



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00479

(22) Data de depozit: 17.05.2011

(41) Data publicării cererii:
29.11.2012 BOPI nr. 11/2012

(71) Solicitant:
• HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A.,
INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• IONESCU DANIELA,
STR. ÎMPĂRATUL TRAIAN NR.3, BLB12,
SC.3, ET.2, AP.82, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

• MIHELE ELISABETA DENISA,
ALEEA COMPOZITORILOR NR.16, BL.Z45,
AP.41, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MANEA ȘTEFAN, CALEA MOȘILOR
NR.209, ET.2, AP.6, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PRODUS NATURAL FITOTERAPEUTIC DESTINAT
OPTIMIZĂRII FUNCȚIILOR FICATULUI ȘI ALE CĂILOR
BILIARE ȘI PROCEDU DE OBȚINERE A ACESTUIA**

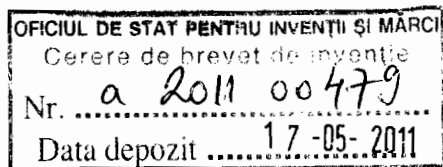
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs fitoterapeutic destinat optimizării funcțiilor ficatului și a căilor biliare, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Produsul conform invenției este constituit din 4,5...5,0 părți extract de cătină roșie, 3...3,5 părți extract de fructe de armurariu, 2,5...3,0 părți extract de frunze de rozmarin și 85...90 părți pulbere de fructe de armurariu, părțile fiind exprimate în greutate la 100 g produs, corespunzând unui conținut de silimarină de 10 mg/unitate de condiționare, împreună cu excipienți acceptabili pentru industria

farmaceutică. Procedeu conform invenției constă din amestecarea extractelor, după care amestecul rezultat se pulverizează peste pulberea de fructe de armurariu care a fost omogenizată cu excipienți de condiționare, granulele obținute se usucă la o temperatură de 35...40°C, se uniformizează și se condiționează în mod uzual.

Revendicări: 3





PRODUS NATURAL FITOTERAPEUTIC DESTINAT OPTIMIZĂRII FUNCTIILOR FICATULUI ȘI ALE CĂILOR BILIARE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE AL ACESTUIA

Prezenta invenție se referă la un produs natural fitoterapeutic, sub formă de capsule sau comprimate, destinat optimizării funcțiilor ficatului și ale căilor biliare, precum și la procedeul de obținere al acestuia.

Produsul natural care face obiectul prezentei invenții este o asociere de extracte și pulberi din plante, în care se folosesc extractele de fructe de armurariu (*Cardui fructus*), de cătină roșie (*Tamarixi herba*) și de frunze de rozmarin (*Rosmarini folium*) alături de pulbere de fructe de armurariu.

Folosit ca atare, produsul realizat conform invenției protejează și activează regenerarea celulei hepatice prin stimularea sintezei de proteine. Produsul este un mijloc eficace în detoxifierea organismului prin stoparea depleției glutatationului (GSH) indusă de alcool și alte substanțe hepatotoxice (produse de sinteză cu efecte secundare hepatotoxice, metale grele, pesticide, substanțe anestezice, toxine, alergeni din mediul ambiant).

Sunt cunoscute numeroase produse realizate până în prezent pentru sănătatea ficatului și a căilor biliare, atât produse farmaceutice obținute prin sinteză chimică, cât și produse naturale.

Dezavantajul acestor produse este acela că diminuează acțiunea protectoare fiziologică a mucusului gastric și determină iritații gastrice, ceea ce duce la limitarea duratei de administrare a acestora.

La realizarea produsului s-a avut în vedere o abordare complexă a problemei, cunoscut fiind că în mod normal, există o unitate funcțională hepatobiliară și corelații între aparatul biliar și celelalte segmente ale tubului digestiv, întregul ansamblu funcționând sub influența coordonatoare a sistemului nervos.

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unui produs destinat optimizării funcțiilor hepatobiliare, care, prin complexul fitochimic special realizat pe

baza asocierii pulberii și a extractelor de plante menționate, acționează simultan asupra mecanismelor complexe de la nivelul ficatului și a aparatului biliar.

Sunt furnizate concomitent, în forme biocompatibile, o mare varietate de nutrienți esențiali și substanțe fitoterapeutice capabile să optimizeze funcțiile multiple ale ficatului: metabolice (homeostazia proteică, glicemică, lipidică și a apei, sinteza de enzime, degradarea hormonilor), antitoxică, digestivă (biligeneza) și intervenția sa în homeostazia volemică, precum și să conducă la creșterea rezistenței hepatocitului față de factorii nocivi.

Preparatul fitoterapeutic care face obiectul prezentei invenții este o asociere între extract de cătină roșie (*Tamarixi herba*) în raport de combinare de 4,500 ... 5,000 părți, extract de fructe de armurariu (*Cardui fructus*) în raport de combinare de 3,000 ... 3,500 părți, extract de frunze de rozmarin (*Rosmarini folium*) în raport de combinare de 2,500 ... 3,000 părți și pulbere de fructe de armurariu în raport de combinare de 85,000 ... 90,000 părți în greutate la 100 g produs, împreună cu excipienți uzual utilizați în industria farmaceutică.

Pulberca vegetală și extractele utilizate pentru realizarea produsului conform invenției sunt bine cunoscute și studiate de literatura de specialitate.

Astfel, fructele provenite de la armurariu, *Silybum marianum*, familia *Asteraceae* conțin silimarină (formată din flavonoidele silibină, silidianină, silicristină), betaină hidroclorică, aminoacizi (l – cisteina, glicina, acid l – glutamic, acid d – l – 2 – aminobutiric, d – l – leucina, tiramina), lipide (3 – 4%), polihidroxifenil cromone, acid fumaric.

