

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Кафедра фармакогнозії та ботаніки

КВАЛІФІКАЦІЙНА ВИПУСКНА РОБОТА

На тему: Фармакогностичне дослідження гриба *Verpa bohemica*
(Krombh.) J. Schröt.

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи 98М1А
напряму підготовки (спеціальності)

226 «Фармація, промислова фармація»
освітньої програми фармація
Лиманюк Д.С.

Керівник: к. фарм. н., доцент Підченко В. Т.

Рецензент: к. фарм. н., доцент Шумейко М.В.

Київ – 2023 рік

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Ботанічна характеристика гриба <i>Verpa bohemica</i> (Krombh.) J. Schröt.	9
1.2. Поширення та зв'язок зі справжніми зморшками	10
1.3. Нешкідливість та можливість вживання в їжу	12
1.4. Хімічний склад, фармакологічна дія дія та застосування <i>Verpa bohemica</i> в медицині	15
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	20
2.1. Об'єкти дослідження	20
2.2. Підготовка плодових тіл та біомаси до досліджень	20
2.3. Встановлення вмісту полісахаридів	20
2.4. Встановлення вмісту поліфенольних сполук	20
2.4.1. Побудова калібрувальної кривої	21
2.4.2. Отримання метанольних екстрактів	21
2.5. Ідентифікація БАР в плодових тілах гриба <i>Verpa bohemica</i>	21
2.6. Статистична обробка отриманих результатів	22
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
3.1. Макроскопічний аналіз плодових тіл гриба <i>Verpa bohemica</i>	23
3.2. Культивування міцеліальної біомаси гриба <i>Verpa bohemica</i>	25
3.3. Ідентифікація БАР в плодових тілах <i>Verpa bohemica</i>	28
3.3.1. Ідентифікація полісахаридів	28
3.3.2. Ідентифікація поліфенольних сполук	30
3.3.2. Ідентифікація сапонінів	32
3.4. Кількісне визначення суми полісахаридів гриба <i>Verpa bohemica</i>	34

3.5. Кількісне визначення суми поліфенольних сполук гриба <i>Verpa bohemica</i>	34
Висновки	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41
SUMMARY	47
ДОДАТКИ	48

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАД – біологічно активна добавка

БАР – біологічно активні речовини

ДФУ – Державна фармакопея України

ЛРС – лікарська рослинна сировина

ГПД - глюкозо-пептонне середовище з дріжджовим екстрактом

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

FDA – Food and Drug Administration

V. bohemica – Verpa bohemica

ВСТУП

Актуальність

У світі ідентифіковано близько 2,2–3,8 млн видів грибів, з них описано 150 тис. видів, близько 2000 видів вважаються їстівними, понад 200 видів дикорослих грибів вважаються лікарськими [11, 28]. Завдяки наявності в них біологічно активних речовин (БАР), які можуть покращувати стан здоров'я, цілющі гриби століттями використовувалися в народній медицині по всьому світу. Вони особливо популярні в країнах Азії, наприклад, Китаї, Японії, Тайвані та Кореї. Оскільки гриби містять в своєму складі різні групи БАР, зокрема полісахариди, білки, пептиди, терпеноїди, поліфеноли, вітаміни та мінеральні елементи, вони проявляють різноманітну фармакологічну активність, зокрема, протипухлинну, протизапальну, антиоксидантну, гіпохолестеринемічну, гіпоглікемічну, імуномодулюючу та ін. [17, 43].

Хімічний профіль лікарських грибів може змінюватись в залежності від виду, штаму, умов культивування (штучне культивування чи збирання дикорослих плодових тіл) [14] і ступеня зрілості [9]. Це значною мірою визначається екологічними (кількість води, світла, УФ-випромінювання) [17, 27] та біологічними (тип субстрату/господаря, наявність конкуруючих грибів) факторами. Існування великої кількості видів лікарських грибів з їх різноманітним хімічним складом і вмістом біологічно активних сполук, а отже різноспрямованим впливом на організм людини, може зробити гриби об'єктами наукового інтересу. У 2020 році обсяг світового ринку грибів становив 14,35 млн тонн; за оцінками, у 2028 році він зросте до 24,05 млн тонн [42], що підтверджує актуальність теми.

Verpa bohemica (Krombh.) J. Schröt. (верпа богемська, зморшкова шапинка, ранній сморчок) – малодосліджений, але широко розповсюджений в Україні аскомікотовий гриб. Сучасні іноземні дослідження показали, що гриб

Verpa bohemica може проявляти антибактеріальну, протигрибкову та антиоксидантну активність [16, 31, 33, 37, 41].

В той же час, даних щодо хімічного складу БАР, що входять до складу гриба *Verpa bohemica* майже немає, а інформація щодо грибів, зібраних на території України – відсутня.

Також відсутні дані щодо вмісту основних груп БАР в плодових тілах гриба *Verpa bohemica* у порівнянні з міцеліальною біомасою, яку можна отримати за допомогою біотехнологічних методів. Одним з них є культивування біомаси грибів на рідких живильних середовищах стандартизованого складу. Цей метод широко використовується сьогодні різними дослідниками, оскільки дозволяє стандартизувати отриману сировину для потреб фармацевтичної промисловості [32].

Мета дослідження:

Провести фітохімічне дослідження плодових тіл гриба *Verpa bohemica*, зібраних на території України для ідентифікації та кількісного визначення основних груп біологічно активних речовин та порівняти кількісний склад з міцеліальною біомасою, отриманою біотехнологічним методом.

Завдання дослідження:

- Провести макроскопічне дослідження та встановити основні видоспецифічні ознаки плодових тіл гриба *Verpa bohemica*;
- Ідентифікувати основні групи біологічно активних речовин в плодових тілах *Verpa bohemica*;
- Визначити хімічну природу сапонінів в плодових тілах гриба;
- Визначити кількісний вміст суми полісахаридів та поліфенольних сполук в плодових тілах і міцеліальній біомасі гриба *Verpa bohemica*.
- Провести порівняння дикорослих плодових тіл та міцеліальної біомаси за кількісними показниками основних груп БАР.

Предмет дослідження:

Фітохімічне дослідження дикорослих плодових тіл та міцеліальної біомаси гриба *Verpa bohemica* штаму 1845.

Об'єкт дослідження:

Плодові тіла та міцеліальна біомаса гриба *Verpa bohemica*.

Методи дослідження:

Міцеліальну біомасу гриба *Verpa bohemica* отримували методом культивування на рідкому глюкозо-пептонному середовищі з дріжджовим екстрактом (ГПД). Для ідентифікації основних груп БАР використовували загальновідомі реакції [1, 3-5]. Для кількісного визначення вмісту суми полісахаридів використовували гравіметрію [1], а для встановлення суми поліфенольних сполук – спектрофотометрію [4,5].

Новизна та значення одержаних результатів

Проведено фармакогностичне дослідження дикорослих плодових тіл гриба *Verpa bohemica*, зібраних на території України. Ідентифіковані основні групи БАР, зокрема полісахариди, поліфеноли та сапоніни, і вперше визначена тритерпенова природа сапонінів. Порівняльне дослідження кількісного вмісту суми полісахаридів та поліфенольних сполук у дикорослих плодових тілах та в міцеліальній біомасі в рамках одного штаму проведено вперше.

Апробація результатів дослідження

Результати роботи апробовані на науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку» 19-20 грудня 2023 року.

Публікації

Підченко В.Т., Двірна Т.С., Лиманюк Д.С. Порівняльне дослідження вмісту суми полісахаридів та поліфенольних сполук у плодових тілах та біомасі гриба *Verpa bohemica* (Krombh.) J. *Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку»* 19-20 грудня 2023 року. С. 177-178.

Структура роботи

Загальна кількість сторінок – 47, кількість розділів – 3, кількість використаних джерел – 43.

РОЗДІЛ І.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ботанічна характеристика *Verpa bohemica*

Verpa bohemica (Krombh.) J. Schröt. (верпа богемська, зморшкова шапинка) належить до типу *Ascomycota*, класу *Pezizomycetes*, порядку *Pezizales*, родини *Morchellaceae*. Систематичне положення виду [6, 13]:

Царство – Гриби (*Fungi*)

Відділ – Аскомікотові гриби (*Ascomycota*)

Клас – Пецицоміцети (*Pezizomycetes*)

Порядок – Пецицальні (*Pezizales*)

Родина – Зморшкові (*Morchellaceae*)

Рід – Верпа (*Verpa*)

Вид – Верпа богемська (зморшкова шапинка) (*Verpa bohemica*)



Рис. 1.1 *Verpa bohemica* в природі

Шапинка гриба *Verpa bohemica* (рис. 1.1) 2-5 см завдовжки, 2-4 см завширшки, від конічної до дзвоникуватої форми, поздовжньо складчаста, від жовто-коричневого до коричневого або темно-бурого кольору і прикріплена лише всередині верхньої частини шапинки, з вільними краями. Ніжка 6-12 см завдовжки і 1-2,5 см завширшки, звужується догори, гладка або зморшкувата зовні, від білого до кремово-жовтуватого кольору, порожниста. Аски мають розміри 250-350 x 25-27 мкм, містять 8 еліптичних, гладких жовтуватих аскоспор 60-80 x 15-18 мкм; парафізи численні і збільшені до 7-8 мкм в діаметрі на верхівці. М'якуш тонкий, воскоподібний, майже без смаку і запаху [2].

