



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00328

(22) Data de depozit: 14/06/2022

(41) Data publicării cererii:
28/10/2022 BOPI nr. 10/2022

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,
ȘOS. PANDURI NR.90, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA DE VEST "VASILE
GOLDIȘ" DIN ARAD, BD. REVOLUȚIEI
NR. 94-96, ARAD, AR, RO;
- PLANTEXTRAKT S.R.L., STR.ZALĂULUI,
RADAIA, CJ, RO

(72) Inventatori:

- HERMENEAN ANCA OANA,
STR.EPISCOP ROMAN CIOROGARIU,
NR.24, ARAD, AR, RO;
- BALTĂ CORNEL, STR.1, NR.217, BL.2,
AP.4, HÂȘMAȘ, AR, RO;
- OLAH NELI KINGA, STR.ION LUCA
CARAGIALE, NR.6-8, SC.4, AP.63,
CLUJ NAPOCA, CJ, RO;
- COSTACHE MARIETA, STR.TELIȚA
NR.12, BL.56, SC.4, ET.1, AP.46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- DINISCHIOTU ANCA, CALEA MOȘILOR,
NR.124A, SC.1, ET.1, AP.2, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- DINESCU SORINA, BD. 1 DECEMBRIE
1918, NR. 45, BL. J41, AP. 81, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
- NAZARIE SIMONA- REBECA,
STR.PODUL NEAGULUI, NR.49,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- LAZĂR ANDREEA, STR.POPESCU
ROMEO, NR.29, SECTOR 1, BUCUREȘTI,
B, RO;
- ȘELARU AIDA, STR.ROMULUS, NR.38,
AP.4G, ET.4, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

- SAMOILĂ IULIANA, STR.ULMILOR,
NR.38, BACĂU, BC, RO;
- BALAHURĂ ROXANA,
STR.SOLD.TUDOR ION, NR.4, BL.5, SC.2,
AP.22, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- ȘERBAN MIRELA VIOLETA,
STR.VETERANILOR, NR.2, BL.M13, SC.1,
ET.7, AP.89, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
- VOICU SORINA NICOLETA,
STR.MOHORULUI, NR.6, BL.17, SC.7, ET.1,
AP.100, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- BADEA ANDREEA,
STR.MONUMENTULUI, NR.446,
LOCALITATEA MALU SPART, BOLINTIN
VALE, GR, RO;
- ION CLAUDIA, STR.PODUL GIURGIULUI,
NR.9, BL.10T, ET.5, AP.24, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
- COTORĂCI CORALIA ADINA,
STR.CD LOGA, NR.3, ARAD, AR, RO;
- FENYVESI FERENC, STR.AKADEMIA,
NR.6, DEBRECEN, HU;
- ROȘU MARCEL, STR. LIBERTĂȚII, NR.21,
SĂNTANA, AR, RO;
- GHARBIA SAMI, STR.COCORILOR,
NR.48/A, BL.2, AP.93, ARAD, AR, RO;
- HILDEGARD HERMAN,
STR.OCTAVIAN GOGA, NR.5, AP.8, CAREI,
SM, RO;
- CICEU ALINA, PIAȚA ARENEI, NR.6,
BL.E, SC.C, AP.3, ARAD, AR, RO;
- MLADIN BIANCA MARIA,
ALEEA ROMANȚA, NR.4, BL.S, SC.B, ET.2,
AP.10, ARAD, AR, RO;
- BURTESCU RAMONA FLAVIA,
CALEA FLOREȘTI, NR.79, SC.IV, ET.9,
AP.116, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- PRIPON FURTUNA FLAVIA ROXANA,
ALEEA ZAMBILELOR, NR.4, BACIU, CJ, RO

(54) **COMPOZIȚIE FITOTERAPEUTICĂ PE BAZĂ DE EXTRACT
GEMOTERAPIC DE CORYLUS AVELLANA ÎMBOGĂȚIT CU
NANOCOMPLEXE DE CRISINĂ/ CICLODEXTRINE DESTINAT
FIBROZEI HEPATICE ÎN DIABETUL ZAHARAT ȘI METODĂ
DE OBTINERE ACESTEIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții farmaceutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine destinat fibrozei hepatice în diabetul zaharat. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: obținere a extractului gemoterapic de *Corylus avellana* din muguri de alun în stare proaspătă în solvent amestec de glicerină-alcool etilic 96% vol (1:1), prin extracția la rece, prin macerare, timp de 20

zile, la un raport 1:20 plantă- solvent, formularea complexelor de incluziune crisină-ciclodextrină, amestecarea extractului gemoterapic de alun cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine și liofilizarea amestecului, rezultând o compoziție fitoterapeutică având proprietăți anti-fibroze hepatice.

Revendicări: 6
Figuri: 23

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	14-06-2022
Data depozit	

99-

DESCRIEREA INVENTIEI

Titlul invenției: Compoziție fitoterapeutică pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine destinat fibrozei hepatice în diabetul zaharat și metodă de obținere a acesteia

Domeniul tehnic la care se referă invenția:

Prezența invenției se referă la o nouă compoziție fitoterapeutică pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine destinat fibrozei hepatice în diabetul zaharat și metoda de obținere a acesteia

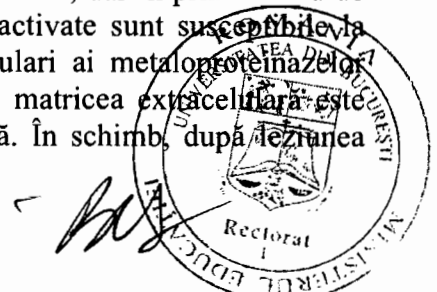
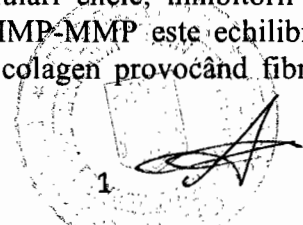
Stadiul tehnicii:

Ciroza hepatică și diabetul zaharat (DZ) sunt două boli cronice cu impact semnificativ asupra calității vieții. DZ are o prevalență globală estimată de aproximativ 9%, iar până în 2030, la nivel global 300-400 de milioane de oameni vor fi afectați [1], rezultând o încărcătură economică și socială semnificativă [2, 3]. Scăderea toleranței la glucoză este observată la aproximativ 80% dintre pacienții cu ciroză, în timp ce 30-60% dintre pacienții cu ciroză avansată dezvoltă diabet [4]. Dovezile cumulate ale rezultatelor cercetărilor efectuate până în prezent sugerează că diabetul [5], rezistența la insulină [6, 7] și nivelul de glucoză din sânge [8] sunt asociate cu progresia fibrozei hepatice la pacienții cu boli hepatice cronice. Puține studii au evidențiat impactul DZ de tip 2 asupra rezultatelor clinice ale cirozei. În mai multe analize retrospective transversale ale pacienților cu ciroză, DZ a conferit un risc mai mare de complicații [9, 10]. Mai mult, studiul Verona, care a înrolat > 7000 de indivizi cu DZ de tip 2, a generat un risc de mortalitate pe 5 ani de 2,52 ori (IC 95%: 1,96–3,2) mai mare raportat la riscul general populațional [11].

Fibroza hepatică este un răspuns cicatricial reversibil la leziunile hepatice și, în cele din urmă, duce la ciroză, asociată cu formarea de noduli și contracție de organ [12]. Formarea cicatricilor fibroase este caracterizată prin acumularea progresivă a unei matrici extracelulare modificate calitativ (ECM) care este îmbogățită excesiv în collagen fibrilar de tip I și III și este asociată cu scăderea remodelării matricii [13]. Această modificare a matricii este însoțită de o angiogeneza alterată, ducând în cele din urmă la modificări structurale severe caracteristice cirozei hepatice.

Procesul de fibrogeneză este condus de o populație celulară heterogenă (celule asemănătoare miofibroblastelor) care sunt implicate în patogeneza fibrozei hepatice: celule hepatice stelate, fibroblaste portale, celule stem mezenchimale derivate din măduva osoasă, hepatocite și celule epiteliale biliare, fibrocite. În timpul progresului fibrogenezei, celulele stelate hepatice (HSC), care în stare normală sunt în repaus și stochează vit. A, se activează, urmată de eliberarea de citokine și chemokine, care induce transdiferențierea lor în celule asemănătoare miofibroblastelor [13]. Acest pas este marcat de expresia crescută α -SMA și procologen-I, ducând în final la o producție crescută și acumulare de componente ale matricii extracelulare, inclusiv collagen. Factorul de creștere transformator- β 1 (TGF- β 1) produs de celulele Kupffer, celulele endoteliale și hepatocite a fost recunoscut ca un activator cheie al HSC în patogeneza fibrozei hepatice și acționează prin activarea căii de semnalizare Smad [14].

În stare normală, matricea poate fi degradată de o varietate de enzime, dar în primul rând de metaloproteinaze de degradare a matricii (MMP). MMP-urile activate sunt susceptibile la inhibarea de către inhibitorii extracelulari cheie, inhibitorii tisulari ai metaloproteinazelor (TIMP). În starea sănătos raportul TIMP-MMP este echilibrat, matricea extracelulară este degradată și astfel nu se acumulează collagen provocând fibroză. În schimb, după leziunea



hepatică, echilibrul TIMP-MMP este perturbat, iar TIMP-urile sunt supraexprimate, contribuind la depunerea ECM și la dezvoltarea fibrozei [14]. Expresia și secreția TIMP-1 este strâns legată de activarea HSC, în ceea ce privește numărul de celule activate și fibrogenza, și rămâne la niveluri ridicate în timpul progresiei fibrozei. Expresia TIMP este, de asemenea, reglată de citokine și factori de creștere. Legarea TIMP-urilor de MMP-urile active pare să provoace depunerea ireversibilă a ECM, ceea ce duce la fibroză. Mormone și colab. [15] a rezumat schematic conceptele cheie implicate în patogenia moleculară a fibrozei hepatice (Fig. 1).

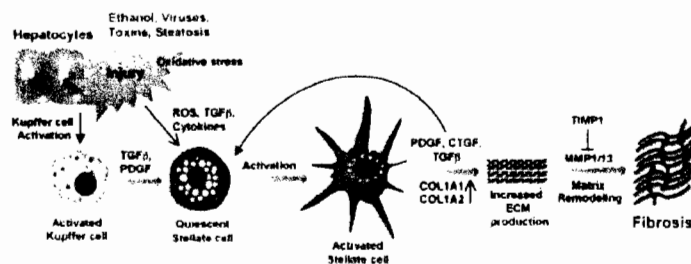
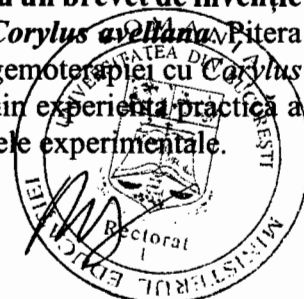
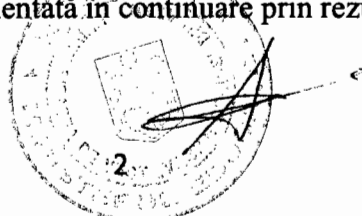


Figura 1: Concepte cheie implicate în activarea celulelor stelate hepatice și patogeniza fibrozei hepatice [15]

Prin urmare, strategiile terapeutice pentru a furniza agenți anti-fibrotici puternici care să aibă ca țintă citokine specifice sau alte biomolecule implicate în progresia fibrozei, capabile să prevină, să întârzie sau să inverseze progresia fibrozei hepatice înainte de stadiul final al cirozei, sunt o provocare.

Gemoterapia este o ramură a fitoterapiei care folosește țesuturile biologice găsite în muguri, îmbogățite în vitamine, oligoelemente, minerale, acizi nucleici și hormoni de creștere comparativ alte țesuturi vegetale [2216]. În plus, gemoterapia conține și alte substanțe active (cum ar fi gibberelinele și auxinele) care se pierd dacă o plantă este lăsată să ajungă la o etapă ulterioară a ciclului său de creștere înainte de recoltare [2317]. Țesutul embrionar proaspăt este prelevat primăvara, în cea mai activă fază a ciclului de creștere, pentru a asigura cea mai mare concentrație de substanțe biologice active. Preparatele gemoterapice sunt produse sub formă de amestec glicero-alcoolice pentru a asigura întregul profil al tuturor ingredientelor bichimice extrase și concentrate. Alcoolul extrage toate principiile active ca alcaloizi, heterocite și glicozide. Glicerina extrage toate uleiurile esențiale, fenolii și flavonoidele.