Principiile active intervin eupeptic, tonic – amar, hepatoprotector, antihepatotoxic și curativ asupra ficatului.

Substanțele active acționează la nivelul membranei celulei hepatice, împiedicând distrugerea celulei și favorizând reconstrucția celulei hepatice aflată în degradare.

Acțiunea farmacodinamică este imprimată în special, de cele trei flavone lignanice menționate.

Silibina este foarte activă, atât preventiv cât și curativ.

Testele pe culturi de hepatocite au demonstrat că silibina stimulează sinteza proteinelor și prin urmare, formarea de celule hepatice noi.

Ațiunea silibinei și a substanțelor înrudite cu ea este foarte importantă, deoarece pe lângă faptul că asigură protecția membranei celulei hepatice, stimulează și refacerea celulelor lezate.

Din punct de vedere farmacocinetic, absorbția digestivă este de 35 – 45%, excreția este predominant biliară (cam 80%) și 10% prin circuitul enterohepatic, îndeosebi pentru silibină. Circa 90% din silibina eliminată biliar este sub formă de metaboliți.

După absorbția complexului silimarinic în intestin, acesta este eliminat de bilă sub forma chimică de glucoronat și sulfat. Prin aceasta, substanțele active reintră în circulația enterohepatică. Aceasta este explicația specificității substanțelor active din plantă în afecțiunile hepatice.

Tot flavonoidele din complexul silimarinic au eficiență combinată de antioxidanți, ele putând împiedica deteriorările date de radicalii liberi produși de substanțele toxice care ajung în ficat și acționează sinergic.

Silimarina este aceea care are capacitatea unică de a încetini viteza de absorbție a substanțelor toxice de către ficat.

Crescând capacitatea de detoxifiere a ficatului, armurariul contribuie la îndepărtarea toxinelor din sânge.

Cătina roșie, *Tamarix ramosissima*, familia *Tamaricaceae* conține agenți tanici repartizați după cum urmează: 4,5% în rădăcini, 39% în tulpini, 8 - 9% în frunze, 4,1 – 9,09% în scoarță, 12,7% în flori și 14,4% în fructe.

Frunzele mai conțin de asemenea acid p-cumaric și cumarine.

Scoarța conține 0,16% cumarine, 1,64 % flavonoide și antociani. Florile conțin 0,1% cumarine, 2,4% flavonoide reprezentate prin quercitină, kaempferol, isoquercitină, tamarixetină și tamarixină.

Fructele conțin 0,15% cumarine, 1,64% flavonoide, 2,3% antociani.

Crenguțele verzi conțin 0,19% cumarine și 1,66% flavonoide.

De asemenea, în plantă au fost identificați cinci carbohidrați (glucoză, arabinoză, xiloză, galactoză și zaharoză), două flavonoide (kaempferol și quercitină), șase acizi fenolici (p-cumaric, galic, elagic, ferulic, sinapic, 3-hidroxi-5-metoxibenzoic), două cumarine (cumarină și umbeliferonă), opt aminoacizi (triptofan, cisteină, treonină, acid glutamic, metionină, asparagină, glutamină, arginină) și o glicozidă a emodinei.

Datorită acestei compoziții complexe, planta este folosită în tratamentul icterului, a bolilor de bilă și de splină.

Rozmarinul, *Rosmarinus officinalis*, familia *Lamiaceae*, este un arbust a cărui „faimă” fitoterapeutică a fost umbrită de larga utilizare ca aromatizant și condiment.

Frunzele de rozmarin, *Rosmarini folium*, conțin ulei volatil (0,5 - 9%) constituit în principal din hidrocarburi terpenice, alcooli, cetone. Se mai întâlnesc flavonoide libere și flavonoide glexoxidate. Mai conțin o serie de triterpene, α – și β – amirină, epi – α – amirină, betulină, germanicol, acizi triterpenici, tanin, saponină, β – sitosterol, colină, acid glicolic, acid glicerol, urme de acid nicotinic, vitamina C.

Principiile active din frunze au proprietăți coleretice, colagoge, antiseptice, diuretice și antigonadotrope.

Stimulează secreția bilei și eliminarea ei în intestin, acționează asupra epiteliului renal măbind cantitatea de urină eliminată, distrug microorganismelor.

Extractele de fructe de armurariu, de frunze de rozmarin și de cătină roșie, utilizate la realizarea produsului conform invenției, au fost preparate din plante uscate, printr-o metodă „blândă” de extracție care nu afectează conținutul în principii active ale materiilor prime vegetale, astfel încât au un conținut total de aproximativ 20 - 22% substanță uscată.

Deși compoziția plantelor care intră în formula produsului este cunoscută, la fel și proprietățile lor, utilizarea combinată într-o formă farmaceutică bine dozată, a extractelor de fructe de armurariu, de frunze de rozmarin, de cătină roșie împreună cu pulbere prelucrată de fructe de armurariu, a dus la un preparat fitoterapeutic eficient pentru scopul propus, fără efecte secundare, ușor de administrat.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta invenție constă în obținerea unui preparat de uz fitoterapeutic pentru optimizarea funcțiilor ficatului și ale căilor biliare, condiționat sub formă de capsule sau comprimate, ușor de administrat și fără efecte secundare.

De altfel produsul realizat conform invenției a fost testat farmacologic în ceea ce privește toxicitatea, teste care sunt prezentate în continuare.

În vederea stabilirii efectului hepatoprotector, s-au aplicat două metode experimentale: intoxicația acută și hepatectomia parțială la șobolan.

Intoxicația acută s-a efectuat utilizând tetraclorură de carbon, alcool alilic și tioacetamidă.