Це умовно їстівний гриб, тобто їстівний після термічної обробки. В той же час існують дані, що він може викликати розлад шлунково-кишкового тракту та порушення координації при споживанні його у великій кількості [21, 30].

1.2. Поширення та зв'язок зі справжніми зморшками

Справжні сморчки (*Morchella* spp.) або губчасті гриби є їстівними дикорослими грибами, мають унікальний смак [2], високу ринкову вартість [27] і зростаючий попит на міжнародному ринку [42]. Це додатковий ресурс заробітку для місцевих жителів у різних країнах [6, 35]. Сморчки є популярними серед споживачів у США, Мексиці, Китаї, Індії, Туреччині та деяких країнах Європи [8, 16, 33]. Орієнтовне річне споживання сушених сморчків у світі становить близько 900 000 кг із середньою ціною 160 доларів США/кг станом на 2015 рік [16]. Сморчки ростуть у диких лісах помірного поясу, включаючи широколистяні та хвойні ліси у різних частинах земної кулі [33]. Цей вид також широко розповсюджений в країнах Європи та України (рис.1.2).

Крім справжніх сморчків, в деяких країнах широко розповсюджені та мають давню традицію споживання «несправжні» або «ранні сморчки».

Весняний аскоміцет *Verpa bohemica* – «ранній сморчок» – має давню традицію споживання в деяких країнах. Для прикладу, у Європі він широко відомий у регіоні Емілія-Романья (Північна Італія), де його регулярно збирають, безпечно споживають і офіційно продають наряду зі справжніми сморчками (*Morchella* spp.).



Рис. 1.1 Ареал поширення *Verpa bohemica* в Європі та Україні [25]

Verpa — епігейний рід у складі родини *Morchellaceae* (Ascomycota, Pezizomycotina). Філогенетичний аналіз рибосомної ДНК виявив тісний зв'язок між ним та родом *Morchella* [13]. *Verpa* spp. також називають несправжніми або ранніми сморчками через подібну морфологію їх аскокарпії та більш ранню появу навесні порівняно зі справжніми сморчками (*Morchella* spp.) [8].

Verpa spp. широко поширені в північних помірних зонах і спочатку були знайдені в північних частинах Північної Америки, Європи та Азії. Хоч ця родина вважається не такою поширеною, порівняно зі справжніми сморчками,

але несправжні сморчки часто зустрічаються в широкому діапазоні середовищ існування та умов навколишнього середовища [6].

Загалом 28 видів *Verpa* зареєстровано в Index Fungorum [26], серед яких два види — *V. bohemica* і *V. conica* — найбільш вивчені.

V. bohemica плодоносить з березня до початку травня, іноді рясно, в той час, справжні сморчки з'являються на два-три тижні пізніше, за умов однакової висоти та орієнтації схилу, на якому вони ростуть. *V. bohemica* росте під декількома видами широколистяних дерев, зокрема в'язами (*Ulmus* spp.), тополями (*Populus* spp.) і вербами (*Salix* spp.), часто вздовж річок і струмків, і часто приховані в густих заростях ожини та шипшини (*Rubus* spp. і *Rosa* spp. відповідно) у підліску. У багатих на вологу місцях він також може рясно рости в каштанових або букових лісах, особливо на узліссях або поблизу руїн будівель і кам'яних стін. Згідно даних літератури, у Європі досліджений ареал поширення від передгір'я Нижніх Апеннін до Верхніх Апеннін, до висоти приблизно 1500 м над рівнем моря [33].

В Україні *Verpa bohemica* віддає перевагу багатим гумусом ґрунтам у хвойно-широколистяних лісах зеленомохового типу. Зазвичай зустрічається в розріджених насадженнях під осикою та липою. Період плодоношення *V. bohemica* порівняно нетривалий і починається у другій декаді травня. Але в залежності від погодних умов він може зміщуватися як на кінець травня, так і закінчуватися на початку червня. В нашій країні також вважається умовно-їстівним видом [2].

1.3. Нешкідливість та можливість споживання в їжу

Дані літератури щодо безпечності *V. bohemica* досить суперечливі та досі немає єдиної думки щодо цього питання.

На сьогоднішній день *V. bohemica* все ще значиться серед підозрілих або токсичних грибів у більшості північноамериканських та деяких європейських дослідженнях, незважаючи на відсутність задукоментованого підтвердження

наявності таких токсинів, як гіромітрин і коприн, які, як вважається, містяться у *V. bohemica*. В той же час відсутні достовірні токсикологічні дослідження вживання даного виду. Фактично, випадки отруєння після споживання *V. bohemica*, про які іноді повідомляється в літературі, могли бути неправильно інтерпретовані, оскільки описуються як так званий «неврологічний синдром», пов'язаний із прийомом *Morchella* spp. [39]

У США *Verpa bohemica* багатьма довідниками вважається підозрілим або токсичним; навіть якщо він вважається їстівним, його, як правило, не рекомендують вживати в їжу, і завжди враховують, що він може викликати шлунково-кишкові розлади у деяких людей. Згідно досліджень [23, 38], *V. bohemica* «їстівний для одних людей, але отруйний для багатьох інших, спричиняючи різноманітні реакції, включаючи серйозні шлунково-кишкові розлади та тимчасову втрату координації». Подібну інформацію про токсичність ранніх сморчків можна знайти в книгах про гриби [22, 42], а також у деяких європейських польових путівниках.

В той же час є значна кількість робіт, які вказують, що *V. bohemica* є їстівним. У збірнику FAO дикорослих їстівних грибів *V. bohemica* включено до глобального списку дикорослих грибів, які використовуються в їжу, а також серед «економічно важливих диких грибів» [12]. Італійські дослідники вважають, що *V. bohemica* можна безпечно вживати в їжу, тому його слід включити до їстівних видів грибів. Відповідно, в Емілії-Романьї він офіційно включений на регіональному рівні до позитивного списку їстівних грибів, дозволених для торгівлі [15]. Очевидно, що це один із тих випадків контрастної оцінки їстівності, які часто зустрічаються в (етно)мікологічній літературі [15].

Вважається, що плутанина щодо їстівності *V. bohemica* походить від північноамериканської мікологічної літератури, зокрема Лінкоффа та Мітчела «Отруєння токсичними та галюциногенними грибами» [30], авторитетного джерела мікотоксикологічної інформації, яка все ще є провідною довідкою в

цій галузі, яку часто цитували мікологи протягом наступних десятиліть. Фактично, Лінкофф і Мітчел, цитуючи попередні та розрізнені випадки отруєнь, спричинених вживанням ранніх сморчків, писали: «...можливо, що *Verpa bohemica*, або певні сорти чи плодові тіла цього виду містять або можуть синтезувати низькі рівні гіромітрину» [30]. Проте наявність гіромітрину у *V. bohemica* ніколи не було продемонстровано експериментально. Італійські вчені провели ретельний бібліографічний пошук, і не змогли знайти жодного посилання, яке однозначно підтверджує виявлення гіромітрину та його аналогів у *V. bohemica*, ні до, ні після публікації книги Лінкоффа та Мітчела. Тим не менш, їхні погляди, безсумнівно, консолідувалися протягом багатьох років і, мабуть, залишалися широко визнаними у США та інших країнах. Щодо офіційного статусу *V. bohemica* у США все також не однозначно. Наскільки відомо, згідно з FDA, *V. bohemica* об'єднується у одну групу з *Gyromitra* spp. і *Helvella* spp., і усі вони вважаються токсичними [19]. Згідно офіційних звітів FDA, виявлення *V. bohemica* в партіях сушених і консервованих сморчків для імпорту в США призвело до невідповідності вантажу та неможливості отримати митне оформлення [20]. Звісно, потрібна обережність при роботі з *Gyromitra*, але офіційне внесення *Verpa bohemica* до токсичних грибів за відсутності будь-яких обґрунтованих експериментальних доказів є сумнівним.

Відомо, що майже всі види їстівних дикорослих грибів можуть викликати отруєння із шлунково-кишковими симптомами через такі причини, як неповне приготування, вживання старих зразків або надмірне споживання. Можливо, це цілком могло статися і з *V. bohemica*, а шлунково-кишкові та неврологічні симптоми, про які повідомлялося після вживання ранніх сморчків, могли бути сплутані з так званим «мозочковим синдромом», пов'язаним із споживанням надмірних кількостей *Morchella* spp., який був чітко задокументований лише в останні роки [36]. Насправді наявність неврологічних симптомів при мозочковому синдромі ідеально збігається з

описами отруєнь *V. bohemica*, про які повідомлялося в попередній літературі, де спостерігалось порушення координації або відсутність м'язової координації.