Corylus avellana (alun comun) este cunoscut a fi bogat în minerale și vitamine, inclusiv alfa-tocopherol, acid ascorbic, folați, niacină, riboflavină, tiamină și vitamina K sub formă de filochinonă; acizii grași și aminoacizii includ alanina, arginina, acidul aspartic, acidul glutamic și leucina [18, 19]. Uleiul conține acizi grași saturați (7%), acizi grași mono- (78%) și polinesaturați (10%) și fitosteroli (0,1%) [20]. În ulei se găsesc acizi grași oleic, linoleic, linolenic, palmitoleic și steric [18]. Acidul Caffeoylquinic, acidul caffeoyltartaric, acidul coumaroyltartaric, miricetina, quercetina și fenolii kaempferol se găsesc în frunzele de alun [21]. Cercetări recente au arătat că *Corylus avellana* este capabil să producă paclitaxel [21] și taxol [22] și exercită activitate antioxidantă și de captare a radicalilor [23-25]. Rezultatele unui studiu clinic au arătat că suplimentarea dietei cu alune de pădure 1 g/kg greutate corporală/zi a redus lipoproteinele cu densitate mică și colesterolul total și a crescut lipoproteinele cu densitate mare și trigliceridele [26]. **Până în prezent, nici un articol științific sau un brevet de invenție nu a raportat vreo activitate biologică a extractului gemoterapic *Corylus avellana*.** Pitera & Nicoletti [16], în monografia gemoterapia, au menționat beneficiul gemoterapiei cu *Corylus avellana* în bolile hepatice, cu accent în fibroza hepatică, evidențiată din experiența practică a medicilor în plante, dar trebuie argumentată în continuare prin rezultatele experimentale.



Crisina (5,7-dihydroxiflavona) este componenta activă majoră a mierii, propolisului și multor extracte din plante. Valoarea medicinală a crisinei a fost recunoscută. Prezintă activități antiinflamatorii [27], anticancerigene [28], cardioprotectoare [29] și antioxidante [30].

Expunerea detaliată a invenției:

1. Obținerea extractului gemoterapic de *Corylus avellana*

1.1. Recoltarea materialului vegetal: Mugurii de Alun, *Corylus avellana* L. se recoltează în lunile februarie-martie, când mugurele încă nu s-a deschis, dar este în stadiul de dezvoltare maximă înainte de a se deschide.

1.2. Conservarea materialului vegetal: Masa vegetală se conservă în amestec glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1). 1 parte de material vegetal mărunțit se amestecă cu 1 parte amestec glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1). Se omogenizează amestecul astfel ca materialul vegetal să fie în contact cât mai bun cu solventul. Acest amestec de material vegetal și solvent se poate păstra la temperatura camerei maxim 6 luni de zile.

1.3. Obținerea maceratului glicerinic.

Extractul din muguri de Alun se obține conform Farmacopeei Franceze respectiv Farmacopeei Europene, monografia 2.1.3, folosind ca și solvent amestec de glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1). Planta se prelucrează în stare proaspătă, conservată în amestec de solvent. Din planta mărunțită la o consistență de pastă se prelevează probă pentru determinarea umidității. În funcție de umiditate se calculează raportul de extracție, care este 1:20 partea uscată din plantă – solvent. Extracția se realizează la rece, prin macerare, timp de 20 zile, cu agitări zilnice 2 x 10 minute. După 20 zile de agitare lichidul se decantează de pe masa de material vegetal, care ulterior se supune presării la 350-400 atm, iar lichidul presat este amestecat cu lichidul decantat. Soluția extractivă astfel obținută este extractul gemoterapic din muguri de Alun (CAG).

2. Obținerea și caracterizarea nanocomplexelor de crisina/ciclodextrine

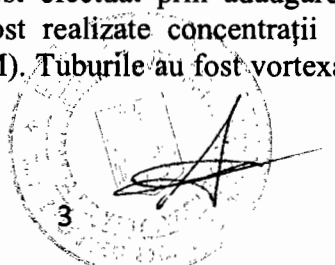
2.1. Prepararea complexelor crisină-ciclodextrine. Crisina a fost formulată cu două β -ciclodextrine diferite pentru a forma complexe de incluziune cu hidroxipropil- (HPBCD) și random metilat (RAMEB) β -ciclodextrine la raporturi molare 1: 1.

2.2. Testul de solubilitate. Complexele au fost testate pentru solubilizare în apă. Complexele au fost dizolvate în apă timp de 24 de ore și spectrele de absorbție au fost înregistrate cu spectrofotometru UV.

Tabelul 1. Valorile concentrației și creșterea solubilității crisinei în apă prin complexarea ciclodextrinei (n.d. — nedeterminat) (n = 3). CD: -ciclodextrină, HPBCD: hidroxipropil -ciclodextrină, RAMEB: -ciclodextrină metilată aleator (randomly)

	Crisina in H ₂ O	Crisina:RAMEB	Crisina:HPBCD
Raport molar complexe	-	1:1	1:1
Concentrația de crisina (ug/ml)	1,01	7,48 0,15	5,72 0,28
Creșterea solubilității	1	7,41	5,22

2.3. Testul de solubilitate de fază a fost efectuat prin adăugarea unei cantități excesive cunoscute de pulbere de crisină. Au fost realizate concentrații crescătoare de crisină în ciclodextrine RAMEB/HPBCD (5-80 mM). Tuburile au fost vortexate timp de 30 de secunde



pentru a obține dispersii bine amestecate (temperatura camerei, întuneric). După 72 de ore, fiecare probă a fost centrifugată la 15.000 rpm timp de 10 minute.

Probele au fost preluate din supernatantul clar, iar conținutul de crisină al probelor a fost analizat prin spectrofotometrie (Shimadzu UV-1900). Profilurile de solubilitate de fază ale crisinei au fost realizate de trasând solubilitatea crisinei față de concentrația ciclodextrinelor. Constanta de stabilitate (K_s) ale complexelor crisină-CD au fost calculate din diagrame de solubilitate de fază conform următoarei ecuații:

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})}$$

S_0 — Solubilitatea crisinei în apă

Eficiența complexării (CE) și raportul molar medicament:ciclodextrina (D: CD) au fost calculate după cum urmează:

$$CE = \frac{\text{slope}}{(1 - \text{slope})}$$

$$D:CD = 1 : \left(1 + \frac{1}{CE}\right)$$

Figura 1. prezintă profilurile de solubilitate ale crisinei în prezența RAMEB și HPBCD. Datorită solubilității limitate în apă a CD, cea mai mare concentrație aplicată a fost de 8 mM. Fiecare derivat de ciclodextrină a reușit să îmbunătățească solubilitatea în apă a crisinei în complexe de ciclodextrină, în mod dependent de concentrație.

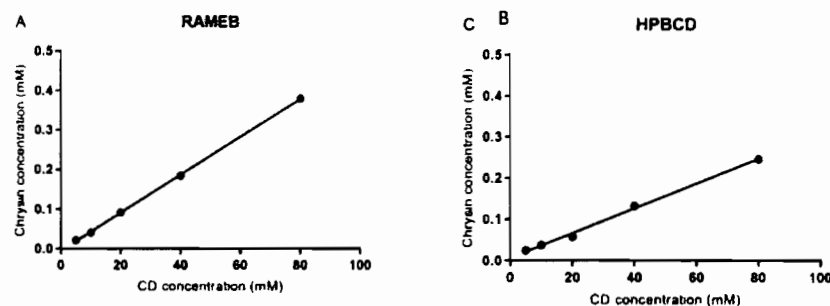


Figura 1. Diagramele de solubilitate de fază ale crisinei cu (A) RAMEB, (B) HPBCD Constantele de stabilitate (K_s) ale complexelor crisină-ciclodextrină au fost calculate din datele de solubilitate de fază (tabelul 2).

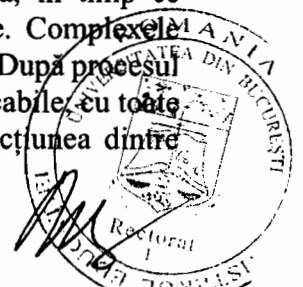
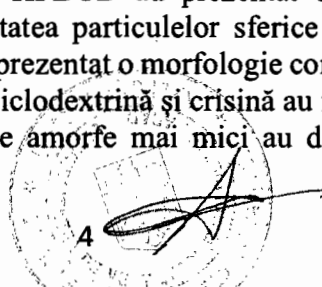
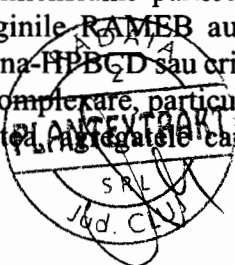
Tabelul 2. Eficiența complexării (CE), constantele de stabilitate (K_s) și raportul molar medicament: ciclodextrină (D: CD) a complexelor crisină – ciclodextrină (n = 3).

Cyclodextrins	K_s (M^{-1})	CE	D:CD
RAMEB	1200	$0.0048 \pm 6.9 \times 10^{-5}$	$1:209 \pm 3$
HPBCD	760	$0.003 \pm 7 \times 10^{-5}$	$1:332 \pm 2$

2.4. Microscopie electronică scanning (SEM)

Morfologia particulelor solide de ciclodextrine, crisină și complexe crisină-ciclodextrină a fost investigată prin SEM (Hitachi S-4300 CFE).

Morfologia crisinei pure și a complexelor de crisină-ciclodextrine au fost examinate prin SEM (Figura 23). Crisina brută a prezentat particule agregate cu diferite forme și cu un spectru larg al dimensiunii particulelor. Particulele HPBCD au prezentat o formă sferică, în timp ce imaginile RAMEB au arătat că majoritatea particulelor sferice au fost sparte. Complexele crisină-HPBCD sau crisină-RAMEB au prezentat o morfologie complet diferită. După procesul de complexare, particulele originale de ciclodextrină și crisină au fost neidentificabile, cu toate acestea, agregatele care conțin particule amorphe mai mici au dezvăluit interacțiunea dintre



crisină și ciclodextrine. Noua structură formată contribuie la o solubilitate mai mare și la biodisponibilitatea îmbunătățită a crisinei (vezi *Anexa Desene si Planse - Plansa 1*).

3. Obținerea compoziției fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine și evaluarea profilului fitochimic al acestuia

3.1. Metodă de obținere și de analiză pentru evaluarea conținutului de polifenoli

Extractul de gemoterapic de *Coryllus avelana* a fost amestecat atât cu complexe RAMEB-, cât și cu HPBCD-crisină și a fost supus liofilizării. S-au testat diferite rapoarte de extract-complex pentru stabilizarea amestecului prin liofilizare. Cantitatea exces de ciclodextrină a fost, de asemenea, testată pentru stabilizare.

Analiza LC/MS se realizează cu un sistem cromatografic Shimadzu Nexera I LC/MS - 8045 (Kyoto, Japan), care este un system UHPLC echipat cu pompă cuaternară și un spectrometru de masa cu cvadropoli și ionizare prin pulverizare electronica (ESI).

Seprarea se realizează pe o coloană Luna C18 cu fază inversă (150 mm x 4.6 mm x 3 μm, 100 Å), de la Phenomenex (Torrance, CA, USA). Temperatura de operare a coloanei trebuie să fie de 40°C.

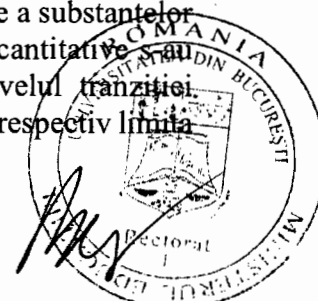
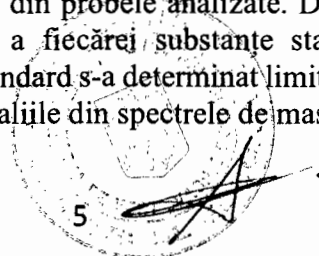
Pentru separarea a cât mai mulți polifenoli se folosește un gradient de fază mobilă (tabel 1), folosind metanol (Merck, Darmstadt, Germania), apă ultrapurificată preparată cu un sistem Simplicity Ultra Pure Water Purification System (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) și acid formic, ca și modifier organic (Merck, Darmstadt, Germania). Solvenții folosiți au fost de puritate LC/MS. Faza mobilă trebuie să fie trecută prin coloana cromatografică cu o viteză de 0,5 ml/min, iar timpul total de analiză a fost de 35 minute.