Acțiunea de protejare a ficatului la șobolanii intoxicați a fost stabilită prin urmărirea duratei somnului indus de tiopental, a variației activității transaminazelor serice, a bilirubinei totale serice, prin determinarea proteinemiei și a ureei serice.

Efectul de regenerare hepatică după hepatectomie parțială s-a urmărit prin creșterea ponderală a ficatului la 7, 14 și la 21 zile, precum și a greutății corporale.

1. Activitatea hepatoprotectoare în intoxicația acută

Material și metodă

Pentru fiecare tip de intoxicare s-au folosit câte 6 loturi de câte 10 șobolani albi, masculi, rasa Wistar, având o greutate de 200 ± 10 g.

Animalele aduse din crescătorie au fost ținute 2 zile pentru acomodare în condițiile de laborator, pentru a se putea obișnui cu noul habitat și cu regimul de hrană. Animalele au fost hrănite de 2 ori pe zi și cu apă „ad libitum” din biberoane.

Experimentul respectă Directiva CE 86/609 și O.G.R. nr. 37/2002.

1.1. Acțiunea hepatoprotectoare în intoxicația acută cu tetraclorură de carbon (CCl₄)

Animalele, la 1 oră după administrarea produsului realizat conform invenției, au primit tetraclorură de carbon, oral, în doză de 0,2 ml/kg corp. Operația s-a efectuat timp de 7 zile.

La 1 oră de la ultima administrare s-a determinat durata somnului indus de tiopental administrat i.p., în doză de 50 mg/kg corp.

De asemenea, la fiecare lot de animale, s-a administrat tetraclorură de carbon în amestec cu fiecare extract din componența produsului realizat conform invenției.

Animalele au fost apoi sacrificate, după anestezie cu cloroform, s-a colectat sângele, iar pe serul separat s-au determinat parametrii biochimici.

Rezultate

Tratamentul cu preparatul realizat conform invenției a protejat animalele de agentul hepatotoxic prin scăderea semnificativă a somnului indus de tiopental cu 43,22%, cu 44,34% la administrare de extract de fructe de armurariu, cu 18,57% la administrare de extract de frunze de rozmarin și cu 49,68% la administrare de extract de cătină roșie.

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic prin testele „T – STUDENT” și „ANOVA” și sunt prezentate în Tabelul nr. 1

Tabel 1

Durata somnului indus de tiopental la șobolani intoxicați cu tetraclorură de carbon

Nr. crt.	Produs testat	Doza și cale de administrare	Durata somnului indus de tiopental, minute $X \pm DS$	Efect % față de martorii intoxicați cu CCl_4	T-STUDENT p/m
0	1	2	3	4	5
1.	Martori	-	17.40 ± 1.5	-	-
2.	Martori intoxicați cu CCl_4	0.2 ml/kg corp. oral	32.20 ± 2.8	+ 85.09	-
3.	CCl_4 + preparat hepatoprotector	10 ml/kg corp. oral	18.28 ± 2.1	- 43.22	0,04323
4.	CCl_4 + extract de fructe de armurariu	10 ml/kg corp. oral	17.92 ± 1,9	- 44.34	0,02951
5.	CCl_4 + extract de frunze de rozmarin	10 ml/kg corp. oral	26.22 ± 2.5	- 18.57	0,04982
6.	CCl_4 + extract de cătină roșie	10 ml/kg corp. oral	16.20 ± 1,8	-49.68	0,04883
ANOVA			F = 0,9838 P = 0,4182		

$X \pm DS$ = media ± deviația standard

Rezultate

În urma tratamentului cu produsul realizat conform invenției la șobolanii intoxicați cu tioacetamidă, durata somnului indus de tiopental a scăzut cu 36,2% pentru preparatul realizat conform invenției, cu 43,47% pentru extractul de fructe de armurariu, cu 24,79% pentru extractul de frunze de rozmarin și cu 39,1% pentru extractul de cătină roșie (Tabel nr. 3).

Tabel 3

Durata somnului indus de tiopental la șobolani intoxicați tioacetamidă

Nr. crt.	Produs testat	Doza și cale de administrare	Durata somnului indus de tiopental, minute $X \pm DS$	Efect % față de martorii intoxicați cu CCl_4	T-STUDENT p/m
0	1	2	3	4	5
1.	Martori	-	17,35 ± 1,9	-	-
2.	Martori intoxicați cu tioacetamidă	10 mg/kg corp. oral	30,05 ± 3,8	+ 73,19	-
3.	Tioacetamidă + preparat hepatoprotector	10 mg/kg corp. oral	19,17 ± 1,8	- 36,2	0,03982
4.	Tioacetamidă + extract de fructe de armurariu	10 ml/kg corp. oral	16,99 ± 1,9	- 43,47	0,04051
5.	Tioacetamidă + extract de frunze de rozmarin	10 ml/kg corp. oral	22,6 ± 3,1	- 24,79	0,03228
6.	Tioacetamidă + extract de cătină roșie	10 ml/kg corp. oral	18,3 ± 2,1	- 39,10	0,04121
ANOVA			F = 8,93251 P = 0,3398		

$X \pm DS$ = media ± deviația standard

Pe serul recoltat de la șobolanii intoxicați cu tetraclorură de carbon, alcool alilic și tioacetamidă s-a efectuat determinarea parametrilor biochimici care pun în evidență activitatea hepatocitului.

1.4. Determinarea activității transaminazelor serice

Determinarea activității transaminazelor serice s-a efectuat prin metoda Cormay (3).

Activitatea transaminazelor serice la șobolanii intoxicați cu tetraclorură de carbon și tratate cu produsul realizat conform invenției și cu extractele luate în lucru a fost diminuată semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$).