Передбачувана наявність коприну у *V. bohemica* також пояснюється отруєнням, про яке повідомлялося після вживання ранніх сморчків разом з алкогольними напоями. Незважаючи на відсутність будь-яких експериментальних підтверджень з аналітичної точки зору, *V. bohemica* все ще можна знайти в списку серед токсичних грибів, що містять коприн, та викликають дисульфірамоподібний синдром [25]. Італійські дослідники акцентують увагу на тому, що в Емілії-Романї споживання *V. bohemica* зазвичай супроводжується «келихом вина», і ніколи не повідомлялося про випадки отруєння коприноподібним синдромом.

Таким чином, згідно сучасних даних літератури щодо статусу їстівності *V. bohemica* та справжні сморчки (*Morchella* spp.) вважаються ідентичними. Обидва вони вважаються їстівними, за умови, що вони ретельно проварені. *Verpa bohemica* безсумнівно є економічно важливим продуктом харчування в деяких країнах світу.

1.4. Хімічний склад, фармакологічна дія та застосування *Verpa bohemica* у медицині.

Дикорослі гриби набули важливого значення в раціоні людини не лише завдяки своїй поживній цінності, але й завдяки властивостям вторинних метаболітів, які проявляють лікарські властивості. Прикладами широко розповсюдженими сьогодні нутрицевтиків або «функціональних харчових інгредієнтів» є харчові волокна, поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК, риб'ячий жир), білки, пептиди, амінокислоти, кетокислоти, мінерали, антиоксидантні вітаміни та інші антиоксиданти (глутатіон, селен тощо) [7, 14, 27, 31, 33]. Відомо, що ПНЖК, особливо сімейство n-3-жирних кислот, запобігають розвитку серцево-судинних і запальних захворювань [7].

Гриби накопичують різні вторинні метаболіти, включаючи фенольні сполуки, терпени та алкалоїди, і цінуються за їх хімічні та поживні властивості [14]. Гриби вважаються лікувальною їжею, оскільки вони корисні для профілактики таких захворювань, як гіпертонія, гіперглікемія та рак [31, 40, 41]. Епідеміологічні дослідження постійно демонструють зв'язок між споживанням овочів/фруктів і ризиком серцево-судинних захворювань і певних форм раку [31]. Захисну дію в першу чергу приписують добре відомим антиоксидантам, таким як аскорбінова кислота, токоферолі, фенольні сполуки та β -каротин [18]. Окислення має важливе значення для аеробних організмів для виробництва енергії та запуску біологічних процесів, що її генерують. Проте вільні радикали, утворені з кисню, беруть участь у виникненні багатьох захворювань, таких як рак і атеросклероз, а також у дегенеративних процесах, пов'язаних зі старінням [24]. Майже всі аеробні організми добре захищені від вільних радикалів такими ферментами, як супероксиддисмутаза або такими сполуками, як токоферолі та глутатіон [18]. Антиоксиданти в раціоні людини представляють великий інтерес як можливі захисні агенти, які допомагають людському організму зменшити окисне пошкодження.

Гриби є привабливим джерелом нутрицевтиків [7, 33] і здатні проявляти антиоксидантну дію [41], протипухлинні [16] та антимікробні властивості [9, 40]. Дикорослі гриби багаті поживними речовинами та мають високий вміст білка і низький вміст жиру [30].

Хімічний склад гриба *Verpa bohemica* на сьогоднішній день є маловивченим.

У таблиці 1.1. наведені показники харчової цінності гриба *Verpa bohemica* у порівнянні з іншими відомими базидіальними та аскомікотовими грибами, зокрема *Agaricus bisporus*, *Coprinus atramentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Morchella esculenta* та *Pleurotus ostreatus*. У дослідженні використовували види, зібрані на території Гімалаїв, в Індії [41].

Таблиця 1.1.

Склад гриба *Verpa bohemica* та інших відомих грибів, % [41]

Склад	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Coprinus atramentarius</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Morchella esculenta</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Verpa bohemica</i>
білки	36.18	31.00	31.12	31.75	25.56	34.37
вуглеводи	39.96	45.30	50.01	48.95	46.5	49.67
жири	2.15	2.70	1.16	1.90	1.40	1.60
зола	10.43	12.22	13.87	11.87	8.02	10.34
вологість	8.09	10.00	4.12	8.02	11.07	8.54

Таблиця 1.2.

Мікроелементний склад гриба *Verpa bohemica* у порівнянні з відомими грибами, мг/100г сухої ваги [41]

мікро-елемент	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Coprinus atramentarius</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Morchella esculenta</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Verpa bohemica</i>
фосфор	460±20	140±20	150±10	120±10	230±20	410±10
калій	2060±25	2060±12	2230±20	2200±50	1950±13	2230±15
кальцій	9±0.045	8±0.07	9±0.15	10±10	10±0.05	10±10
магній	30±2.65	20±10	20±4.58	30±10	60±1	40±20
залізо	61.37±0.22	43.61±0.23	84.20±0.10	38.05±0.09	7.12±0.025	5.15±0.04
марганець	3.49±0.02	3.33±0.04	3.22±0.09	1.81±0.01	1.59±0.06	1.29±0.07
цинк	6.143±0.07	8.633±0.1	9.463±0.02	7.057±0.03	4.256±0.01	5.730±0.03
мідь	2.12±0.07	1.95±0.04	8.66±0.04	1.07±0.02	1.80±0.01	2.16±0.02
натрій	52±1.54	47±1.20	28±1.65	65±1.56	58±1.69	76±2.76
нікель	0.52±0.02	0.35±0.02	0.50±0.01	0.47±0.01	0.35±0.01	0.55±0.01
свинець	0.200±0.03	0.218±0.06	0.19±0.03	0.120±0.03	0.12±0.07	0.112±0.015
кадмій	0.05±0.001	0.061±0.001	0.021±0.003	0.021±0.004	0.008±0.001	0.089±0.003

Індійськими вченими був досліджений також мікроелементний склад згаданих вище грибів. Як видно з табл. 1.2. плоді тіла *Verpa bohemica* містять в своєму складі всі досліджувані мікроелементи у кількостях співставних, або

навіть більших, ніж відомий в країнах Сходу вид *Ganoderma lucidum*, який сьогодні широко використовуються в медицині та фармації багатьох країнах світу. Слід зазначити, що сировина *Ganoderma lucidum* з 2023 року офіційно внесена до ДФУ 2.6. [1].

В той же час, даних щодо хімічного складу БАР, що входять до складу плодових тіл та/або міцелію гриба *Verpa bohemica* майже немає, а інформація щодо грибів, зібраних на території України – відсутня.

Згідно даних літератури, справжні сморчки (*Morchella* spp.) проявляють протипухлинну, антимікробну, протизапальну, антиоксидантну, антиатеросклеротичну, протидіабетичну, імуномодулюючу, адаптогенну дію. Він підвищує адаптогенну дію та покращує метаболізм. Фармакологічну дію справжніх зморшків пов'язують із наявністю полісахаридів, при цьому механізми не до кінця вивчені [12].

В той же час, даних щодо фармакологічної активності ранніх зморшків мало, у зв'язку з тим, що в деяких країнах він вважається токсичним, про що ми писали вище.

V. bohemica використовується як дієтична добавка, та як антиоксидантний засіб у племінних районах Кашміру в Гімалаях. Тим часом сучасні дослідження показали, що *V. bohemica* проявляє досить сильну антибактеріальну та протигрибкову активність [9, 40], а також сильну антиоксидантну активність [41]. Крім того, високий вміст ловастатину, γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) та ерготіонеїну було виявлено в міцеліальній та одноклітинній біомасі *V. bohemica*, що означає, що гриб може проявляти протизапальну, антиоксидантну, профібринолітичну та антигіпертензивну дію [16]. З іншого боку, окрім сильної антиоксидантної активності в різних експериментальних системах близькоспоріднений вид *V. conica* демонстрував сильне лакказоподібне посилення активності мультимідної оксидази в присутності природного фенольного з'єднання гваяколу [16].

В Україні використовується в народній медицині для лікування захворювань очей і травного тракту [2].

Зважаючи на все вищезазначене, можна зробити висновок, що гриб *Verpa bohemica* є перспективним джерелом БАР, але при цьому залишається маловивченим. Таким чином, проведення комплексного фармакогностичного дослідження гриба, зібраного на території України є актуальним.

РОЗДІЛ II.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

У дослідженнях використовували міцелій (біомасу) гриба *Verpa bohemica* штам IBK 1845 з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки НАН України. Плодові тіла були зібрані на території України у мішаному лісі у стрийському районі Львівської області біля смт. Славське. Штам гриба був виділений зі спорового матеріалу зібраних плодових тіл.

2.2. Підготовка плодових тіл та біомаси до досліджень

Плодові тіла та біомасу висушували у за температурного режиму 60 °С у сушильній шафі, після чого здрібнювали на порошок за допомогою фарфорової ступки.