Tabel 3

Timp, min	Metanol	Apă ultrapurificată	acid formic 2 % în apă ultrapurificată
0.00	5	90	5
3.00	15	70	15
6.00	15	70	15
9.00	21	58	21
13.00	21	58	21
18.00	30	41	29
22.00	30	41	29
26.00	50	0	50
29.00	50	0	50
29.01	5	90	5
35.00	5	90	5

Detecția componentelor se realizează cu un spectrometru de masă cu cvadropoli având sursa de ioni cu electrospray (ESI). Pentru monitorizarea reacțiilor multiple (MRM), pentru detectarea cu sensibilitate maximă, se folosește atât modul negativ cât și modul pozitiv de detectare. Temperatura interfeței a fost de 300°C, gazul de uscare a fost azotul la 35 psi, 10 l/min, iar potențialul de capilar a fost setat la +3000 V.

Ca și standarde se folosesc polifenolii din tabelul 5. În cazul fiecărui standard, la fiecare concentrație s-au injectat câte 1 μl. Identificarea s-a realizat prin compararea timpilor de retenție, a spectrelor de masa respectiv a tranzițiilor principale din aceste spectre a substanțelor standard cu cele ale compușilor separați din probele analizate. Determinările cantitative s-au realizat pe baza curbelor de calibrare a fiecărei substanțe standard, la nivelul tranziției principale. În acest sens pentru fiecare standard s-a determinat limita de detecție respectiv limita de cuantificare. În tabelul 3 sunt date detaliile din spectrele de masă.



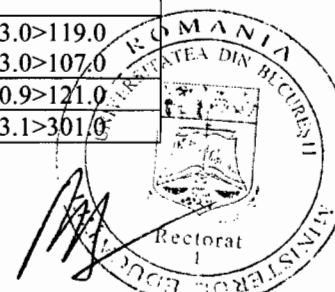
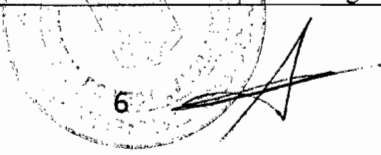
Extractele de *Corylus avellana* MG și cele îmbogățite cu crizină pe ciclodextrină s-au diluat cu metanol, identic cu cel folosit la analiza LC/MS, în raport 1 la 10. Soluțiile diluate s-au trecut prin microfilter de 0,45 μ m (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Tabel 4

Standardul și originea sa	Intervalul de concentrații mg/ml	Ecuția curbei de calibrare	Factorul de corelație	Limita de detecție, μ g/ml	Limita de cuantificare, μ g/ml
Acid clorogenic (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.13 – 1.30	Area = $2 \cdot 10^8 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 269699$	0.9997	5.00	8.00
Acid galic (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.107-1.070	Area = $8 \cdot 10^6 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 37131$	0.9999	1.90	2.80
Acid salicilic (Merck, Darmstadt, Germania)	0.16 – 1.60	Area = $4 \cdot 10^7 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] + 44120$	0.9997	1.50	2.00
Apigenină (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.10 – 0.98	Area = $2 \cdot 10^8 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] + 15916$	0.9999	0.20	0.30
Catechină (Merck, Darmstadt, Germania)	0.101 – 1.010	Area = $5 \cdot 10^6 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 1706$	0.9984	1.00	2.00
Crizină (Merck, Darmstadt, Germania)	0.10 – 1.00	Area = $1 \cdot 10^8 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 82818$	0.9997	3.00	5.00
Cvercetină (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.09 – 0.91	Area = $5 \cdot 10^7 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 9556$	0.9964	0.80	1.10
Hiperozidă (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.012 – 0.107	Area = $4 \cdot 10^8 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 567182$	0.9986	0.60	0.90
Luteolin-7-O-glucozidă (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.07 – 0.70	Area = $1 \cdot 10^9 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 700317$	0.9990	3.00	4.00
Naringenină (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.16 – 1.60	Area = $3 \cdot 10^8 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 43443$	0.9999	0.60	0.90
Rutozidă (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germania)	0.17 – 1.70	Area = $2 \cdot 10^8 \cdot \text{conc}[\text{mg/ml}] - 191937$	0.9996	4.00	6.00

Tabel 5

Standardul	Timp de retenție, min	m/z, și tranziția principală	MRM	Alte tranziții
Acid clorogenic	12.0	353.0>191.0	Negativ	
Acid galic	7.0	168.9>125.0	Negativ	
Acid salicilic	23.5	137.0>93.0	Negativ	137.0>75.0 137.0>65.0
Apigenină	28.2	269.0>117.0	Negativ	
Catechină	10.3	289.0>202.9	Negativ	
Crizină	29.7	253.0>143.0	Negativ	253.0>119.0 253.0>107.0
Cvercetină	25.7	300.9>151.0	Negativ	300.9>121.0
Hiperozidă	20.3	463.1>300.0	Negativ	463.1>301.0



Luteolin-7-O-glucozidă	19.9	447.0>284.9	Negativ	
Naringenină	26.3	271.0>119.0	Negativ	271.0>107.0
Rutozidă	20.3	609.0>300.0	Negativ	609.0>301.0 609.0>271.0

Codificarea probelor:

EGMA_02.2019 = Corylus avellana MG seria din februarie 2019

EGMA_03.2019 = Corylus avellana MG seria din martie 2019

EGMA_01.2020 = Corylus avellana MG seria din ianuarie 2020

EGMA_02.2020 = Corylus avellana MG seria din februarie 2020

CA_RAMEB_CHR_PEG = Corylus avellana MG + RAMEB + CHR-RAMEB complex + Polietilen-glicol

CA_HPBCD_CHR_PEG = Corylus avellana MG + HPBCD + CHR-HPBCD complex + Polietilen-glicol

CA_RAMEB_CHR = Corylus avellana MG + RAMEB + CHR-RAMEB complex

CA_HPBCD_CHR = Corylus avellana MG + HPBCD + CHR-HPBCD complex

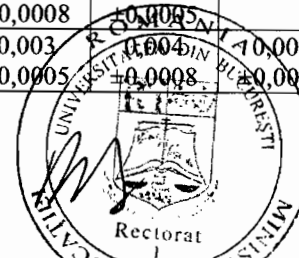
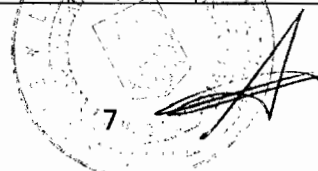
În **Plansele 2, 3 și 4a și 4b** sunt prezentate cromatogramele LC/MS, spectrele de masă și curbele de calibrare obținute pentru standarde (*vezi Anexa Desene si Planse - Plansa 2-4*).

În **Plansele 5 – 12** sunt prezentate cromatogramele LC/MS ale probelor studiate (*vezi Anexa Desene si Planse - Plansa 5-12*).

În **Plansele 13 – 20** spectrele de masa ale polifenolilor identificați și cuantificați (*vezi Anexa Desene si Planse - Plansa 13-20*).

Rezultatele datelor determinărilor cantitative sunt prezentate în **Tabelul 6**.

Standard	Proba (mg/ml)							
	<i>EGMA_02.2019</i>	<i>EGMA_03.2019</i>	<i>EGMA_01.2020</i>	<i>EGMA_02.2020</i>	<i>CA_RAMEB_CHR_PEG</i>	<i>CA_HPBCD_CHR_PEG</i>	<i>CA_RAMEB_CHR</i>	<i>CA_HPBCD_CHR</i>
Acid clorogenic	0,360 ±0,0111	0,360 ±0,0178	0,430 ±0,0354	0,340 ±0,0327	0,041 ±0,0041	0,021 ±0,0042	0,064 ±0,0045	0,016 ±0,0041
Acid galic	0,080 ±0,0054	0,070 ±0,0082	0,070 ±0,0082	0,080 ±0,0082				
Acid salicilic		0,040 ±0,0111	0,070 ±0,0082	0,060 ±0,0082			0,011 ±0,0026	
Apigenină		0,003 ±0,0005	0,002 ±0,0005					
Catechină	0,160 ±0,0227	0,100 ±0,0041	0,190 ±0,0327	0,130 ±0,0205	0,016 ±0,0033	0,014 ±0,0041	0,025 ±0,0073	
Crizină	0,100 ±0,0041	0,090 ±0,0041	0,090 ±0,0041	0,090 ±0,0041	5,775 ±0,1310	5,273 ±0,1219	5,830 ±0,0942	5,948 ±0,2796
Cvercetină	0,020 ±0,0037	0,080 ±0,0094	0,110 ±0,0178	0,070 ±0,0082				
Hiperozidă	2,000 ±0,0653	2,000 ±0,0653	2,270 ±0,0425	2,030 ±0,0525	0,295 ±0,0525	0,145 ±0,0262	0,505 ±0,0374	
Luteolin-7-O-glucozidă	0,070 ±0,0056	0,070 ±0,0082	0,070 ±0,0082	0,070 ±0,0082	0,007 ±0,0005	0,007 ±0,0008	0,007 ±0,0008	
Naringenină	0,020 ±0,0041	0,020 ±0,0041	0,020 ±0,0041	0,030 ±0,0047	0,002 ±0,0005	0,003 ±0,0005	0,004 ±0,0008	0,003 ±0,0005



92.

Rutozidă	0,580 ±0,0535	0,600 ±0,0455	0,570 ±0,0785	0,580 ±0,0838	0,082 ±0,0049	0,044 ±0,0056	0,145 ±0,0241
----------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------

4. Testarea *in vitro* a proprietăților antifibrotice ale compoziției fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine

Evaluarea *in vitro* a activității anti-fibrotice a complexelor extract gemoterapic de alun -crisină/RAMEB și extract gemoterapic de alun -crisină/HPBCD, prin analiza expresiei markerului pro-fibrotic TGF- β 1, atât la nivel genic, cât și proteic. A fost analizată expresia markerului fibrotic TGF- β 1 în celule hepatice stelate (HSC) din linia celulară LX2. În HSC latente, expresia TGF- β 1 a fost redusă la nivel proteic (Fig 1a) și genic (Fig 1b), însă în urma activării prin stimulare cu TGF- β 1, expresia acestui marker a fost crescută (Fig 1B). Tratamentul cu ambele complexe investigate, CAG-CHR/Cyclo, a redus semnificativ expresia TGF- β 1 față de controlul activat, ceea ce indică eficiența complexelor de a inhiba calea de semnalizare TGF- β 1/SMAD și implicit, activarea HSC. Complexul CAG-CHR/RAMEB s-a dovedit a fi mai eficient decât CAG-CHR/HPBCD în a induce reversia celulelor HSC activate către o stare de latență. Rezultatele au fost confirmate și la nivelul expresiei genice TGF- β 1. În urma administrării celor două tipuri de complexe, nivelul expresiei a fost statistic semnificativ redusă față de controlul activat, cu un nivel de semnificație statistică mai mare în cazul complexului cu RAMEB ($p < 0.01$) față de HPBCD ($p < 0.05$). (Plansa 21).

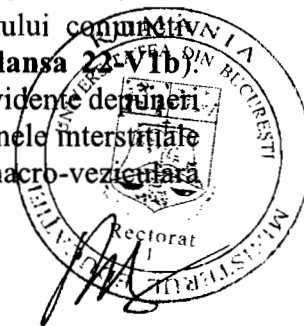
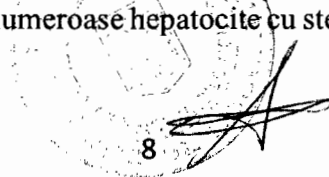
5. Testarea *in vivo* a proprietăților antifibrotice ale compoziției fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine un conținut de crisină

Protocolul experimental a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării din Universitatea de Vest Vasile Goldis (152/02.10.2019).