Astfel activitatea AST (aspartat - aminotransferaza) a scăzut cu 58,65% în urma tratamentului cu produsul realizat conform invenției, față de animalele intoxicate, cu 59,34% la administrare de extract de fructe de armurariu, cu 37,73% la administrare de extract de frunze de rozmarin și cu 52,98% la administrare de extract de cătină roșie (Tabel nr. 4).

Activitatea ALT (alanil – aminotransferaza) a scăzut, comparativ cu martorii intoxicați cu tetraclorură de carbon, cu 56,01% pentru produsul realizat conform invenției, cu 56,78% la administrare de extract de fructe de armurariu, cu 37,85% la administrare de extract de frunze de rozmarin și cu 52,3% la administrare de extract de cătină roșie (Tabel nr. 4).

Tabel 4

Activitatea transaminazelor serice la șobolani intoxicați cu tetraclorură de carbon

Nr. crt.	Produs testat	AST (u/l)			ALT (u/l)		
		X ± DS	Efect, %	t-student, p/m	X ± DS	Efect,%	t-student, p/m
0	1	2	3	4	5	6	7
1.	Martori	180 ± 15,05	-	-	40,5 ± 5,9	-	-
2.	Martori intoxicați cu CCl ₄	291 ± 30,1	+ 61,66	-	91,4 ± 8,9	+ 125,67	-
3.	CCl ₄ + preparat hepatoprotector	120,3 ± 15,6	- 58,65	0,04932	40,2 ± 5,2	- 56,01	0,03985
4.	CCl ₄ + extract de fructe de armurariu	118,3 ± 14,3	- 59,34	0,039215	39,5 ± 4,5	- 56,78	0,02831
5.	CCl ₄ + extract de frunze de rozmarin	181,2 ± 20,3	- 37,73	0,04681	56,8 ± 7,2	- 37,85	0,04532
6.	CCl ₄ + extract de cătină roșie	136,8 ± 14,8	- 52,98	0,04963	43,59 ± 5,6	- 52,3	0,03915
ANOVA		F = 7,1393 P = 0,4981			F = 6,7253 F = 0,4957		

X ± DS = media ± deviația standard

Activitatea transaminazelor serice la șobolani intoxicați cu alcool alilic și tratate cu preparatul realizat conform invenției a scăzut cu 42,2% pentru AST și cu 50,21% pentru ALT.

Pentru șobolanii tratați cu extract de fructe de armurariu, AST a scăzut cu 40,11% și ALT cu 38,33%, iar la cei tratați cu extract de cătină roșie a scăzut activitatea AST cu 39,65% și a ALT cu 41,07% (Tabel nr. 5). Valorile sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$).

Tabel 5

Activitatea transaminazelor serice la șobolani intoxicați cu alcool alilic

Nr. crt.	Produs testat	AST (u/l)			ALT (u/l)		
		X ± DS	Efect, %	t-student, p/m	X ± DS	Efect,%	t-student, p/m
0	1	2	3	4	5	6	7
1.	Martori	175 ± 14,5	-	-	39,33 ± 4,22	-	-
2.	Martori intoxicați cu alcool alilic	287,2 ± 29,2	+ 164,41	-	78,98 ± 9,3	+ 108,81	-
3.	Alcool alilic + preparat hepatoprotector	166 ± 19,3	- 42,2	0,03852	50,21 ± 7,3	- 36,42	0,03951
4.	Alcool alilic + extract de fructe de armurariu	172 ± 18,6	- 40,11	0,04859	48,7 ± 5,5	- 38,33	0,02685
5.	Alcool alilic + extract de frunze de rozmarin	199,8 ± 22,8	- 30,64	0,02567	59,3 ± 7,1	- 24,91	0,0248872
6.	Alcool alilic + extract de cătină roșie	173,3 ± 19,55	- 39,65	0,03378	46,54 ± 6,7	- 41,07	0,03172
ANOVA		F = 69,554 P = 0,4958			F = 38,369 F= 0,41873		

X ± DS = media ± deviația standard

Activitatea transaminazelor serice la șobolanii intoxicați cu tioacetamidă și tratați cu produsul realizat conform invenției a prezentat o scădere a AST de 53,36% și a ALT de 42,69%.

Tratamentul cu extract de fructe de armurariu a scăzut activitatea AST cu 46,94% și a ALT cu 44,95%.

Extractul de cătină roșie a scăzut activitatea AST cu 39,53% și a ALT cu 41,25%. Scăderile sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) (Tabel nr. 6).

Tabel 6

Activitatea transaminazelor serice la șobolani intoxicați cu tioacetamidă

Nr. crt.	Produs testat	AST (u/l)			ALT (u/l)		
		X ± DS	Efect, %	t-student, p/m	X ± DS	Efect,%	t-student, p/m
0	1	2	3	4	5	6	7
1.	Martori	175.38 ± 19.4	-	-	37.49 ± 4.12	-	-
2.	Martori intoxicați cu tioacetamidă	302.15 ± 29.5	+ 72.28	-	70.31 ± 8.5	+ 87.54	-
3.	Tioacetamidă + preparat hepatoprotector	140.9 ± 15.8	- 53.36	0,03571	40.29 ± 5.3	- 42.69	0,04715
4.	Tioacetamidă + extract de fructe de armurariu	160.3 ± 18.4	- 46.94	0,02713	38.7 ± 5.4	- 44.95	0,03713
5.	Tioacetamidă + extract de frunze de rozmarin	220.2 ± 36.6	- 27.72	0,05138	49.9 ± 6.8	- 29.02	0,04358
6.	Tioacetamidă + extract de cătină roșie	182.7 ± 20.9	- 39.53	0,04415	41.3 ± 5.9	- 41.25	0,02613
ANOVA		F = 78,421 P = 0,5139			F = 50,321 F = 0,6813		

X ± DS = media ± deviația standard

Creșterea marcată a activității transaminazelor serice la șobolani intoxicați constituie o dovadă certă a unei leziuni la nivelul hepatocitului cu permeabilizarea membranei celulare și deversarea enzimelor în sânge.