2.3. Встановлення вмісту полісахаридів

Полісахариди з плодових тіл та біомаси екстрагували дистильованою водою (співвідношення 1:5) протягом 16 год у сушильній шафі за температури $98,0 \pm 0,1$ °С. Осадження отриманого екстракту проводили 96% етанолом у співвідношенні 1 : 2 до об'єму за температури $4,0 \pm 0,1$ °С протягом 24 год. Осад центрифугували при 5000 об/хв протягом 25 хв., потім ресуспензували в дистильованій воді гарячій ($90,0 \pm 0,1$ °С). Отримані фракції полісахаридів висушували до постійної маси за температури $60,0 \pm 0,1$ °С. Кількість полісахаридів визначали гравіметричним методом. Вміст виражали у відсотках від сухої маси. Кількість повторностей – 4 [1].

2.4. Встановлення вмісту суми поліфенольних сполук

Визначення суми поліфенольних сполук проводили спектрофотометрично за методикою Фоліна-Чокальтеу. Вміст фенольних сполук визначали наступною методикою: 0,5 мл метанольного екстракту плодових тіл або біомаси змішували з 0,5 мл реагенту Фолліна-Чокальтеу та витримували 3 хв. при кімнатній температурі, після чого додавали 10 мл

розчину карбонату натрію (75 г/л) і 5 мл води дистильованої, перемішували та витримували за кімнатної температури протягом 1 год в темряві.

Поглинання зразків вимірювали при довжині хвилі 750 нм на спектрофотометрі 6850 UV/VIS JENWAY. Вміст поліфенольних сполук виражали в перерахунку на галову кислоту у мг/г. Дослідження проводили у 4х кратній повторюваності.

2.4.1. Побудова калібрувальної кривої

Для побудови калібрувальної кривої у мірні колби на 25 см³ вносили 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 та 5,0 см³ робочого розчину (0,2 мг галової кислоти/см³). До кожної проби додавали 2 см³ реактиву Фоліна-Чекальтеу і через кілька хвилин 10 см³ 7,5% розчину Na₂CO₃ і доводили об'єм водою до мітки. В одержаних розчинах концентрація галової кислоти у перерахунку на досліджувану пробу дорівнювала 0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 та 40,0 мкг галової кислоти/см³.

Оптичну густина приготованих розчинів вимірювали через 40 хвилин на спектрофотометрі, використовуючи світлофільтр із довжиною хвилі ($\lambda = 750$ нм) у кюветах із товщиною поглинаючого світлошару 5 мм. За отриманими даними будували калібрувальний графік – залежність оптичної густини від початкової концентрації розчину галової кислоти.

2.4.2. Отримання метанольних екстрактів

Для проведення дослідження вмісту суми поліфенольних сполук використовували метанольні екстракти, які отримували екстрагуванням 1 г біомаси та плодових тіл гриба в 6 мл абсолютного метанолу (HANEYWELL, CHROMASOLV TM Gradient for HPLC, gradient grade, $\leq 99.9\%$) за температури $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ протягом 7 діб.

2.5. Ідентифікація БАР в плодових тілах гриба *Verpa bohemica*

Ідентифікацію різних груп біологічно активних речовин проводили у водних та водно-спиртових витягах за допомогою загальновідомих хімічних реакцій [3-5].

2.6. Статистична обробка отриманих результатів

Для отримання достовірних результатів експериментальні дослідження залежно від умов аналізу та вимог математичного планування здійснювали у 3–4 повторностях. Після фіксації досліджуваних показників їх достовірні значення обчислювали статистичними методами аналізу і знаходили такі показники: значення середніх квадратичних відхилень, коефіцієнтів варіацій, довірчих інтервалів. У таблицях наведено середні статистично достовірні дані при 95%-й ймовірності.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали із використанням комп'ютерного програмного забезпечення – Microsoft Office 365.

РОЗДІЛ III.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Макроскопічний аналіз плодових тіл гриба *Verpa bohemica*.

Сировиною для досліджень служили молоді плодові тіла гриба *V. bohemica*, зібрані на території України. Висушена лікарська сировина має легкий специфічний запах і смак. Шапинка конічно-дзвоникувата, жовто-коричневого або бурого кольору. Довжина шапки у висушеному вигляді складає від 2,5 до 5,5 см, діаметр - від 1,5 до 3,5 см. (рис.3.1., рис.3.3.).



Рис. 3.1. Плодове тіло гриба *Verpa bohemica*

Шапинка прикріплюється до ніжки лише центральною частиною основи до звуженої верхівки ніжки, наче «одягнута» на неї, що відрізняє цей вид від

справжніх зморшків, у яких шапинка прикріплена до ніжки більшою частиною основи шапинки. Ніжка від світло-кремового до жовтуватого кольору. Довжина ніжки від 3,5 до 10 см., діаметр ніжки від 0,5 до 1,5 см (рис.3.2.). Споровий порошок жовтувато-зеленувато-бурого кольору.



Рис. 3.2. Ніжка гриба *Verpa bohemica*

М'якуш ніжки брудно кремового кольору, має крихку структуру з гладкою поверхнею. Гіменофор має гладку поверхню, але при висушуванні утворює хвилясті лінії (рис.3.3).



Рис. 3.3. Шапинка та гіменофор гриба *Verpa bohemica*

3.2. Культивування міцеліальної біомаси гриба *Verpa bohemica*

Збір дикорослих грибів є поширеним у багатьох країнах світу у зв'язку з їх фармакологічними властивостями та економічною цінністю. В той же час, на сьогоднішній день зростає інтерес до культивування грибів сучасними біотехнологічними методами. Культивування грибів зазвичай проводять для отримання БАР з метою використання в медицині та фармації. Одним із широко розповсюджених методів серед дослідників є культивування на рідких живильних середовищах, оскільки цей метод дозволяє створити оптимальні контрольовані умови росту гриба та сталу кількість БАР у отриманій біомасі.

Гриб *V. bohemica* можна вирощувати на синтетичних або напівсинтетичних середовищах з ознаками сапрофітного росту, оскільки це пов'язано із наявністю ферментів, які розкладають субстрат. В якості поживного середовища для вирощування гриба може використовуватись пшениця, жито, ячмінь, тирса, опале листя дерев, молочна сироватка тощо [12].

На відміну від культивування біомаси, для культивування плодових тіл грибів зазвичай використовують екстенсивний та інтенсивний методи. Екстенсивний метод полягає у вирощуванні плодових тіл на відрізках стовбурів фруктових дерев у затінених, вологих місцях. Зазвичай використовують лише широколистякові та дрібнолистякові породи дерев. Вирощування плодових тіл цим методом зазвичай займає від 6 місяців до 2 років.

Інтенсивний метод вирощування полягає у вирощуванні плодових тіл на тирсі твердих листових дерев, яку поміщають у пляшки з вузьким горлом або поліпропіленові пакети. Вирощування плодових тіл інтенсивним методом зазвичай займає від одного до трьох місяців.

Станом на сьогодні отримати плодове тіла *V. bohemica* ще не вдалось, оскільки цей гриб має складний біологічний цикл розвитку, який залежить від великої кількості факторів, що включають в себе клімат, склад ґрунту, наявність мікроорганізмів та ін. Також цей вид є мікоризним, тобто він взаємодіє з кореневою системою рослин [25].

В такому випадку доцільно використовувати отримання міцеліальної біомаси методом культивування міцелію на рідких поживних середовищах *in vitro*, що дозволяє скоротити виробний цикл до 2-3 тижнів, забезпечити більший та стабільніший урожай, та стандартизувати сировину за якісними і кількісними показниками.

В наших дослідженнях для отримання біомаси ми використовували стандартизоване рідке живильне середовище глюкозо-пептонне з дріжджовим екстрактом (ГПД): глюкози – 25,0 г/л; пептону – 3,0 г/л; дріжджового екстракту – 2,0 г/л; K_2HPO_4 – 1,0 г/л; K_2HPO_4 – 1,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 г/л. Кислотність середовища доводили до значення $\text{pH} = 6,5$ за допомогою розчинів 1н КОН і 1 н НСІ.

Інокулювали мікробіологічні матраци фізіологічно активним міцелієм в кількості 20 мл гомогенату в кожний (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Міцеліальна колонія гриба *Verpa bohemica* на глюкозо-пептон-дріжджовому агарі

Вирощування біомаси (рис. 3.5) проводили на мікробіологічних матрацах об'ємом 500 мл, що містили 150 мл рідкого середовища ГПД, за температурного режиму 26 ± 1 °C впродовж 9 діб.



Рис. 3.5. Міцеліальна біомаса *Verpa bohemica* на рідкому середовищі ГПД на 9 добу культивування

Отриману біомасу та плодові тіла сушили за температури 60 °С та здрібнювали на порошок з метою проведення подальших досліджень, зокрема проведення якісних реакцій і кількісного визначення основних груп БАР (рис.3.6).



Рис. 3.6. Порошок біомаси гриба *Verpa bohemica*

3.3. Ідентифікація БАР в плодових тілах гриба *Verpa bohemica*

3.3.1. Ідентифікація полісахаридів.

Ідентифікацію полісахаридів проводили у водному екстракті плодових тіл гриба. Для цього 5,1 г подрібненого порошку плодових тіл гриба поміщали у колбу, додавали 100 мл води дистильованої і лишали на 30 хвилин на киплячій водяній бані. Після цього вміст колби охолоджували та відфільтровували через 3-4 шари марлі. Полісахариди осаджували 96% етанолом.