Pentru experiment au fost utilizați șoareci masculi CD1 din biobaza Universității de Vest Vasile Goldiș din Arad. Șoarecii au fost injectați, ip, cu o singură doză de streptozotocină (STZ; 65 mg·kg⁻¹ greutate corporală), solubilizată în tampon citrat (50 mM, pH 4,5) pentru a induce diabetul zaharat. Nivelurile de glucoză din sânge au fost măsurate după 4 ore de inaniție, folosind un glucometru. După administrarea STZ, șoarecii cu un nivel de glucoză din sânge mai mare de 2,5 g·l⁻¹ timp de două săptămâni consecutive au fost considerați șoareci cu diabet de tip 2 și incluși în studiu. Animalele cu diabet confirmat au fost tratați intraperitoneal (ip) cu CCl₄ dizolvat în ulei de măsline (20% v/v, 2 ml/kg), de două ori pe săptămână, timp de 7 săptămâni, și sacrificați la șaptezeci și două de ore după ultima injecție pentru confirmarea fibrozei hepatice (Lotul 2). Rezoluția spontană a fibrozei hepatice a fost investigată la animalele diabetice tratate cu CCl₄ după două săptămâni de recuperare (Lotul 3). Pentru a evalua efectul antifibrotic al produsului combinat extract gemoterapic *Coryllus avelana*-nanocomplex CHR/cyclo, tratamentul a început la sfârșitul celor 7 săptămâni de tratament cu CCl₄, utilizând administrarea prin gavaj zilnic timp de 14 zile consecutive a următoarelor: extract gemoterapic *Coryllus avelana*-crisina/ciclodextrine (CAG-CHR/Cyclo - Lotul 4), extract gemoterapic *Coryllus avelana* (CAG - Lotul 5), nanocomplex de crisină/ciclodextrină (CHR/Cyclo - Lotul 6) și crisină pură (CHR - Lotul 7). Toate produsele conțin 100 mg/kg de crisină. Șoarecii aparținând lotului 1 (martor -a.sanatos, b.diabetic), 2 (șoareci fibrotici) și 3 (rezoluția *de novo* a fibrozei) li s-au administrat vehiculele grupelor tratate. Animalele au fost sacrificate la 24 de ore sub anestezie după ultima doză administrată (loturile 1, 3, 4, 5, 6, 7).

Analiza histologică a ficatului lotului martor a indicat o arhitectură lobulară normală cu vena centrolobulară și cordoane de hepatocite radiare, fără o proliferare a țesutului conectiv intralobular (Plansa 22-V1a) și o ușoară dilatare a capilarelor sinusoidale (Plansa 22-V1b).

Probele de ficat din lotul CCl₄ au prezentat modificări severe ale morfologiei, evidente depuneri de colagen, formarea de pseudolobuli și infiltrarea de celule inflamatorii în zonele interstițiale hepatice. De asemenea, se observă numeroase hepatocite cu steatoză micro- și macro-veziculară



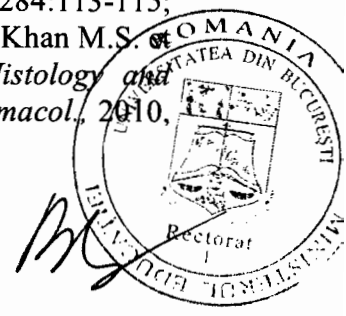
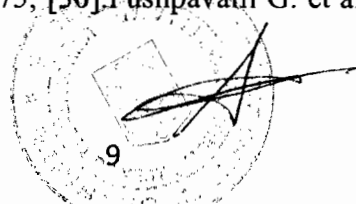
91

și congestia capilarelor sinusoide (**Plansa 22-V2**). Se remarcă prezența „hepatocitelor spumoase” (foamy) perivenulare hipertrofiate cu acumulare masivă de grăsime microveziculară. După două săptămâni de recuperare *de novo*, în lipsa unui tratament de recuperare, se observă prezența semnificativă a țesutului fibros și a pseudo-lobulilor,acompaniate de infiltrate de celule inflamatorii, comparativ cu grupul CCl₄ (Fig.8-V3). Hepatocitele hipertrofiate cu citoplasma spumoasă sunt prezente. In cazul grupului de șoareci tratați timp de 2 săptămâni cu extract gemmoterapic *Coryllus avelana* (**Plansa 22-V5**), nanocomplex de crisină/ciclodextrină (**Plansa 22-V6**), după instalarea fibrozei, ariile fibrotice au fost reduse (insulare), comparativ cu cele înregistrate în cazul grupului CCl₄. Infiltrate inflamatorii în ariile perivasculare se pastrează și de asemenea și congestia sinusoidelor. Microsteatoza hepatică este prezentă la aceste loturi. Șoarecii cărora li s-a administrat extract gemoterapic *Coryllus avelana*-crisina/ciclodextrine au prezentat o histo-arhitectură apropiată de cea a martorului și peste grupul V1b – control diabetic (**Plansa 22-V4**). Cea mai slabă recuperare structurală s-a înregistrat pentru șoarecii cărora li s-a administrat doar crisină pură (**Plansa 22-V7**). Formarea septelor fibrotice perilobulare și pseudolobulilor a fost confirmată în coloratie tricromică pentru lotul V2 (**Plansa 23-V2**) și în egală măsură la lotul de reversie *de novo* a fibrozei (Fig.9-V3). Colagen insular se mai evidentiază la administrarea CHR pur (fig.9-V7), mai puțin la CHR/Cyclo (**Plansa 23-V4**), a CAG (**Plansa 23-V5**) unde septele sunt intrerupte iar colagenul apare mai mult pericentrolobular, și sporadic la grupul tratat cu CAG-CHR/Cyclo, comparabil cu martorii sanatos și diabetic (**Plansa-V6**).

BIBLIOGRAFIE

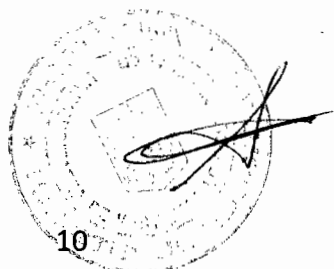
- [1] Sudharsanan N. et al., 1990-2008. *Population HealthMetrics*, 2015, 13(1):33; [2] GBD 2015 *The lancet*, 2016, 388:1459–1544; [3] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). *The Lancet*, 2016, 387(10027): 1513–1530; [4] García-Compeán D. et al. *Ann Hepatol*, 2012, 11:240-248; [5] Musso G. et al. *JAMA Internal Medicine*, 2017, 177(5):633–640; [6] Petta S. et al. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103(5):1136–1144; [7] D’Souza R. et al. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(7): 1509–1515; [8] Ratziu V. et al. *J Hepatol*, 2003, 39(6):1049-55; [9] Harrison S. A. *J Clin Gastroenterol*, 2006, 40(1):68–76; [10] Li X. et al. *BioMed Res Int*, 2019:5308308; [11] Trombetta M. et al. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2005, 22(2):24-27; [12] Friedman S.L. *Toxicology*, 2008, 254(3):120–129; [13] Mallat A., Lotersztajn S. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305:C789–C799; [14] Iredale J.P. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1832(7):876–883; [15] Mormone E. et al. *Chemico-biological interactions*, 2011, 193(3):225-231; [16] Pitera Di Clima F.P., Nicoletti M., Gemmoterapia – Fondamenti scientifici della moderna meristemoterapia, Ed. Nova Ipsa, Ed.2, 2016-2018, ISBN 978-88-7676-693-0; [17] D. Surcel, S. Soescu, N. Olah, M. Ciumașu-Rimbu, Acta gemmotherapeutica, vol. 1, Editura Napoca Star, Cluj-Napoca, 2012, ISBN: 978-973-647-880-2, 16/286 pg; [18] Crews C. et al. *J Agric Food Chem*, 2005, 53:4843-4852; [19] Alasalvar C. et al. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:3790-3796; [20] Amaral J.S. et al. *J Agric Food Chem*, 2006, 54:449-456; [21] Salehi M. et al. New synergistic co-culture of *Corylus avellana* cells and *Epicoccum nigrum* for paclitaxel production. *Journal of Industrial microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(5):613-623; [22] Bemani E. et al. *Journal of Natural Medicine*, 2013, 67(3):446-451; [23] Alberti A. et al. *Natural Product Communications*, 2016, 11(4):469-474; [24] Oliveira I. et al. *Food Chemistry*, 2007, 105(3):1018-1025; [25] Reithmuller E. et al. *Nat Prod Commun*, 2016, 11(5):641-644; [26] Durak I. et al. *Clin Chim Acta*, 1999, 284:113-115; [27] Shin E.K. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, 381:502–507; [28] Khan M.S. et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2011, 251:85–94; [29] Anghel N. et al. *Histology and Histopathology*, 2015, 30(12):1465-1475; [30] Pushpavalli G. et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010,

63



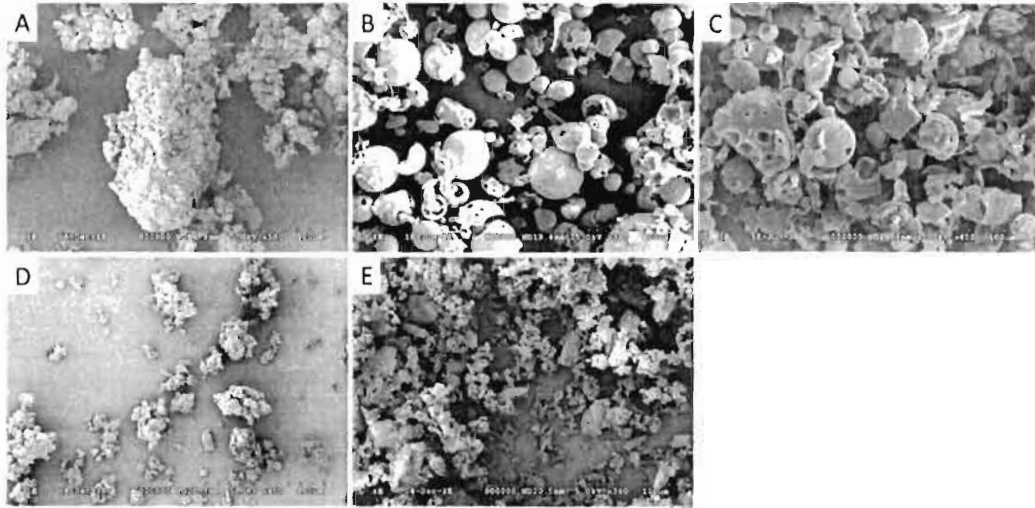
REVENDICĂRI

1. Procedeu de obținere a unei noi compoziții fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele faze:
 - a. Obținerea extractului gemoterapic de *Corylus avellana* include recoltarea și conservarea materialului vegetal, obținerea maceratului glicerinic
 - b. Obținerea și caracterizarea nanocomplexelor de crisină/ciclodextrine include prepararea compexelor crisină/ciclodextrine și testul de solubilitate
 - c. Obținerea compoziției fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine și evaluarea profilului fitochimic al acestuia prin analiză LC/MS pentru determinarea profilului polifenolic
2. Procedeu, conform revendicării nr.1, **caracterizat prin aceea că** solubilitatea crisei în apă prin complexarea cu ciclodextrine, la un raport molar de 1:1, a crescut de 7,41 ori în cazul complexelor crisină/RAMEB, respectiv de 5,22 în cazul complexelor crisină/HPBCD
3. Procedeu, conform revendicării nr.1, **caracterizat prin aceea că** preparatul gemoterapic de *Corylus avellana* se obține folosind ca și solvent amestec de glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1) din muguri de alun în stare proaspătă. Extracția se realizează la rece, prin macerare, timp de 20 zile, la un raport de 1:20 planta-solvent.
4. Procedeu, conform revendicării nr.1, **caracterizat prin aceea că** noua compoziție fitoterapeutică pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine obținut prin liofilizare se analizează în ceea ce privește conținutul chimic cantitativ de polifenoli prin analiză LC/MS, rezultând un conținut de crisină de $5,830 \pm 0,0942$ pentru compoziția cu crisină/RAMEB, respectiv $5,948 \pm 0,2796$ pentru compoziția cu crisină/HPBCD, comparativ cu $0,100 \pm 0,004$ în extractul gemoterapic de *Corylus avellana*
5. Procedeu de testare *in vitro* a activității anti-fibrotice a noii compoziții fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine pe celule hepatice stelate (HSC) din linia celulară LX2, **caracterizat prin aceea că** expresia genică și proteică a markerului pro-fibrotic TGF- β 1 a fost statistic semnificativ redusă față de controlul activat, cu un nivel de semnificație statistică mai mare în cazul complexului cu RAMEB ($p < 0.01$) față de HPBCD ($p < 0.05$).
6. Procedeu de testare *in vitro* a activității anti-fibrotice a noii compoziții fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, **caracterizat prin aceea că** aspectul histologic al ficatului la șoarecii cu fibroză hepatică indusă experimental (septe fibroas si pseudolobuli, „hepatocitelor spumoase” foamy perivenulare hipertrofiate cu acumulare masivă de grăsime microveziculară), a fost semnificativ îmbunătățit după tratamentul oral cu compoziții fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine

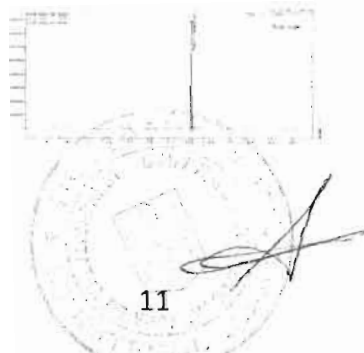
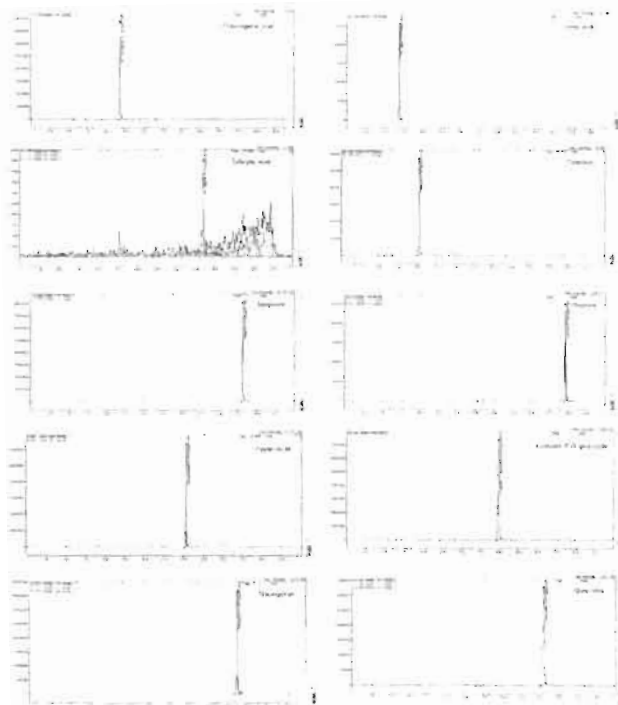


DESENE EXPLICATIVE/ PLANSE

Plansa 1. Imagini SEM – Crisina pura (A), HPBCD (B), RAMEB (C), complex crisina-HPBCD (D) si complex crisina-RAMEB (E)

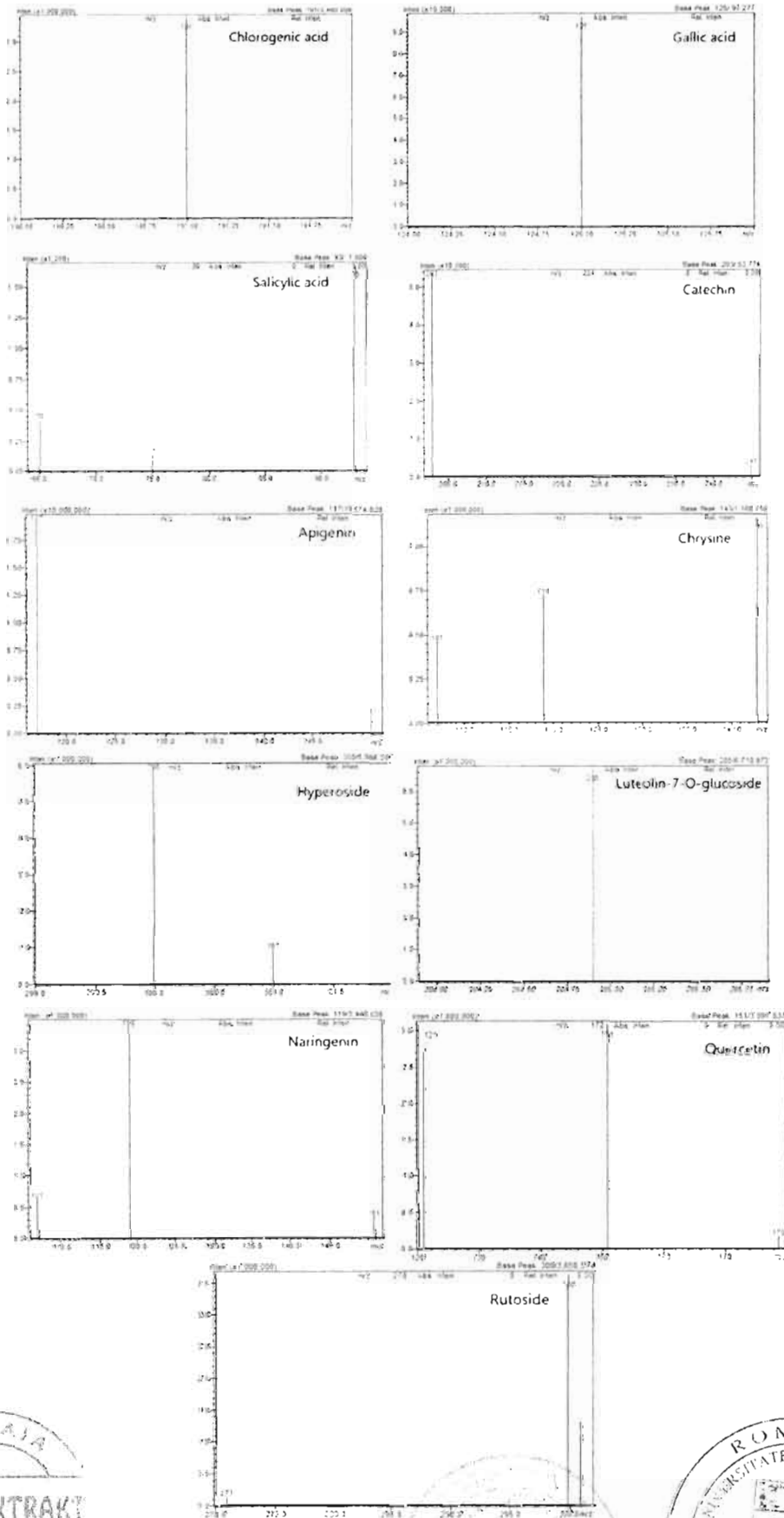


Plansa 2. Cromatogramele LC/MS ale standardelor



88

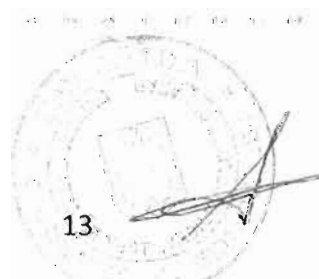
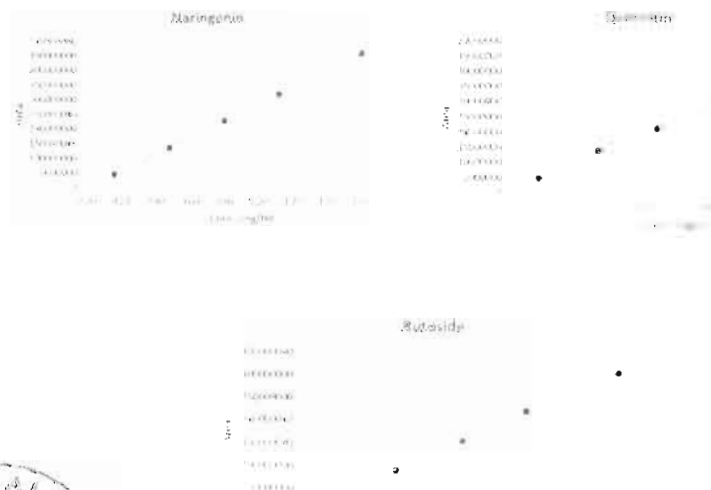
Plansa 3. Spectrele de masă ale standardelor



Plansa 4a. Curbele de calibrare ale substanțelor standard

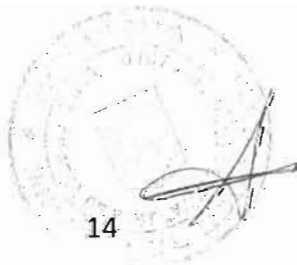
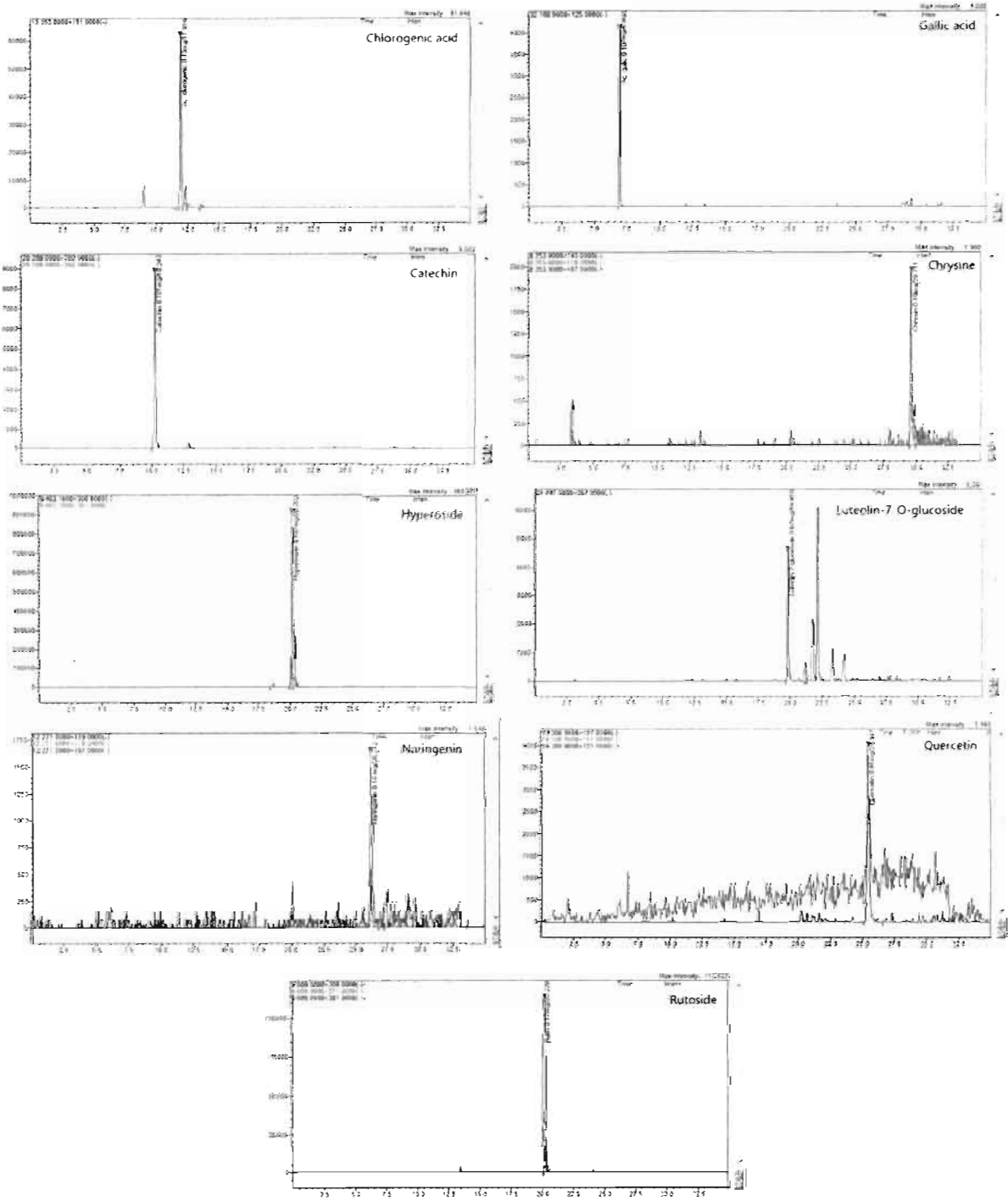