Șobolani intoxicați și tratați cu preparatul realizat conform invenției și cu soluțiile extractive care intră în constituția acestuia au fost protejați, fapt demonstrat prin valorile mult mai scăzute ale activității transaminazelor serice.

1.5. Determinarea bilirubinei serice

Determinarea bilirubinei totale serice la șobolani intoxicați cu tetraclorură de carbon, alcool alilic și tioacetamidă și tratați cu preparatul realizat conform invenției și cu soluțiile extractive luate în studiu s-a efectuat prin metoda Jendrassik (3).

Evaluarea statistică a rezultatelor s-a făcut prin testele T – STUDENT și ANOVA.

Rezultate

Valoarea bilirubinei serice la șobolanii intoxicați cu tetraclorură de carbon și tratați cu preparatul realizat conform invenției a scăzut cu 47,12%, cu 40,22% la tratament cu extract de fructe de armurariu și cu 43,67% la tratament cu extract de cătină roșie. Scăderi ceva mai mici, dar semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) s-au înregistrat după tratamentul cu extract de frunze de rozmarin (Tabel nr. 7).

Tabel 7

Valoarea bilirubinei serice la șobolani intoxicați cu tetraclorură de carbon

Nr. crt.	Produs testat	Doza și cale de administrare	Bilirubină serică, mg/dl		
			X ± DS	Efect, %	t-student, p/m
0	1	2	3	4	5
1.	Martori	-	0.35 ± 0.08	-	-
2.	Martori intoxicați cu CCl ₄	0.2 ml/kg corp. oral	0.87 ± 0.12	+ 48	-
3.	CCl ₄ + preparat hepatoprotector	10 ml/kg corp. oral	0.46 ± 0.06	- 47.12	0,02354
4.	CCl ₄ + extract de fructe de armurariu	10 ml/kg corp. oral	0.52 ± 0.08	- 40.22	0,03951
5.	CCl ₄ + extract de frunze de rozmarin	10 ml/kg corp. oral	0.63 ± 0.09	- 27.58	0,04498
6.	CCl ₄ + extract de cătină roșie	10 ml/kg corp. oral	0.49 ± 0.07	- 43.67	0,04813
ANOVA		F = 10,7132			
		P = 3,0121 E - 5			

X ± DS = media ± deviația standard

Șobolanii intoxicați cu alcool alilic și tratați cu preparatul realizat conform invenției au prezentat o scădere a bilirubinei serice cu 44,64%, cei tratați cu extract de fructe de armurariu, o scădere de 51,78% și cei tratați cu extract de cătină roșie de 47,32% (Tabel nr. 8).

Valorile sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$).

Tabel 8

Valoarea bilirubinei serice la șobolani intoxicați cu alcool alilic

Nr. crt.	Produs testat	Doza și cale de administrare	Bilirubină serică, mg/dl		
			X ± DS	Efect, %	t-student, p/m
0	1	2	3	4	5
1.	Martori	-	0.43 ± 0.08	-	-
2.	Martori intoxicați alcool alilic	0.2 ml/kg corp. oral	1.12 ± 0.93	+ 61.6	-
3.	Alcool alilic + preparat hepatoprotector	10 ml/kg corp. oral	0.62 ± 0.089	- 44.64	0,03158
4.	Alcool alilic + extract de fructe de armurariu	10 ml/kg corp. oral	0.54 ± 0.09	- 51.78	0,04319
5.	Alcool alilic + extract de frunze de rozmarin	10 ml/kg corp. oral	0.74 ± 0.11	- 33.92	0,02987
6.	Alcool alilic + extract de cătină roșie	10 ml/kg corp. oral	0.59 ± 0.087	- 47.32	0,02113
ANOVA			F = 2,0323		
			P = 6,3482 E - 5		

X ± DS = media ± deviația standard

Șobolani intoxicați cu tioacetamidă și tratați cu preparatul realizat conform invenției au prezentat o scădere a bilirubinei serice de 44,79%, cei tratați cu extract de fructe de armurariu o scădere de 47,91%, iar cei tratați cu extract de cătină roșie de 41,66%. La administrarea de extract de frunze de rozmarin s-a prezentat o scădere a valorii bilirubinei serice ceva mai scăzute, de 29,16%.

Valorile sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) (Tabel nr. 9).

Tabel 9

Valoarea bilirubinei serice la șobolani intoxicați cu tioacetamidă

Nr. crt.	Produs testat	Doza și cale de administrare	Bilirubină serică, mg/dl		
			X ± DS	Efect, %	t-student, p/m
0	1	2	3	4	5
1.	Martori	-	0.49 ± 0.07	-	-
2.	Martori	10 mg/kg corp. oral	0.96 ± 1.05	+ 95.91	-

0	1	2	3	4	5
	intoxicați cu tioacetamidă				
3.	Tioacetamidă + preparat hepatoprotector	10 ml/kg corp oral	0,53 ± 0,09	- 44,97	0,031121
4.	Tioacetamidă + extract de fructe de armurariu	10 ml/kg corp oral	0,5 ± 0,08	- 47,91	0,049133
5.	Tioacetamidă + extract de frunze de rozmarin	10 ml/kg corp oral	0,68 ± 1,04	- 29,16	0,049933
6.	Tioacetamidă + extract de cătină roșie	10 ml/kg corp oral	0,56 ± 0,09	- 41,66	0,02011
ANOVA		F = 8,5876 P = 4,1593 E - 6			

$X \pm DS = \text{media} \pm \text{deviația standard}$

1.6. Determinarea acțiunii proteosintetice

Material și metodă

Ca animale de experiență s-au folosit șobolani albi, masculi, rasa Wistar, în greutate de 210 ± 10 g. Animalele clinic sănătoase au fost distribuite prin metoda randomizării în loturi de câte 10 pentru fiecare tip de determinare.