Після додавання спирту етилового спостерігали утворення аморфного осаду, що свідчить про наявність полісахаридів у складі плодових тіл гриба *Verpa bohemica* (рис. 3.7).



Рис.3.7. Утворення аморфного осаду в результаті реакції осадження полісахаридів етанолом

Наявність полісахаридів підтверджуються даними літературних джерел щодо вмісту різних груп полісахаридів у представників родини *Morchellaceae*. Зазвичай полісахариди проявляють основну фармакологічну активність більшості лікарських грибів. Вуглеводи грибів представлені моносахаридами (глюкоза, фруктоза, галактоза), спиртовими цукрами (манітол), олігосахаридами (трегалоза, малезитоза) і полісахаридами, серед яких гомополісахариди (глюкани, хітин, глікоген) і гетерополісахариди (ксиломаннан), α -(1 \rightarrow 4)-D-глюкопіранозил і β -(1 \rightarrow 6)-D-галактопіранозил з відгалуженнями в O-6 глюкози та O-2 галактози, 6-O-галактопіранози, заміщені в O-2 на 3-O-D-маннопіранозил-L-фукопіранозил, α -D-маннопіранозил і α -L-фукопіранозил, α -(1 \rightarrow 3)-зв'язана галактоза, з β -(1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 6)-глюкозою і фукозні гілки, можна виділити слиз, що складається з глюкози та галактози). Вуглеводи також можуть зустрічатися в комплексах з іншими сполуками (наприклад, білками) і можуть включати різні субдиниці

цукру [16, 40]. Залежно від структури, типу зв'язку і молекулярної маси вуглеводи мають різні функціональні властивості.

В той же час даних щодо полісахаридного складу представників роду *Verpa* на сьогоднішній день дуже мало.

3.3.2. Ідентифікація поліфенольних сполук.

Ідентифікацію поліфенольних сполук, зокрема флавоноїдів, проводили у спиртовому витязі з плодових тіл гриба *Verpa bohemica*, який отримували наступним чином: у колбу до 5,1 г порошку плодових тіл додавали 100 мл етанолу (50%), вміст колби нагрівали на водяній бані протягом 30 хвилин. Отриманий розчин охолоджували та відфільтровували через 4 шари марлі. Проводили наступні якісні реакції:

1. з розчином заліза (III) хлоридом: в пробірку до 1 мл витягу додавали 2-3 краплі 1% розчину FeCl_3 . В результаті реакції спостерігали утворення червоно-коричневого забарвлення (рис.3.8а). Таке забарвлення може свідчити про наявність в сировині флавонів, флаванонів, халконів, ауронів.

2. з розчином лугу: в пробірку до 1 мл витягу додавали 1-2 краплі розчину NaOH (10%). В результаті реакції спостерігали появу червоного забарвлення, що може свідчити про наявність різних груп флавоноїдів, зокрема полігідроксифлавонолів та/або халконів та ауронів (рис.3.8б).

3. з розчином ацетату свинцю: в пробірку до 1 мл витягу додавали 3-4 краплі розчину плюмбуму ацетату (10%). В результаті реакції спостерігали утворення жовто-кремового об'ємного осаду, що свідчить про наявність флавонів, халконів, ауронів та/або сапонінів (рис.3.8в) [1].

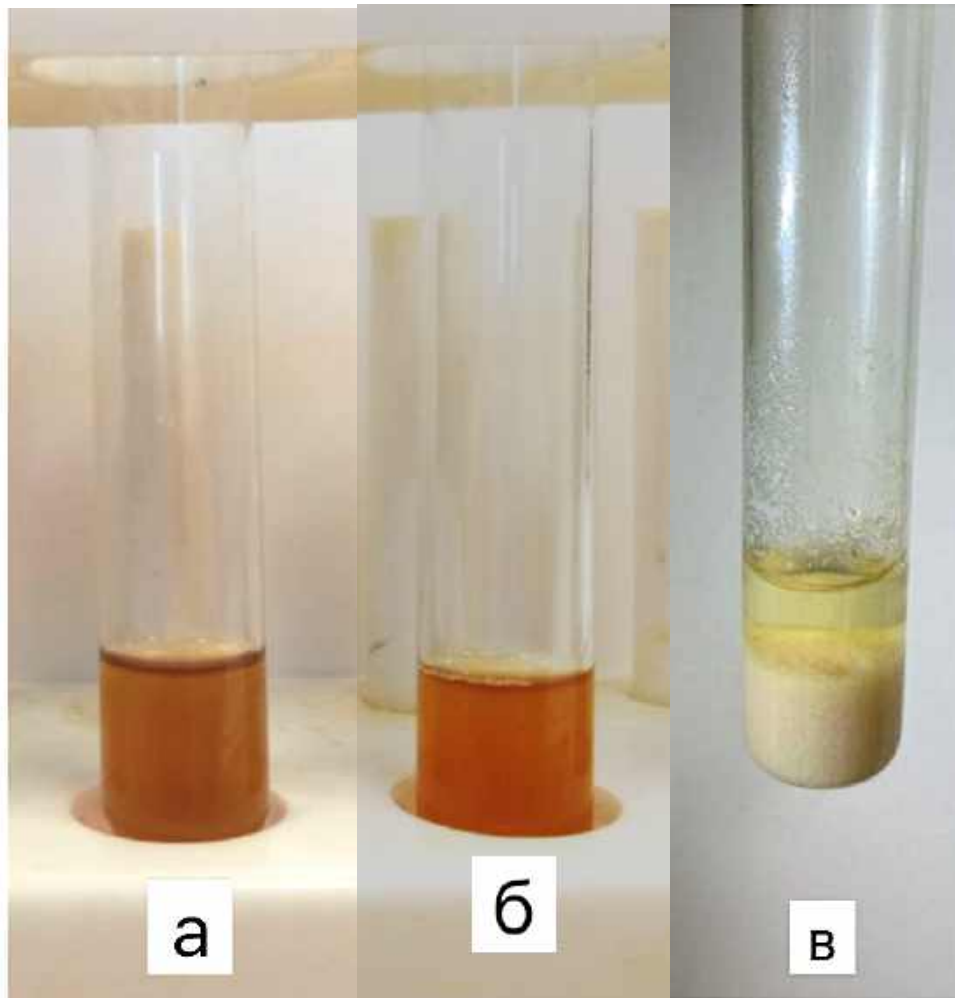


Рис. 3.8. Результати реакцій ідентифікації поліфенольних сполук у спиртових витягах з плодового тіла гриба *M.conica*: а – з 1% розчином FeCl_3 ; б – з 10% розчином NaOH ; в – з 10% розчином $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Завдяки наявності поліфенолів, в тому числі головним чином фенольних кислот, представлених бензойною кислотою і похідними коричної кислоти, лікарським грибам можна приписати антиоксидантну дію. Відомо, що галова, кофеїнова та р-кумарова кислоти є переважаючими фенольними сполуками в грибах [16]. Фенольні сполуки, які присутні в грибах, проявляють сильні антиоксидантні властивості. Вони пригнічують вільні радикали та обмежують розкладання перекису, поглинають активні форми кисню та блокують дію металів під час каталізації реакцій окиснення [18]. Таким чином, вони

запобігають мутаціям клітинної ДНК і зменшують процеси канцерогенезу [16, 18].

3.3.3. Ідентифікація сапонінів

Ідентифікацію сапонінів проводили у водних і водно-спиртових витягах плодових тіл гриба. Для отримання водно спиртового розчину брали 5,0 г порошку плодових тіл та поміщали в конічну колбу об'ємом 100 мл; додавали 50 мл етанолу (50%) та нагрівали із під'єднаним зворотнім холодильником на киплячій бані протягом 15 хв. Витяг охолоджували та фільтрували, після чого для виділення спирту 20 мл отриманого фільтрату упарювали на водяній бані до об'єму 10 мл. Отриманий водний екстракт використовували для проведення реакцій ідентифікації сапонінів.

1. *Реакція піноутворення*: при інтенсивному струшуванні пробірки з водним витягом з плодових тіл протягом 1 хв спостерігали утворення стійкої піни, що свідчить про наявність сапонінів (рис. 3.9а).

2. *Реакція з розчином ацетату свинцю*: до 1 мл водного екстракту в пробірку додавали 3-4 краплі розчину плюмбуму ацетату (10%). Результат описаний вище (рис. 3.8.в).

3. *Реакція Саньє*: до 2 мл спиртово-водного витягу додавали 1 мл спиртового розчину ваніліну (0,5%), 3-4 краплі кислоти сульфатної концентрованої та нагрівали на водяній бані. Результат реакції був негативний (рис. 3.9б)

4. *Реакція Лафона*: до 2 мл спиртово-водного витягу в пробірці додавали 1 краплю розчину купруму сульфату (10%), 1 мл кислоти сірчаної концентрованої і нагрівали. В результаті реакції спостерігали зміну кольору на синьо-зелений, що свідчить про наявність сапонінів (рис. 3.9в).