Plansa 4b. Curbele de calibrare ale substanțelor standard

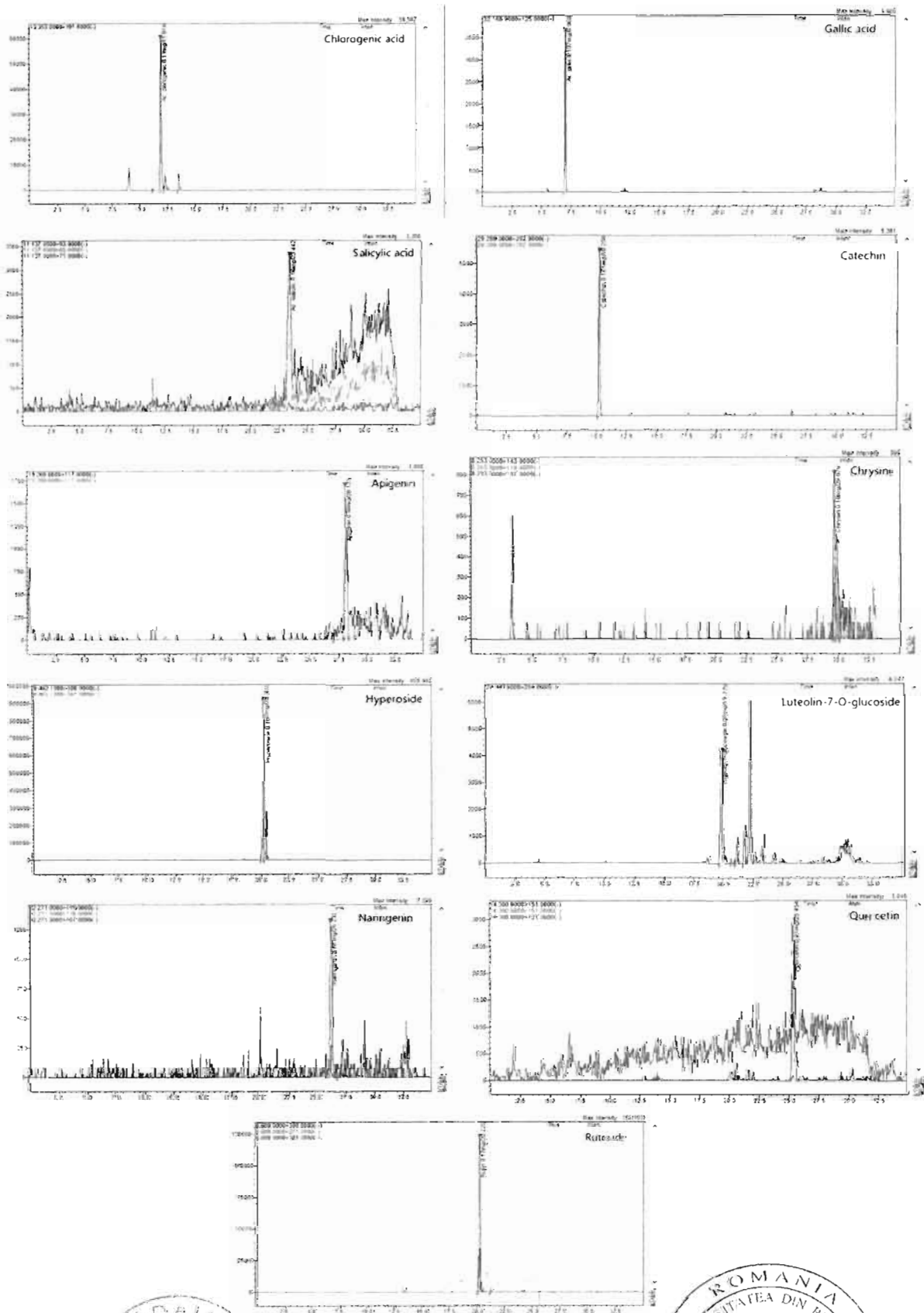


86-

Plansa 5. Cromatogramele LC/MS ale EGMA_02.2019



Plansa 6. Cromatogramele LC/MS ale EGMA_03.2019

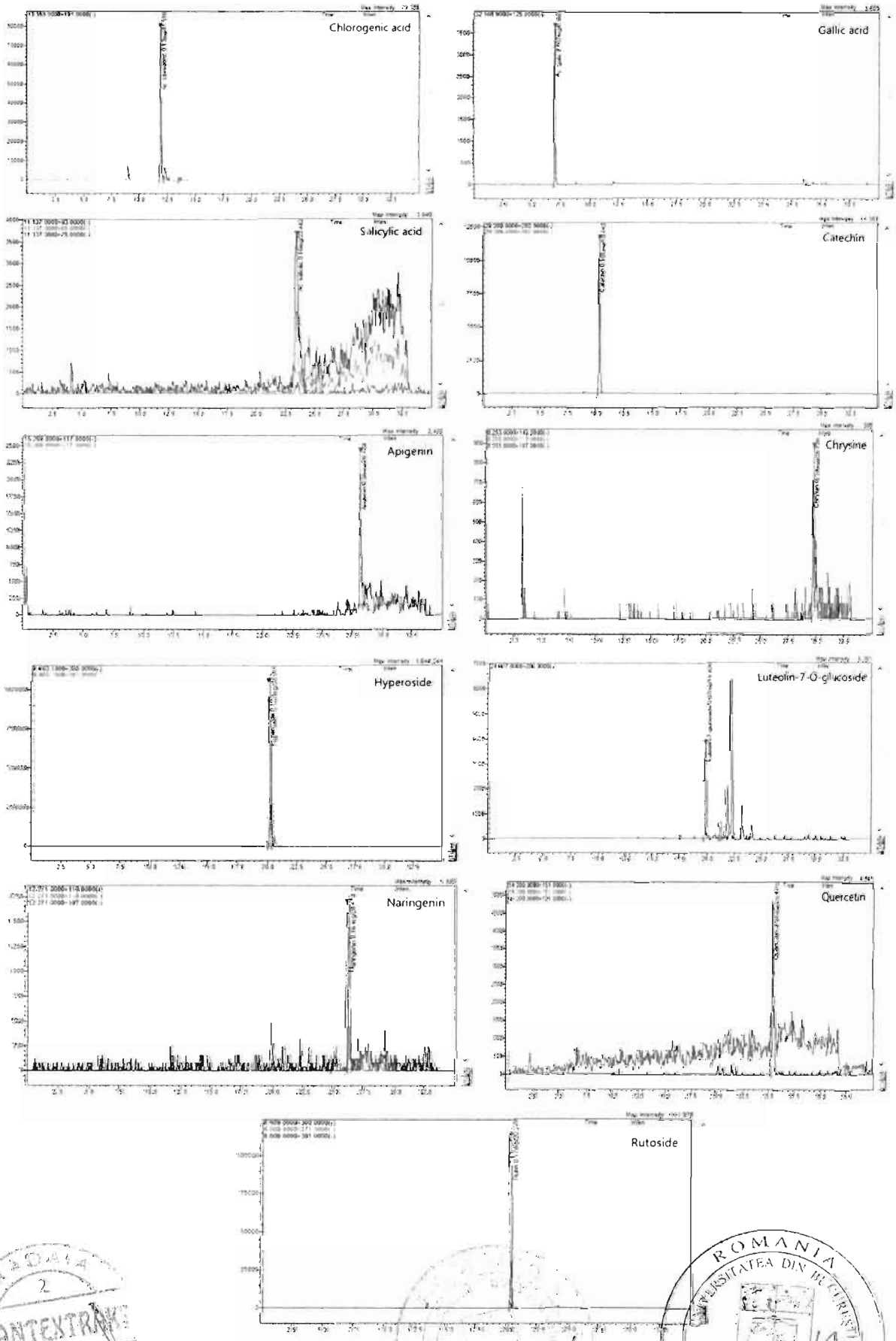


15

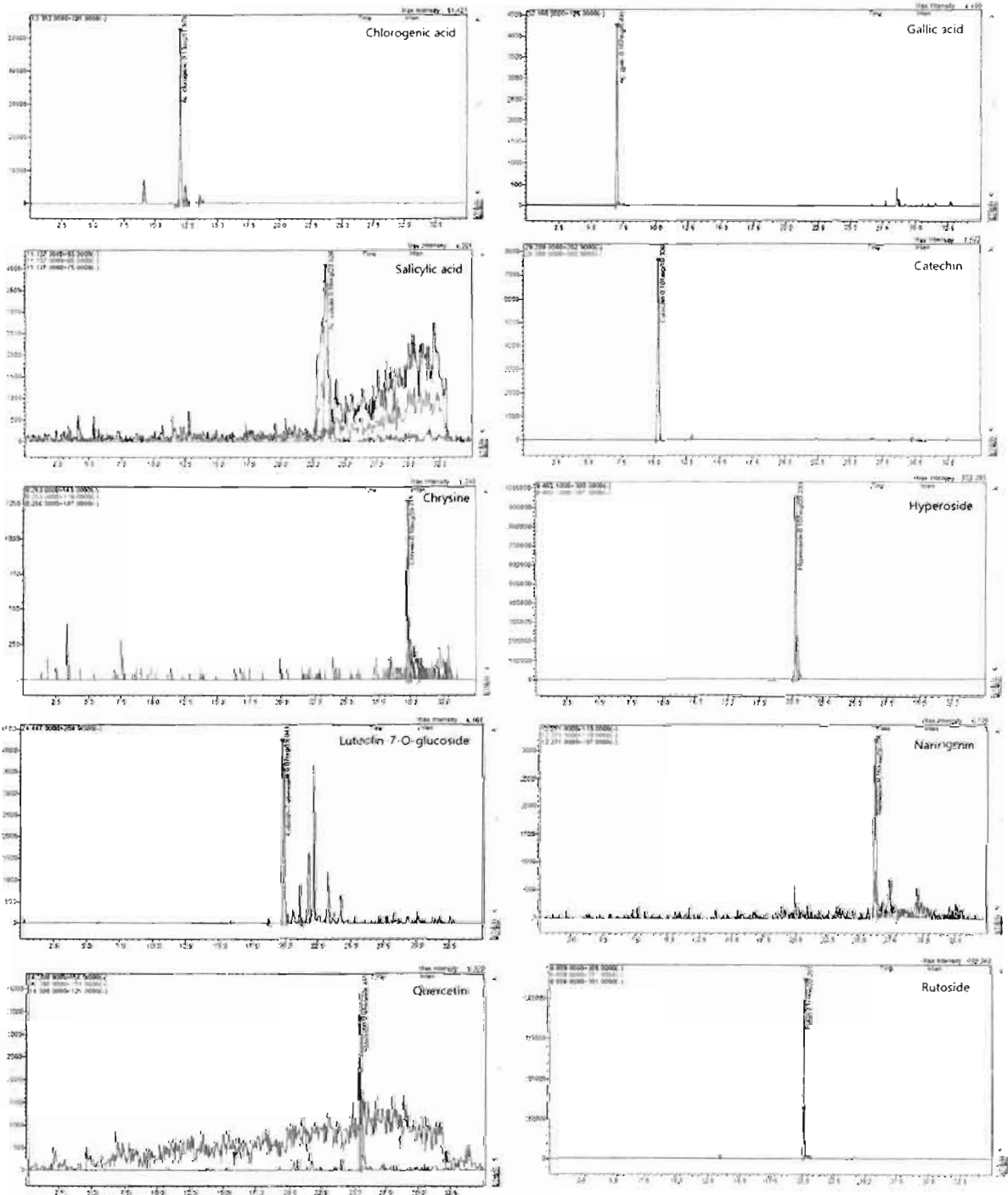


85