Un lot a primit preparatul realizat conform invenției în doză de 10 ml/kg corp, oral, dintr-o soluție de concentrație 5%, iar după o oră, șobolanii au fost tratați cu tetraclorură de carbon, în doză orală de 0,2 ml/kg corp. Tratamentul a continuat 14 zile. Martorii intoxicați au primit doar agentul toxic. Un alt lot a constituit lotul de referință care a primit o cantitate echivalentă de soluție 0,9% clorură de sodiu.

Șobolanii au fost apoi sacrificați, iar în serul separat s-au determinat proteinele totale, fracțiunile proteice, ureea serică și activitatea colinesterazei serice.

1.6.1. Determinarea proteinelor totale serice

Proteinele totale serice și fracțiunile proteice au fost determinate prin electroforeză capilară cu aparatul Beckman CZE 2000.

Rezultate

În urma determinărilor efectuate se constată o scădere marcantă între proteinemia lotului de referință (7,6 g/dl) și proteinemia loturilor care au fost intoxicate cu tetraclorură de carbon (5,4 g/dl) și cu alcool alilic (5,5 g/dl).

Scăderea proteinemiei la șobolanii intoxicați se asociază cu scăderea albuminemiei. Astfel, la șobolanii intoxicați cu tetraclorură de carbon, albuminemia a scăzut cu 69,26%, iar la cei intoxicați cu alcool alilic, cu 71,26%.

Scăderea albuminelor serice la șobolanii intoxicați se corelează cu creșterea valorii globulinelor serice, ceea ce sugerează existența unei leziuni hepatice ca urmare a expunerii la agenți toxici.

După administrarea preparatului realizat conform invenției se constată o creștere a valorii proteinelor totale cu 26,29% și a albuminelor serice cu 169,7% în intoxicația cu tetraclorură de carbon și o creștere a proteinemiei cu 30,9% și a albuminemiei cu 190,75% în intoxicația cu alcool alilic. Frațiunile globulinice revin la valorile aproximativ inițiale după 14 zile de tratament cu preparatul obținut conform invenției (Tabel nr. 10).

Evaluarea rezultatelor s-a efectuat prin testul T – STUDENT și ANOVA (8, 9) și demonstrează că datele sunt semnificativ statistice ($p < 0,05$).

Tabel 10

Proteinograma la șobolani intoxicați și tratați cu preparatul hepatoprotector

Loturi experimentale	Proteine totale, g/dl $X \pm DS$		Albumine, % $X \pm DS$	Globuline, %			
				α_1 $X \pm DS$	α_2 $X \pm DS$	α_3 $X \pm DS$	α_4 $X \pm DS$
0	1	2	3	4	5	6	
Martori Ser fiziologic	7.6 ± 0.8	60.2 ± 7.3	9.1 ± 1.3	9.7 ± 1.5	10.4 ± 2.1	10.6 ± 1.8	
Intoxicați cu CCl_4	E%	$5.4 \pm 0.89^*$	$18.5 \pm 2.2^*$	$22.3 \pm 3.1^*$	$19.7 \pm 2.4^*$	$21.3 \pm 2.8^*$	$18.1 \pm 2.1^*$
		- 28.94	- 69.26	+ 145.05	+ 103.09	+ 104.8	+ 70.75
CCl_4 + preparat hepatoprotector	E%	$6.28 \pm 0.98^*$	$49.9 \pm 5.7^*$	$13.6 \pm 2.3^*$	$12.5 \pm 1.4^*$	$12.7 \pm 1.6^*$	$11.3 \pm 1.9^*$
		+ 26.29	+ 169.7	- 39.01	- 36.54	- 40.37	- 37.56
P (ANOVA)	0,1624	0,2578	0,1135	0,1528	0,3989	0,2137	
Intoxicați cu	$5.5 \pm 0.7^*$	$17.3 \pm$	$25.9 \pm$	$20.8 \pm$	$18.1 \pm$	$17.9 \pm$	



0	1	2	3	4	5	6	
alcool alilic		2,3*	3,3*	3,1*	2,6*	2,5*	
	E%	- 27,63	- 71,26	+ 184,61	+144,43	+ 74,03	+ 68,86
Alcool alilic + preparat hepatoprotector	E%	7,2 ± 0,98*	50,3 ± 6,4*	15,8 ± 1,9*	12,6 ± 1,5*	11,2 ± 1,7*	10,1 ± 1,55*
		+ 30,9	+190,75	- 38,99	- 39,42	- 38,12	- 43,57
P (ANOVA)		0,1328	0,2558	0,16391	0,2383	0,1734	0,1552

*p < 0,05 E% = efect % X ± DS = media ± deviația standard

1.6.2. Determinarea ureei serice

Determinarea ureei serice s-a făcut prin metoda enzimatică cu urează (3).

Rezultate

Scăderea ureei serice cu 42,6% la șobolanii intoxicați cu tetraclorură de carbon față de martorii tratați cu ser fiziologic, denotă o reducere a capacității de sinteză a ficatului agresat de către agenții hepatotoxici. Creșterea ureei serice cu 61,04% după 14 zile de tratament cu preparatul realizat conform invenției, demonstrează îmbunătățirea capacității de sinteză a ficatului (Tabel nr. 11).