5. *Реакція з розчином холестерину*: до 1 мл спиртово-водного екстракту додавали 1 мл 1% спиртового розчину холестерину. Результат реакції був негативний.

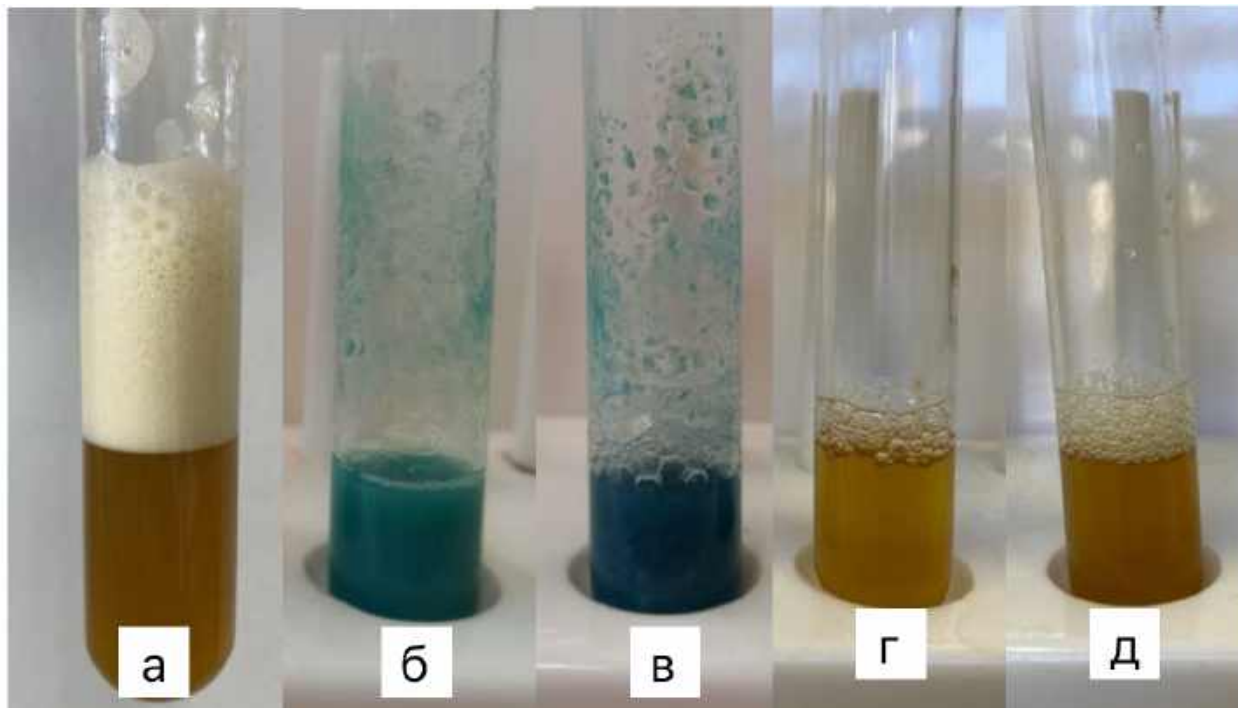


Рис. 3.9. Результати реакцій ідентифікації сапонінів у водних та спиртово-водних витягах з плодових тіл гриба *Verpa bohemica*: а – реакція піноутворення, б – реакція Саньє; в – реакція Лафона, г, д – реакція встановлення природи спонінів: г – утворення піни у лужному середовищі, д – утворення піни у кислому середовищі

б. Визначення хімічної природи сапонінів.

В одну з двох однакових пробірок наливали 5 мл 0,1 М розчину HCl, в іншу – 5 мл 0,1 М розчину NaOH. В кожну вливали по 0,5 мл водного витягу. Обидві пробірки струшували протягом 1 хвилини з однаковою інтенсивністю. В результаті спостерігали утворення однакової стійкої піни як в лужному (рис.3.9г), так і в кислому середовищі (рис.3.9д), що свідчить про наявність сапонінів тритерпенової природи. Також про відсутність стероїдних сапонінів можуть вказувати негативні результати реакцій з розчином холестерину та Саньє.

Ми не знайшли в літературі даних щодо вмісту сапонінів у грибах *Verpa bohemica*. В той же час отримані нами дані вказують на наявність сапонінів у досліджуваній сировині, а також встановлена природа цих сапонінів.

3.4. Кількісне визначення суми полісахаридів гриба *Verpa bohemica*

Вміст суми полісахаридів визначали у плодових тілах та в отриманій шляхом культивування на рідкому живильному середовищі міцеліальній біомасі.

Результати наведені у табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

**Кількісний вміст суми полісахаридів гриба *Verpa bohemica*,
% сухої маси**

Об'єкт дослідження	% сухої маси
Плодові тіла	9,31±0,86
Міцеліальна біомаса	6,21±0,74

Результати гравіметричного дослідження показали, що плодові тіла, зібрані в природі, містять в своєму складі в 1,5 рази більше полісахаридів, ніж біомаса.

3.5. Кількісне визначення суми поліфенольних сполук у гриба *Verpa bohemica*

Для проведення дослідження вмісту суми поліфенольних сполук використовували метанольні екстракти, які отримували екстрагуванням 1 г біомаси та плодових тіл гриба в 6 мл абсолютного метанолу за температури $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ протягом 7 діб. До отриманих екстрактів додавали реактив Фоліна-Чокальтеу, який створює комплекси між фенольними сполуками та реагентом (спостерігали забарвлення розчину в синьо-чорний колір) (рис.3.10).

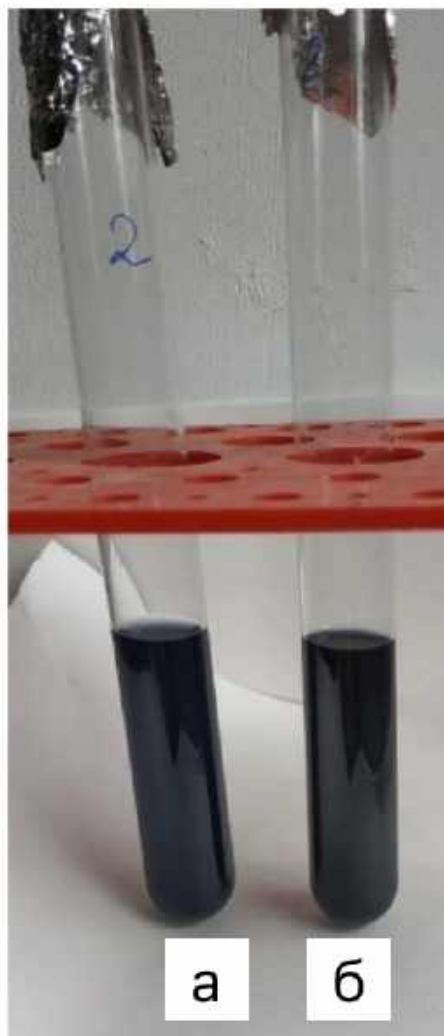


Рис. 3.10. Результат реакції з реактивом Фолліна-Чокальтеу: а – екстракт плодових тіл *Verpa bohemica*, б – екстракт міцеліальної біомаси

Вміст суми поліфенольних сполук в плодових тілах і міцеліальній біомасі *Verpa bohemica* визначали спектрофотометрично за методикою Фолліна-Чокальтеу, використовуючи як стандартний зразок розчин галової кислоти



Рис. 3.11. Визначення суми поліфенольних сполук на спектрофотометрі 6850 UV/VIS JENWAY

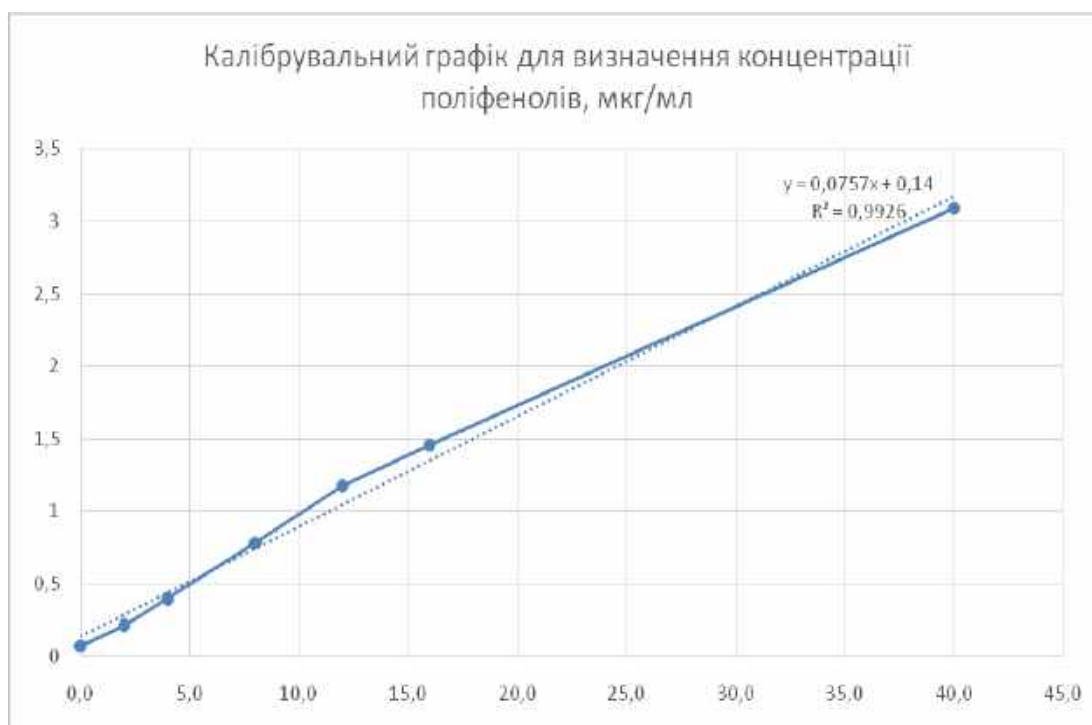


Рис.3.12.Калібрувальний графік для визначення концентрації суми поліфенольних сполук, мкг/мл. Ось абсцис – концентрація галової кислоти в перерахунку на досліджувану пробу, мкг/мл. Ось ординат – оптична густина.