Plansa 7. Cromatogramele LC/MS ale EGMA_01.2020

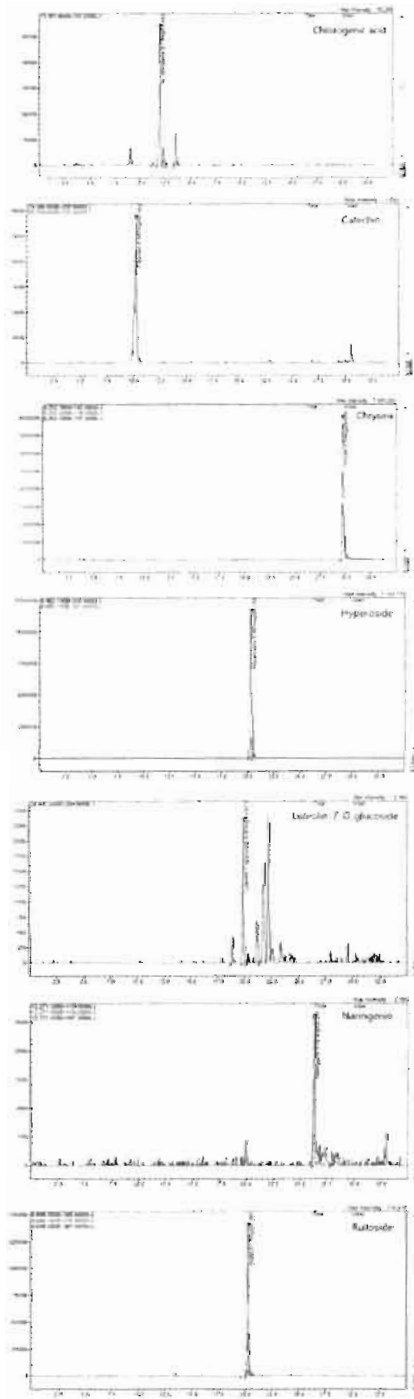


Plansa 8. Cromatogramele LC/MS ale EGMA_02.2020



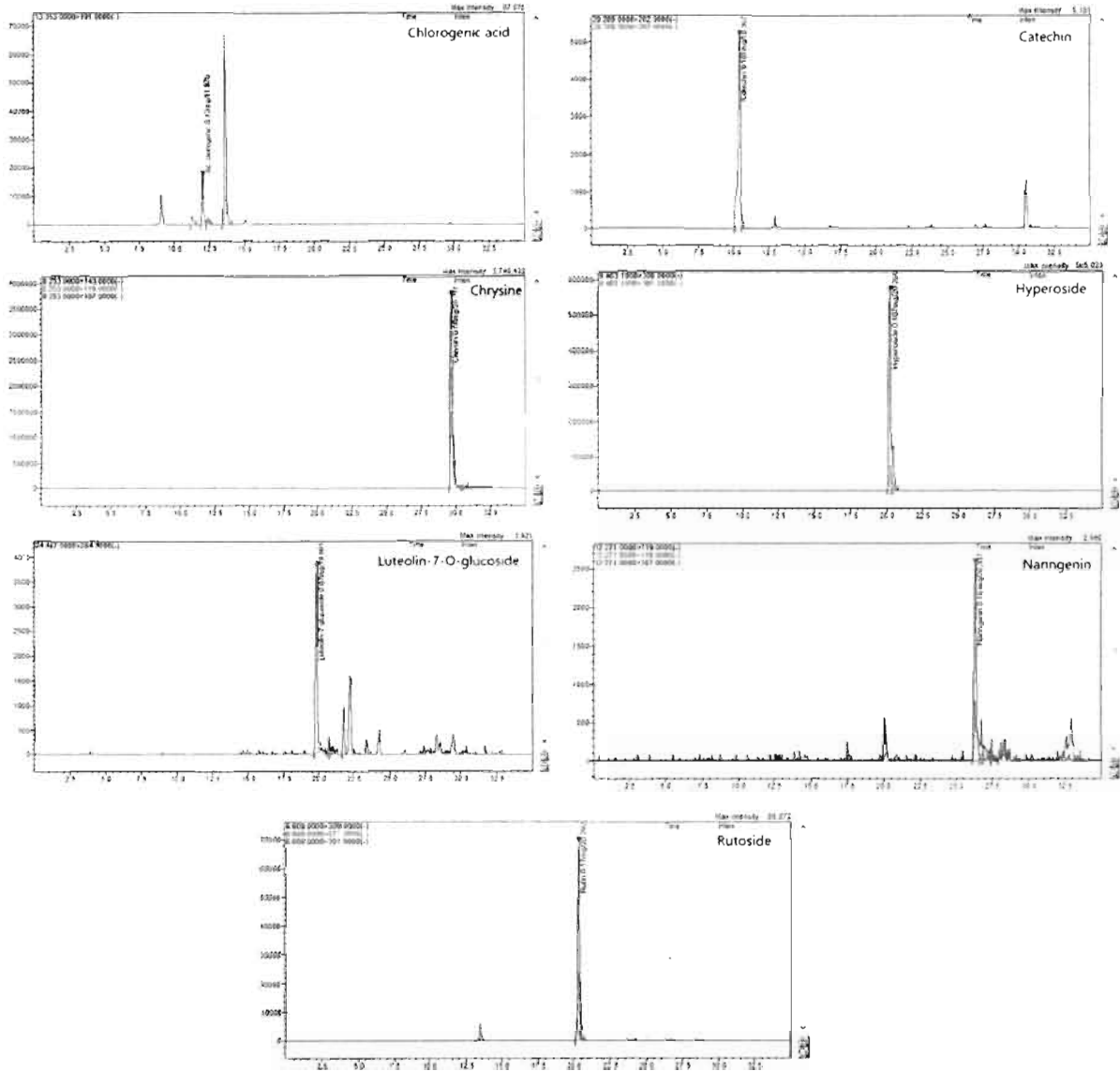
82-

Plansa 9. Cromatogramele LC/MS ale CA_RAMEB_CHR_PEG



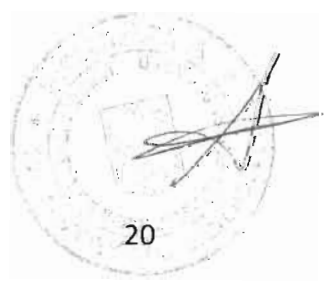
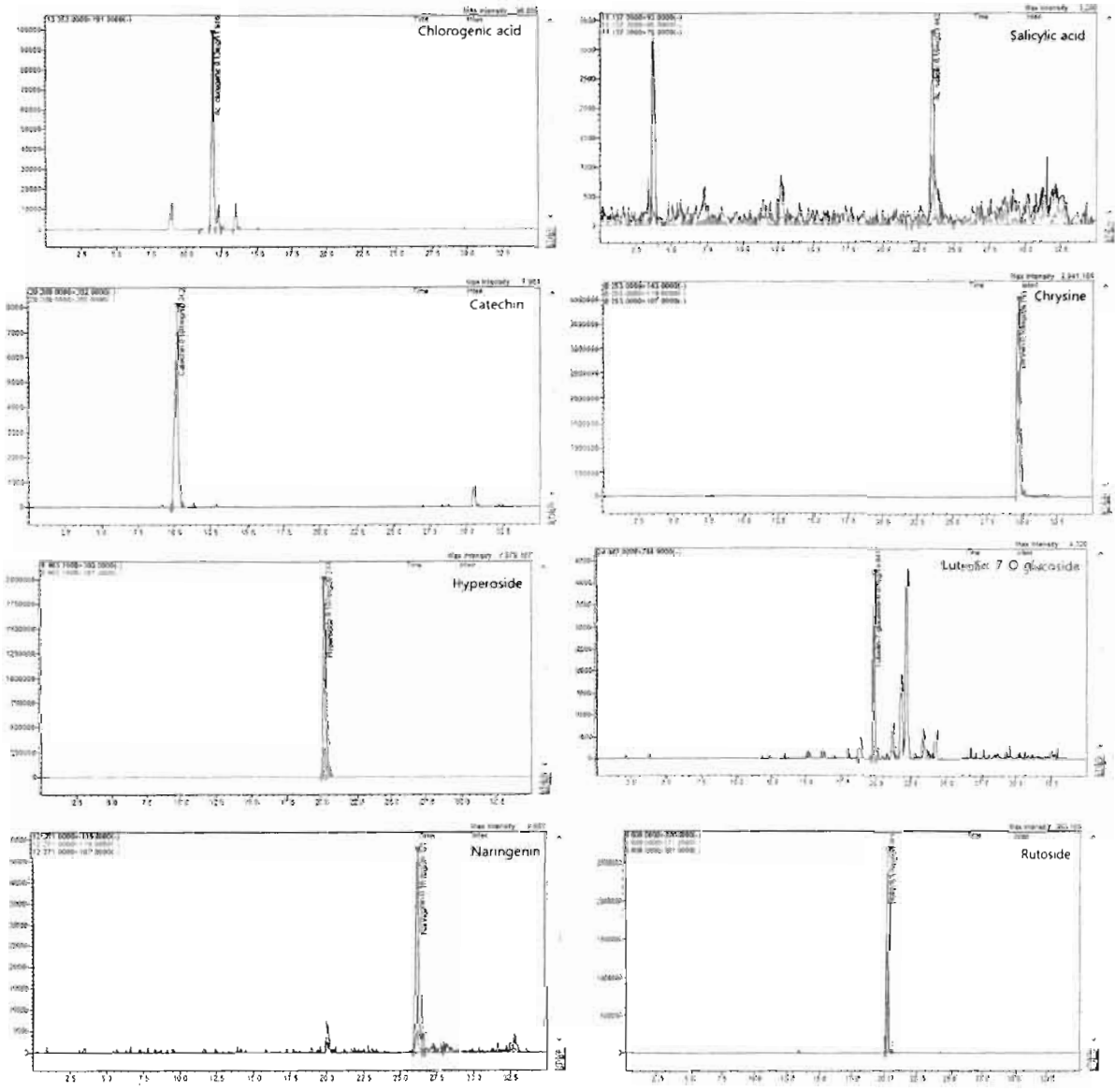
81