În cazul intoxicației cu alcool alilic, valoarea ureei serice scade cu 36,79% iar după tratamentul cu preparatul realizat conform invenției, aceasta crește cu 52,29% (Tabel nr. 11).

Rezultatele sunt semnificative din punct de vedere statistic (p < 0,05).

Tabel 11

Valoarea ureei serice la șobolanii intoxicați și tratați cu preparat hepatoprotector

Produs testat	Doză și cale de administrare	Bilirubină serică, mg/dl		
		X ± DS	Efect, %	T – STUDENT p
0	1	2	3	4
Martori Ser fiziologic	-	28,4 ± 3,1	-	-
Intoxicați cu CCl ₄	0,2 ml/kg corp. oral	16,3 ± 2,5	- 42,6	-
CCl ₄ + preparat hepatoprotector	10 ml/kg corp. oral	26,25 ± 3,7	+ 61,04	0,04113
P (ANOVA)	0,04315			
Intoxicați cu alcool alilic	0,1 ml/kg corp. oral	17,95 ± 2,6	- 36,79	0,02197
Alcool alilic + preparat hepatoprotector	10 ml/kg corp. oral	27,45 ± 3,9	+ 52,29	0,03856
P (ANOVA)	0,03698			

$X \pm DS$ = media \pm deviația standard

1.7. Determinarea regenerării hepatice după hepatectomie parțială la șobolan

Material și metodă

S-au utilizat 2 loturi de câte 30 șobolani albi, masculi, rasa Wistar, în greutate de 190 ± 10 g, ținuti în condiții standard de laborator. Animalele aduse din crescătorie au fost ținute 2 zile pentru acomodare în condițiile de laborator, pentru a se putea obișnui cu noul habitat și cu regimul de hrană. Animalele au fost hrănite de 2 ori pe zi și cu apă „ad libitum” din biberone.

Experimentul respectă Directiva CE 86/609 și O.G.R. nr. 37/2002.

Pentru hepatectomia parțială s-a practicat deschiderea cavității abdominale, s-a pus în evidență lobul central hepatic, pe sub care se trece un fir de catgut 00. Prin legarea lui se închid principalele vase și apoi se secționează o parte din lob. Se îndepărtează cu un foarfece fin restul de țesut și se taie catgutul. Se trece apoi la închiderea peretelui abdominal și a tegumentului. După 4 ore de la operație se începe tratamentul cu preparatul obținut conform invenției diluat 5%, în doză de 10 ml/kg corp, administrat oral.

După 7, 14 și 21 zile, din fiecare lot se sacrifică câte 10 șobolani, de la care se recoltează sângele și se extirpă ficatul.

Fragmentele de ficat extirpat prin hepatectomie sunt cântărite și raportate la greutatea corporală a șobolanului respectiv, sunt uscate la etuvă la $65 - 70^{\circ}\text{C}$ după care li se determină lipidele hepatice.

Ficatul regenerat extirpat după sacrificarea șobolanilor este cântărit și raportat la greutatea șobolanului.

Procentul de regenerare hepatică se calculează cu formula:

Regenerare hepatică, %, $(\text{g ficat total la sacrificare} - \text{g ficat rezidual})/\text{g ficat extirpat inițial} \times 100$.

Rezultate

După hepatectomie și tratamentul șobolanilor cu preparatul realizat conform invenției, se observă creșteri ponderale ale ficatului la 7, 14 și 21 zile față de martorii

netratați (Tabel nr. 12). Creșterea cea mai mare, de 25,31%, are loc după 21 de zile de tratament cu preparatul realizat conform invenției. Valorile sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$).

Tabel 12

Creșterea ponderală a ficatului după hepatectomie

Durata tratamentului	Martori operați și netratați $X \pm DS$	Tratament cu preparat hepatoprotector $X \pm DS$	Efect, %	T – STUDENT p
0	1	2	3	4
Inițial	4,7915 ± 0,98	-	-	-
La 7 zile	5,3421 ± 0,87	5,8958 ± 0,97	+ 10,36	0,03811
La 14 zile	5,9116 ± 1,21	6,7654 ± 0,78	+ 14,44	0,02993
La 21 zile	6,4158 ± 0,95	8,0526 ± 1,17	+ 25,31	0,04023
ANOVA	F = 14,2158 P = 2,3581 E – 5			

$X \pm DS$ = media ± deviația standard

1.8. Determinarea greutateii corporale după hepatectomie

Greutatea corporală medie a șobolanilor de referință, cu hepatectomie a scăzut în primele 7 zile de la 194,4 g la 132,2 g. Șobolanii cu hepatectomie și tratați cu preparatul realizat conform invenției au prezentat creșteri ponderale cu valori cuprinse între 6,055% și 11,86% (Tabel nr. 13). Valorile sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$).

Tabel 13

Modificarea greutateii corporale la șobolani cu hepatectomie

Durata tratamentului	Martori operați și netratați $X \pm DS$	Tratament cu preparat hepatoprotector $X \pm DS$	Efect, %	T – STUDENT p
0	1	2	3	4
Inițial	198,4 ± 20,23	-	-	-
La 7 zile	193,2 ± 21,42	204,9 ± 22,56	+ 6,055	0,04315
La 14 zile	202,3 ± 24,71	221,3 ± 26,7	+ 9,39	0,02573
La 21 zile	206,5 ± 21,38	229,6 ± 30,4	+ 11,86	0,03138
ANOVA	F = 23,1583 P = 0,1348			

$X \pm DS$ = media ± deviația standard

1.9. Determinarea lipidelor hepatice după hepatectomie

Determinarea lipidelor hepatice s-a efectuat pe porțiunile de ficat extirpat, după uscare și cântărire, prin metoda gravimetrică (3).

