ін., які забезпечують розмір ліпосом не більше 150 нм та ступінь включення не менше 85%. Одержаний препарат містив куркумін : фосфатилхолін та ДПФГ (1 : 40 : 4). Розроблена специфікація по контролю одержаного продукту та вивчена його стабільність, умови та термін зберігання.

Для вивчення токсичності та антиоксидантної активності проведено скринінгове дослідження на тест-культурі *Paramecium caudatum*. Досліджено окремі ліпіди та відомі ліпосомальні препарати порівняння. Встановлено, що антиоксидантні властивості досліджуваних препаратів збільшуються у ряду убіхінон<куркумін<кверцетин. Було показано, що аніонний фосфоліпід збільшує токсичність ліпосом на тест-культуру.

У п'ятому розділі «Розробка комплексної ліпосомальної композиції гідрофобних антиоксидантів» дисертанткою представлено дані експериментальних досліджень з розробки біотехнології комплексної ліпосомальної композиції на основі куркуміну та кверцетину. Запропоновано технологічні параметри одержання препарату: кількість циклів екструзії, тиск, температура, співвідношення компонентів, кількість кріопротектору та умови ліофілізації, які дозволяють отримати препарат із розміром ліпосом не більше 300 нм, ступенем включення кверцетину не менше 90%, куркуміну не менше 85%. Готовий препарат у флаконі містить: куркуміну 0,75 мг,

кверцетину 0,75 мг, фосфатидилхоліну 60,0 мг, дипальмітоїлфосфатидилгліцерину 6,0 мг, лактози 840,0 мг. Розроблена специфікація по контролю одержаного продукту та вивчена його стабільність, умови та термін зберігання.

**Шостий розділ** «Дослідження фармакологічної активності ліпосомальних форм гідрофобних антиоксидантів» присвячено вивченню фармакологічної активності розробленого ліпосомального комплексного препарату на основі куркуміну та кверцетину. На моделі ішемічної хвороби серця щурів проведено порівняння ефективності ліпосомальної комплексної композиції та монопрепаратів куркуміну та кверцетину відносно маркерів оксидативного стресу: малоновий діальдегід, дієнові кон'югати, перекисно окислені білки, SH-групи, загальна антиоксидантна активність, активність антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази та каталази. Підтверджено синергетичний ефект куркуміну та кверцетину при введенні у комплексі.

**Зауваження щодо змісту й оформлення дисертації, завершеність дисертації в цілому.** Дисертаційна робота виконана й оформлена на високому рівні, має теоретичну й практичну значущість.

Однак, поряд з високою позитивною оцінкою рецензованої дисертаційної роботи вважаю за необхідне виділити окремі зауваження та побажання.

Виявлені окремі помилки та зауваження щодо тексту дисертаційної роботи, а саме:

1. У роботі необхідно було навести існуючу в Україні базу сировини для одержання екстракту куркуміну та вказати її достатність.

2. Доцільно було б вказати на відмінності складу та технології розробленої композиції за даними порівняння з існуючими ліпосомальними формами.

3. При визначенні стабільності ліофілізованого ліпосомального препарату (Розділ 5.5, С. 152) доцільно було б розглянути ліпосомальні

препарати, представлені на фармацевтичному ринку України, термін та умови їх зберігання.

4. У розділі 6 доцільно було б більш детально описати сутність використаної моделі ішемічної хвороби серця щурів.

5. У роботі є невдалі вислови, деякі граматичні та стилістичні помилки, які не впливають на представлені результати дослідження.

Наявні окремі зауваження не є принциповими і не знижують актуальності, наукової цінності та практичної значимості виконаної роботи.

**У якості наукової дискусії бажано отримати відповіді на наступні запитання:**

1. Які вимоги Ви висували до стандартизації технології при її розробці? Розроблена Вами технологія захищена патентом?

2. У чому ви вбачаєте продовження наукових розробок з обраної Вами проблематики досліджень?

3. Поясніть, будь ласка, процес ліофілізації ліпосомальних форм та його основні стадії?

Загалом робота справляє позитивне враження. Вона логічно побудована, всі розділи послідовно ув'язані, читаються легко з інтересом, написана добротною державною мовою, охайно оформлена, що свідчить про відповідальність здобувачки.

**При розгляді дисертаційної роботи порушень академічної доброчесності виявлено не було.**

**Загальний висновок.** Дисертаційна робота Пилипенко Дар'ї Михайлівни «Розробка складу та технології ліпосомальної комплексної композиції гідрофобних антиоксидантів мембранопротекторної дії» за своїм змістом відповідає спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія. Дисертація є завершеною науково-дослідною роботою, яка розв'язує важливу науково-практичну задачу розробки складу та технології комплексної ліпосомальної композиції гідрофобних антиоксидантів мембранопротекторної дії. Дисертаційна робота відповідає вимогам пунктів



10, 11, 12 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 р. № 167 (зі змінами, затвердженими постановою КМУ від 21 жовтня 2020 р. № 979), а здобувач Пилипенко Дар'я Михайлівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія.

Офіційний опонент, декан факультету біотехнології та природокористування Харківської державної зооветеринарної академії, кандидат сільськогосподарських наук, професор

О.В. Щербак

*Ліоніда Щербак О.В.*  
*засвідчує*



*Наказано в/карт*  
*Ліоніда Щербак*

*Л.М. Москаленко*