Таблиця 3.2.

**Кількісний вміст суми поліфенольних сполук гриба *Verpa bohemica*,
мг/г**

Об'єкт дослідження	Кількісний вміст поліфенолів, мг/г				Середнє значення
	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4	
Плодові тіла	36,546±0,574	39,158±0,423	35,897±0,986	39,712±1,225	37,872
Міцеліальна біомаса	9,618±1,348	10,797±1,754	8,774±0,566	8,995±1,212	9,754

Сума поліфенольних сполук також була більшою в плодових тілах у 3,9 рази, порівняно з біомасою.

Отримані дані вказують на те, що плодові тіла містять в своєму складі більше як полісахаридів, так і поліфенольних сполук, порівняно з міцеліальною біомасою. З іншої сторони, використання міцеліальної біомаси, отриманої методом культивування на рідкому живильному середовищі дозволяє отримувати стандартизовану за якісним і кількісним складом сировину, що не залежить від навколишніх умов, на відміну від плодових тіл, зібраних в природі.

На сьогоднішній день препарати на грибів в більшості країн світу відносяться до нутрицевтиків. За даними Європейського агентства з безпеки харчових продуктів, їх можна використовувати як харчові добавки, оскільки вони зміцнюють здоров'я та запобігають хворобам [7, 14]. Виробництво харчових добавок вимагає великих знань про функціональні властивості окремих видів грибів. Через можливу присутність шкідливих для здоров'я речовин необхідно контролювати походження, умови вирощування та переробку сировини, щоб забезпечити безпеку нутрицевтичних продуктів, з

одного боку, та відповідний рівень біологічно активних речовин – з іншого [29]. Клінічні дослідження показали, що рекомендована доза нутрицевтичних препаратів змінюється залежно від діагнозу та пацієнта [7], що також є важливим аспектом при розробці лікарських засобів та нутрицевтиків на основі грибів.

На сьогоднішній день вже проведено багато досліджень лікарських грибів, однак, враховуючи різноманіття видів і кількість біологічно активних речовин, що містяться в них, ця область все ще виглядає неповністю вивченою. Доцільним є проведення досліджень не тільки з метою виділення та ідентифікації біологічно активних речовин, присутніх у грибах, але й для проведення доклінічних та клінічних досліджень для підтвердження терапевтичного ефекту цих речовин.

Такі дослідження можуть полегшити визначення дози та тривалості застосування грибних нутрицевтиків. Також необхідні токсикологічні дослідження, що підтверджують безпеку лікарських грибів. У контексті використання лікарських грибів для розробки функціональних продуктів харчування важливо вивчати взаємодію між біологічно активними сполуками, присутніми в грибах, та харчовими інгредієнтами.

Лікарські гриби відомі тим, що здатні підвищувати імунітет, регулювати обмін речовин і запобігати багатьом захворюванням. Велика кількість полісахаридів, поліфенолів, амінокислот і вітамінів в лікарських грибах робить їх цінним джерелом біологічно активних сполук. В той же час необхідні подальші наукові дослідження, щоб підтвердити ефективність та розробити оптимальні методи вирощування плодових тіл та/або міцеліальної біомаси для отримання стандартизованої сировини зі сталим складом БАР та для забезпечення відтворюваності партій.

Результати наших досліджень показали, що гриб *Verpa bohemica*, зібраний на території України містить в своєму складі різні групи БАР, зокрема полісахариди, поліфеноли та сапоніни, а отже потребує подальших

більш глибоких досліджень як перспективна лікарська сировина, що може бути використане в майбутньому при розробці лікувально-профілактичних засобів на його основі.

Висновки

1. Визначено основні видоспецифічні макроскопічні ознаки плодових тіл гриба *Verpa bohemica*, зібраних на території України.

2. Методами фітохімічного аналізу в плодових тілах гриба були ідентифіковані різні групи біологічно активних речовин, зокрема полісахариди, поліфенольні сполуки, сапоніни.

3. Встановлено тритерпенову природу сапонінів, що містяться в плодових тілах гриба *Verpa bohemica*.

4. Результати кількісного визначення показали, що плодові тіла, зібрані в природі, містять в своєму складі в 1,5 рази більше полісахаридів, ніж міцеліальна біомаса.

5. Плодові тіла містять в своєму складі у 3,9 рази більше поліфенольних сполук, ніж біомаса, отримана біотехнологічним методом.

6. Гриб *Verpa bohemica* є перспективною сировиною для отримання різних біологічно активних речовин та потребує подальших досліджень для подальшої стандартизації та можливого використання при розробці лікувально-профілактичних засобів на його основі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. — Т. 3. — 732 с.
2. Зерова М. Я. Визначник грибів України. С. Ф. Морочковський, М. Я. Зерова, З. Г., Лавітська, М. Ф. Смітська. Аскоміцети. Т. 2. К.: Наук. Думка. 1969. 347 с.
3. Практикум з ідентифікації лікарської рослинної сировини : навч. посіб. / [В. М. Ковальов, С. М. Марчишин, О. П. Хворост та ін.] ; за ред. В. М. Ковальова, С. М. Марчишин, О. П. Хворост, Т. І. Ісакової. — Тернопіль : ТДМУ, 2014. — 264 с.
4. Робочий зошит для самостійної роботи студентів з фармакогнозії (аудиторної та позааудиторної). Лабораторний практикум з фармакогнозії. Навчальний посібник. Частина I. / В. М. Мінарченко, У. В. Карпюк, І. С. Чолак, О. І. Ємельянова, Н. П. Ковальська, Л. М. Махія, В. Т. Підченко, О. М. Струменська, — К., 2023. — 170 с .
5. Робочий зошит для самостійної роботи студентів з фармацевтичної ботаніки (аудиторної та позааудиторної). Навчальний посібник. Частина II. Основи систематики, фітоєкології та геоботаніки / В. М. Мінарченко, Л. М. Махія, Т. С. Двірна, І. А. Тимченко, О. М. Струменська, Н. П. Ковальська, У. В. Карпюк, О. І. Ємельянова, І. С. Чолак, В. Т. Підченко — К., 2023. — 88 с .
6. Anand, N.; Chowdhry, P.N. Taxonomic and molecular identification of *Verpa bohemica*: A newly explored fungi from Rajouri (J&K), India. Recent Res. Sci. Technol. 2013, 5, 9–12.

7. Andlauer W and Furst P (2002) Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. *Food Res. Int* 35: 171–176
8. Aktas, S.; Karaselek, M.A. The taxonomical characterization of some *helvella* and its relatives by morphological and molecular data from turkey. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2019, 17, 7395–7405
9. Barros, L.; Baptista, P.; Estevinho, L.M.; Ferreira, I.C.F.R. Effect of Fruiting Body Maturity Stage on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Lactarius* sp. Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8766–8771.
10. Bazzano L A, He J and Ogden L G (2001) Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch. Int. Med* 161: 2573–2578.
11. Beulah, H.; Margret, A.A.; Nelson, J. Marvelous Medicinal Mushrooms. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2013, 3, 611–615.
12. Boa, E. 2004. Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. *Non-Wood Forest Products* 17. Rome: FAO 147 pp. Also available at www.fao.org/docrep/007/y5489e/y5489e00.html (accessed on 27 November 2014).
13. Bunyard, B.A.; Nicholson, M.S.; Royse, D.J. Phylogenetic resolution of *Morchella*, *Verpa*, and *Disciotis* [Pezizales: Morchellaceae] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Exp. Mycol.* 1995, 19, 223–233.
14. Cateni, F.; Gargano, M.L.; Procida, G.; Venturella, G.; Cirlincione, F.; Ferraro, V. Mycochemicals in wild and cultivated mushrooms: Nutrition and health. *Phytochem. Rev.* 2022, 21, 339–383
15. Davoli, P.; Sitta, N. Early Morels and Little Friars, or a Short Essay on the edibility of *Verpa bohemica*. *Fungi* 2015, 8, 4–9.
16. Du, X.H.; Zhao, Q.; Yang, Z.L. A review on research advances, issues, and perspectives of morels. *Mycology* 2015, 6, 78–85.
17. Elkhateeb, W.A.; Daba, G.M. Medicinal mushroom: What should we know? *Int. J. Pharm. Chem. Anal.* 2022, 9, 1–9.