În urma determinărilor efectuate se constată o scădere a lipidelor hepatice cu 27,86% pentru preparatul realizat conform invenției după 21 de zile de tratament (Tabel nr. 14).

Tabel 14

Variația lipidelor hepatice (mg%) la șobolani cu hepatectomie

Durata tratamentului	Martori operați și netratați $X \pm DS$	Tratament cu preparat hepatoprotector $X \pm DS$	Efect, %	T – STUDENT p
0	1	2	3	4
Inițial	27,3 ± 3,2	-	-	-
La 7 zile	28,5 ± 2,9	29,1 ± 3,1	+ 2,1	NS
La 14 zile	21,5 ± 2,3	18,45 ± 1,7	- 14,18	0,04116
La 21 zile	20,6 ± 1,9	14,86 ± 1,6	- 27,83	0,03986

$X \pm DS$ = media ± deviația standard NS = ne semnificativ statistic ($p > 0,05$)

CONCLUZII

Produsul realizat conform invenției luat în studiu și constituenții lui prezintă efect hepatoprotector demonstrat prin protejarea animalelor față de agenții hepatotoxici ducând la scăderea somnului indus de tiopental, diminuează activitatea transaminazelor serice, prezintă activitate proteosintetică și favorizează regenerarea hepatică.

Preparatul fitoterapeutic obținut conform prezentei invenții constă în aceea că este constituit din extract de cătină roșie (*Tamarix herba*) în raport de combinare de 4,500 ... 5,000 părți, extract de fructe de armurariu (*Cardui fructus*) în raport de combinare de 3,000 ... 3,500 părți, extract de frunze de rozmarin (*Rosmarini folium*) în raport de combinare de 2,500 3,000 părți și pulbere de fructe de armurariu în raport de combinare de 85,000 90,000 părți în greutate la 100 g produs, împreună cu excipienți uzual utilizați în industria farmaceutică.

Produsul realizat conform invenției prezintă următoarele avantaje: contribuie la restabilirea funcțiilor hepatice dereglate și la creșterea rezistenței hepatocitului față de

factori nocivi, este benefic în suplimentarea nutrițională pentru protejarea ficatului în perioadele de suprasolicitare fizică și intelectuală, este ușor de administrat, lipsit de efecte secundare.

Produsul farmaceutic fitoterapeutic cu compoziția revendicată nu este cunoscut în literatura de specialitate.

Procedeele de obținere produsului, conform invenției, constă în aceea că, într-un granulator în sine cunoscut, prevăzut cu sistem de încălzire – răcire și de agitare, se introduc materiile prime - principiile active (pulberea de fructe de armurariu și extractele de fructe de armurariu, de frunze de rozmarin, de cătină roșie) și excipienții de granulare - se omogenizează și se granulează. Granulatele umede obținute se usucă la temperatura de 35 - 40°C, se uniformizează, se lubrifiază cu excipienții de lubrifiere, după care se comprimă pe ponson corespunzător, pentru obținerea de comprimate sau se încapsulează pentru obținerea de capsule.

Tehnologia de preparare a produsului fitoterapeutic realizat conform invenției permite păstrarea stabilității tuturor compușilor bioactivi din formulă, iar utilizarea excipienților de granulare larg uzitați în industria farmaceutică asigură biodisponibilitatea produsului.

Se dă mai jos un exemplu pentru realizarea produsului:

Exemplul 1:

Într-un granulator în sine cunoscut, cu o capacitate de aproximativ 70,0 litri, prevăzut cu sistem de încălzire – răcire și agitare, se introduc pulberea de fructe de armurariu, respectiv 4,8 kg.

Extractele de fructe de armurariu, 0,18 kg, de frunze de rozmarin, 0,16 kg și de cătină roșie, 0,25 kg se omogenizează timp de 15 – 30 minute, după care se introduc

prin pulverizare, peste pulberea de fructe de armurariu. Granulatele obținute se usucă la temperatura de 35 - 40°C, se uniformizează, se lubrifiază cu excipienții de lubrifiere se comprimă pe ponson adecvat pentru obținerea de comprimate sau se încapsulează pentru obținerea de capsule.

REVENDICĂRI

1. Preparat natural fitoterapeutic destinat optimizării funcțiilor ficatului și ale căilor biliare, sub formă de comprimate sau capsule, caracterizat prin aceea că, este constituit din 4,500 ... 5,000 părți extract de cătină roșie, 3,000 ... 3,500 părți extract de fructe de armurariu, 2,500 ... 3,000 părți extract de frunze de rozmarin și 85,000 ... 90,000 părți pulbere de fructe de armurariu, părțile fiind exprimate în greutate pe 100 g produs, împreună cu excipienți acceptabili pentru industria farmaceutică.

2. Produs natural fitoterapeutic conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că, folosește extractul de fructe de armurariu, de frunze de rozmarin și de cătină roșie cu o compoziție în substanțe bioactive adecvate scopului propus, toate fixate de suport de pulbere de fructe de armurariu, ceea ce conduce la un conținut de silimarină exprimată ca silibină de minimum 10 mg/comprimat sau capsulă.

3. Procedeu de preparare a produsului conform revendicărilor 1 și 2, caracterizat prin aceea că, se amestecă separat extractele de fructe de armurariu, de frunze de rozmarin și de cătină roșie, obținute la temperaturi mai mici de 40°C, după care se pulverizează peste pulberea de fructe de armurariu omogenizată cu excipienții de condiționare, astfel încât se obține un produs cu o stabilitate și biodisponibilitate corespunzătoare, fără a se distruge sistemele enzimatice.