18. Fang Y Z, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutr* 18: 872–879
19. FDA. 1984. Macroanalytical Procedures Manual. FDA Technical Bulletin Number 5 (electronic version 1998), see under V-11 Vegetables and vegetable products, sub-heading F. Method for the Preservation and Identification of Mushrooms (V-102). Available at <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearchLaboratoryMethods/ucm105731.htm> (accessed on 27 November 2014)
20. FDA. 2011. Import Alert 25-02 of 18 March 2011 “Detention without physical examination of morel mushrooms due to adulteration and substitution” Available at http://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_80.html (accessed on 27 November 2014)
21. Gecan, J.S., and S.M. Cichowicz. 1993. Toxic mushroom contamination of wild mushrooms in commercial distribution. *Journal of Food Protection* 56(8): 730-734.
22. Graeme, K.A. 2014. Mycetism: a review of the recent literature. *Journal of Medical Toxicology* 10: 173-189.
23. Hall, I.R., S.L. Stephenson, P.K. Buchanan, Y. Wang, and A.L.J. Cole. 2003. *Edible and Poisonous Mushrooms of the World*. Portland, Oregon: Timber Press 372 pp.
24. Halliwell B H and Gutteridge J M C (2003) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
25. <https://www.gbif.org/uk/species/5259057> (дата звернення 21.10.2023)
26. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (дата звернення 25.10.2023)
27. Huang, G.; Cai, W.; Xu, B. Vitamin D₂, Ergosterol, and Vitamin B₂ Content in Commercially Dried Mushrooms Marketed in China and Increased Vitamin D₂ Content Following UV-C Irradiation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2017, 87, 237–246.

28. Hyde, K.D. The numbers of fungi. *Fungal Divers.* 2022, 114, 1.
29. Kruger C L and Mann S W (2003) Safety evaluation of functional ingredients. *Food Chem Toxicol* 41: 793–805.
30. Lincoff, G., and D.H. Mitchel. 1977. *Toxic and Hallucinogenic Mushroom Poisoning: A Handbook for Physicians and Mushroom Hunters.* New York: Van Nostrand Reinhold 267 pp
31. Liu R H (2003) Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Amer J Clin Nutr* 78: 517S–520S
32. Liu, Q.; Ma, H.; Zhang, Y.; Dong, C. Artificial cultivation of true morels: Current state, issues and perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2018, 38, 259–271.
33. Łysakowska, P., Sobota, A., & Wirkijowska, A. (2023). Medicinal Mushrooms: Their Bioactive Components, Nutritional Value and Application in Functional Food Production—A Review. *Molecules*, 28(14), 5393.
34. Michelot, D. 1992. Poisoning by *Coprinus atramentarius*. *Natural Toxins* 1: 73-80.
35. Peintner, U.; Schwarz, S.; Mesic, A.; Moreau, P.A.; Moreno, G.; Saviuc, P. Mycophilic or mycophobic? Legislation and guidelines on wild mushroom commerce reveal different consumption behaviour in european countries. *PLoS ONE* 2013, 8, e63926.
36. Pfab, R., B. Haberl, J. Kleber, and T. Zilker. 2008. Cerebellar effects after consumption of edible morels (*Morchella conica*, *Morchella esculenta*). *Clinical Toxicology* 46(3): 259-260.
37. Phillips R. 2011. "Verpa bohemica". Rogers Plants Ltd. Retrieved pp. 03-05.
38. Roberts, P., and S. Evans. 2011. *The Book of Fungi: A Life-Size Guide to 600 Species from Around the World.* Chicago: University of Chicago Press 656 pp

39. Saviuc, P., P. Harry, C. Pulce, R. Garnier, and A. Cochet. 2010. Can morels (*Morchella* sp.) induce a toxic neurological syndrome? *Clinical Toxicology*
40. Shameem, N., Kamili, A. N., Ahmad, M., Masoodi, F. A., & Parray, J. A. (2017). Antimicrobial activity of crude fractions and morel compounds from wild edible mushrooms of North western Himalaya. *Microbial Pathogens*, 105, 356–360
41. Sheikh, P. A., Dar, G. H., Dar, W. A., Shah, S., Bhat, K. A., & Kousar, S. (2015). Chemical composition and anti-oxidant activities of some edible mushrooms of Western Himalayas of India. *Vegetos*, 28(2), 124.
42. Sitta, N., and P. Davoli. 2012. Edible ectomycorrhizal mushrooms: international markets and regulations. In: A. Zambonelli and G.M. Bonito, Eds., *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms – Current Knowledge and Future Prospects* (Soil Biology, vol. 34), pp. 355-380. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag.
43. Song, T.; Zhang, Z.; Liu, S.; Chen, J.; Cai, W. Effect of Cultured Substrates on the Chemical Composition and Biological Activities of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* 2020, 22, 1183–1190

SUMMARY

Lymaniuk Diana

PHARMACOGNOSTIC RESEARCH OF FUNGUS *VERPA BOHEMICA*
(KROMBH.) J. SCHRÖT.

Department of Pharmacognosy and Botany

Scientific supervisor: PhD, as. professor Pidchenko Vitalii

Keywords:

Introduction. Since mushrooms contain various groups of biologically active substances, in particular polysaccharides, proteins, peptides, terpenoids, polyphenols, vitamins and mineral elements, they exhibit various pharmacological activities, in particular, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, hypocholesterolemic, hypoglycemic, immunomodulating, etc. *Verpa bohemica* (Krombh.) J. Schröt. is a little-studied, but widespread in Ukraine ascomycete. Modern studies have shown that *Verpa bohemica* can exhibit antibacterial, antifungal and antioxidant activity. At the same time, there is almost no data on the chemical content of the biological active substances of *Verpa bohemica* collected in Ukraine. There are also no data on the content of the main biologically active substances in the *Verpa bohemica* fruiting bodies in comparison with the mycelial biomass, which can be obtained using biotechnological methods. One of them is the cultivation of mushroom biomass on liquid media. This method is widely used today by various researchers, as it allows to standardize the obtained raw materials for the needs of the pharmaceutical industry.

Materials and methods. The research objects are fruiting bodies and mycelial biomass of *Verpa bohemica*. Research subject: phytochemical study of the fruiting bodies and mycelial biomass of *Verpa bohemica*. Methods: literature monitoring, macroscopic, phytochemical (gravimetry and spectrophotometry).

Results. The main species-specific macroscopic features of the fruiting bodies of *Verpa bohemica*, collected in Ukraine, were determined. Various groups of biologically active substances, in particular polysaccharides, polyphenolic

compounds, saponins, were identified in the fruiting bodies of the mushroom by phytochemical analysis. The triterpene nature of the saponins contained in the fruit bodies of *Verpa bohemica* was established. Quantitative analysis showed that the fruiting bodies collected in nature contain 1.5 times more polysaccharides than mycelial biomass. Fruiting bodies contain 3.9 times more polyphenolic compounds than biomass obtained by the biotechnological method.

Conclusions. The fungus *Verpa bohemica* is a promising raw material for obtaining various biologically active substances and requires further research for standardization and possible use in the development of medicines based on it.

ДОДАТКИ

Додаток 1.

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

СЕРТИФІКАТ № 2023-1101- 5508998-100162

ЦИМ ПОСВІДЧУЄТЬСЯ, ЩО

ЛИМАНЮК Д.С.

БРАВ(ЛА) УЧАСТЬ У НАУКОВО-ПРАКТИЧНІЙ КОНФЕРЕНЦІЇ
З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ, ПРИСВЯЧЕНІЙ 25-РІЧЧЮ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ФАКУЛЬТЕТУ

**ФАРМАЦЕВТИЧНА ОСВІТА, НАУКА ТА ПРАКТИКА:
СТАН, ПРОБЛЕМИ, ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ**

ГОЛОВА ОРГАНІЗАЦІЙНОГО КОМІТЕТУ,
РЕКТОР НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО
УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
ОСВІТИ НМУ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
ЧЛЕН-КОРЕСПОНДЕНТ НАМН УКРАЇНИ,
Д.МЕД.Н., ПРОФЕСОР



ЮРІЙ КУЧИН

ЦІЛЬОВА АУДИТОРІЯ: АНАЛІТИЧНО-КОНТРОЛЬНА ФАРМАЦІЯ, ЗАГАЛЬНА ФАРМАЦІЯ, КЛІНІЧНА ФАРМАЦІЯ, ОРГАНІЗАЦІЯ І УПРАВЛІННЯ ФАРМАЦІЄЮ, ОРГАНІЗАЦІЯ І УПРАВЛІННЯ ОХОРОНОЮ ЗДОРОВ'Я, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОСМЕТОЛОГІЯ, ФАРМАЦЕВТИЧНА ТОКСИКОЛОГІЯ

19-20 грудня 2023 року