Plansa 10. Cromatogramele LC/MS ale CA_HPBCD_CHR_PEG



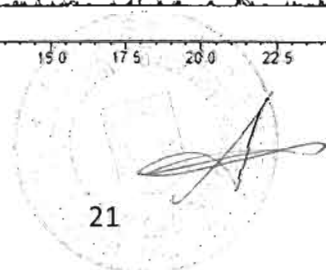
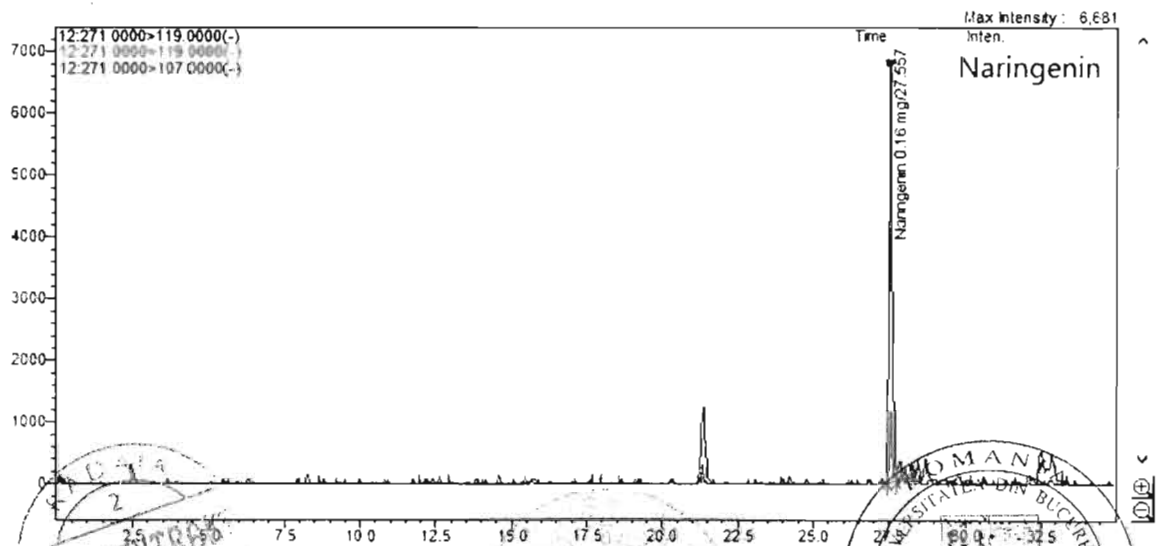
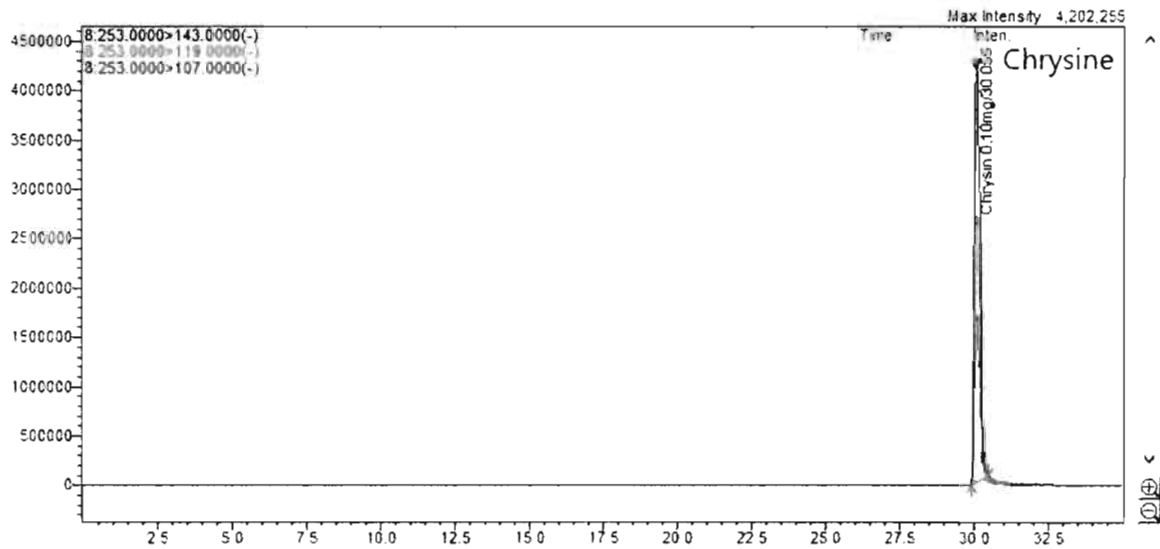
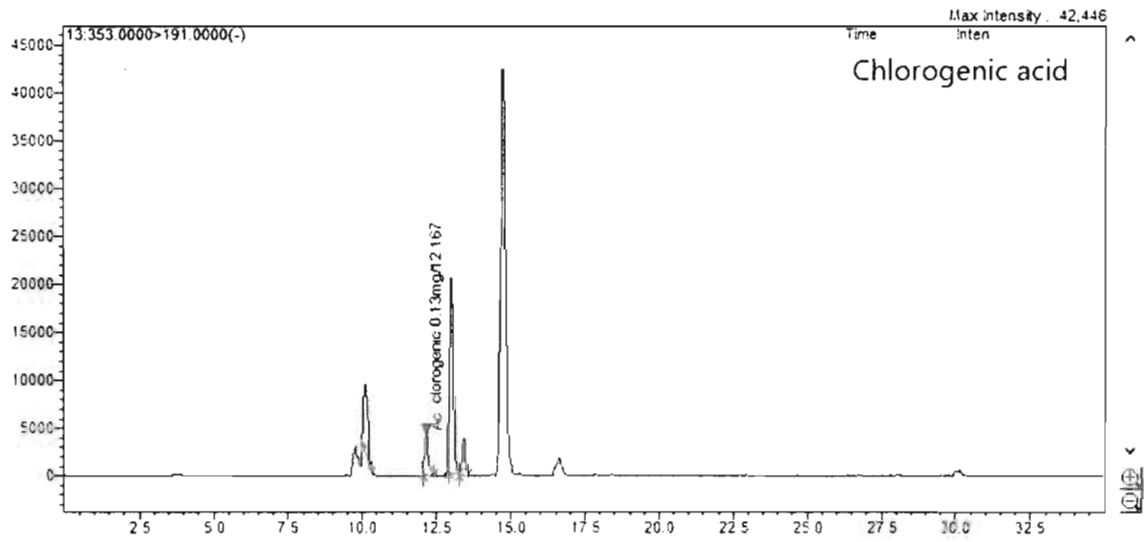
80

Plansa 11. Cromatogramele LC/MS ale CA_RAMEB_CHR



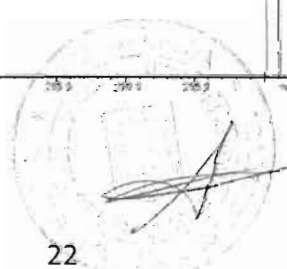
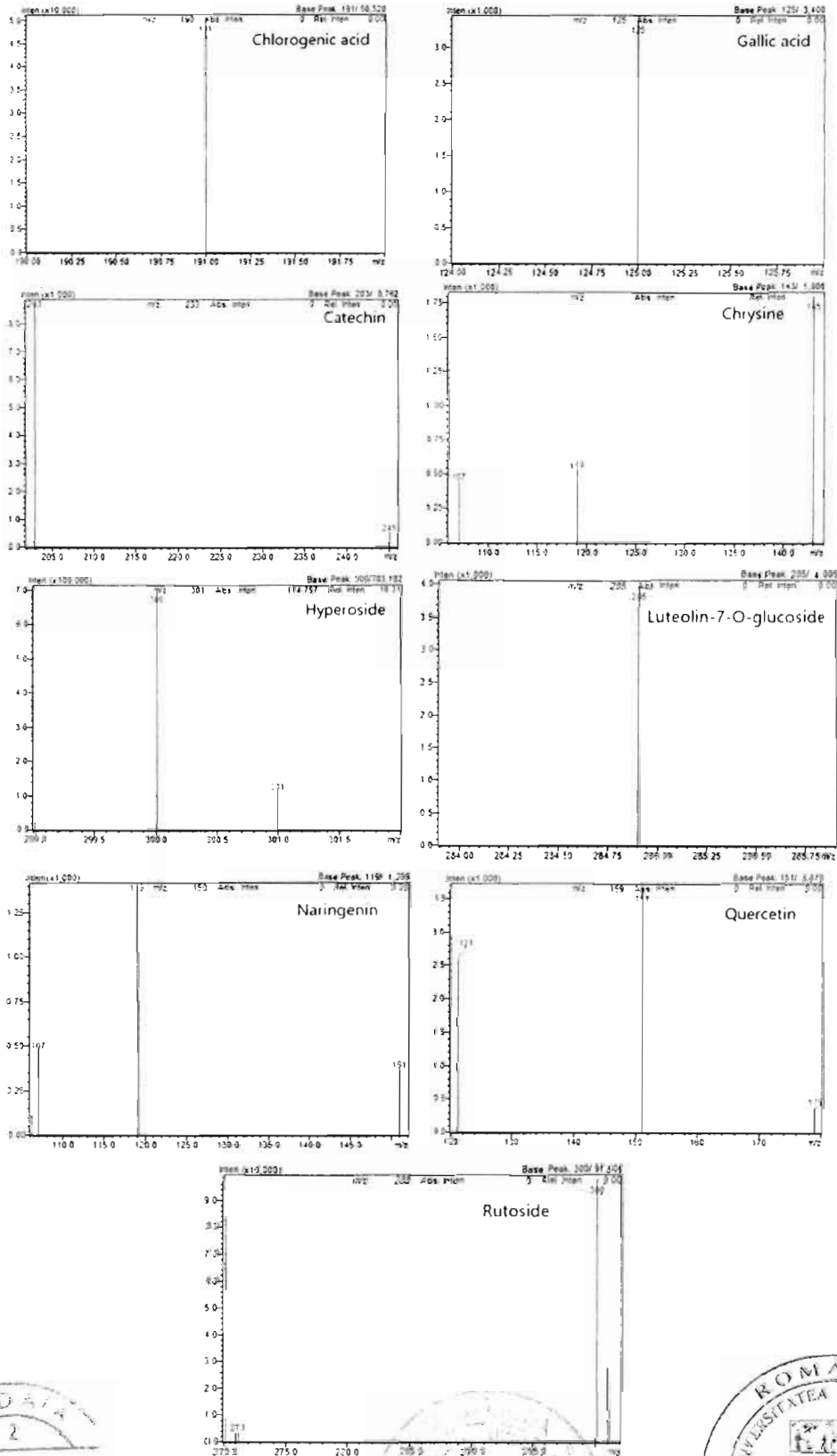
79

Plansa 12. Cromatogramele LC/MS ale CA_HPBCD_CHR



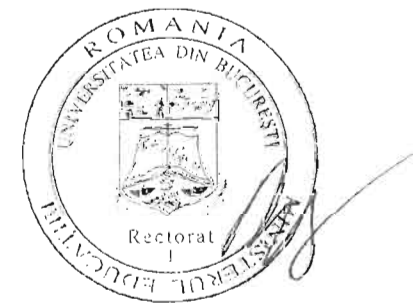
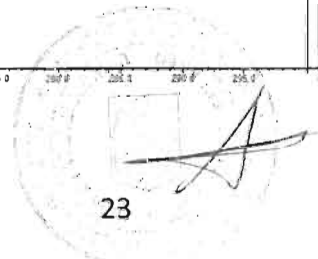
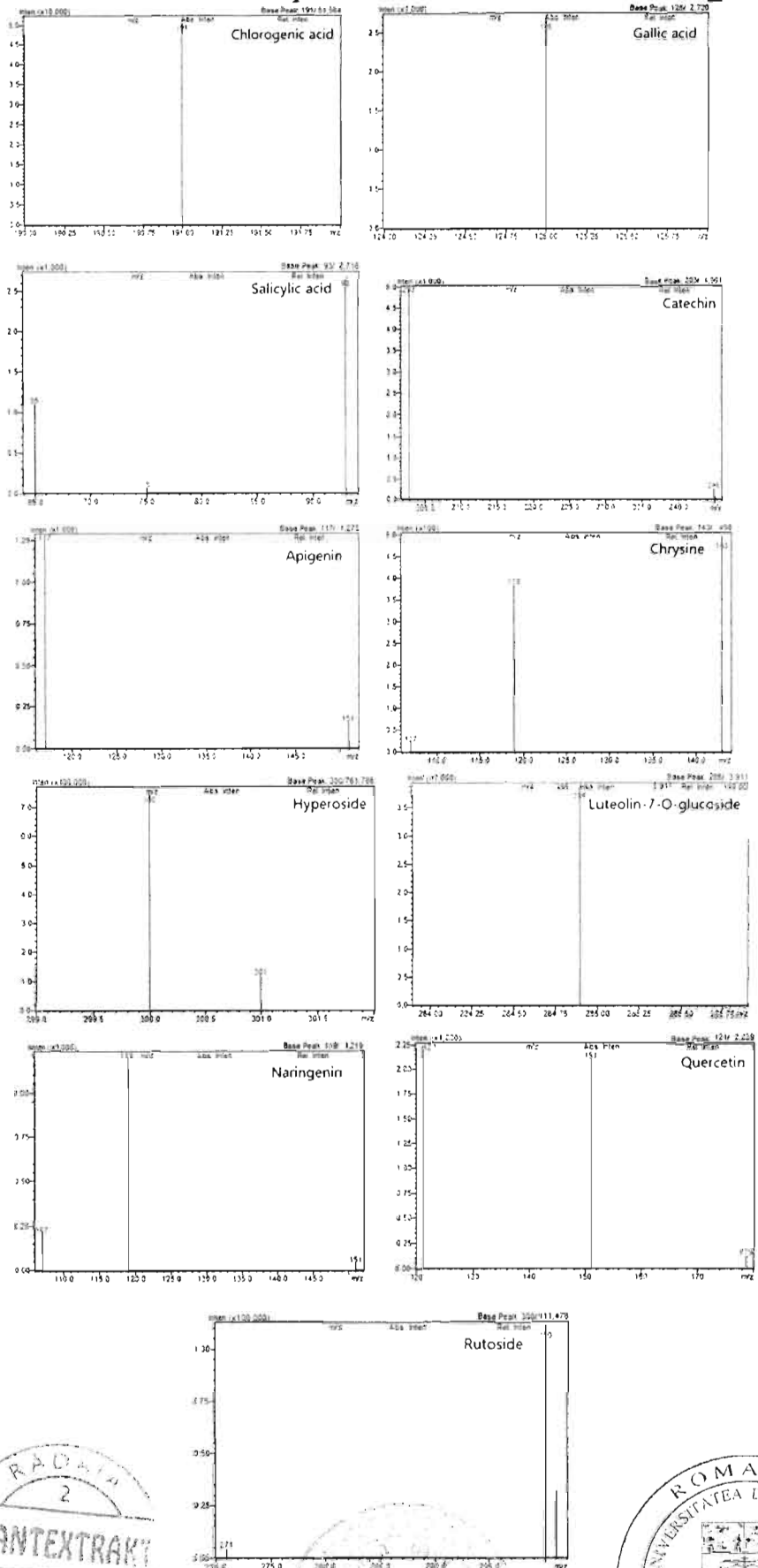
78

Plansa 13. Spectrele de masă ale componentelor identificate din EGMA_02.2019



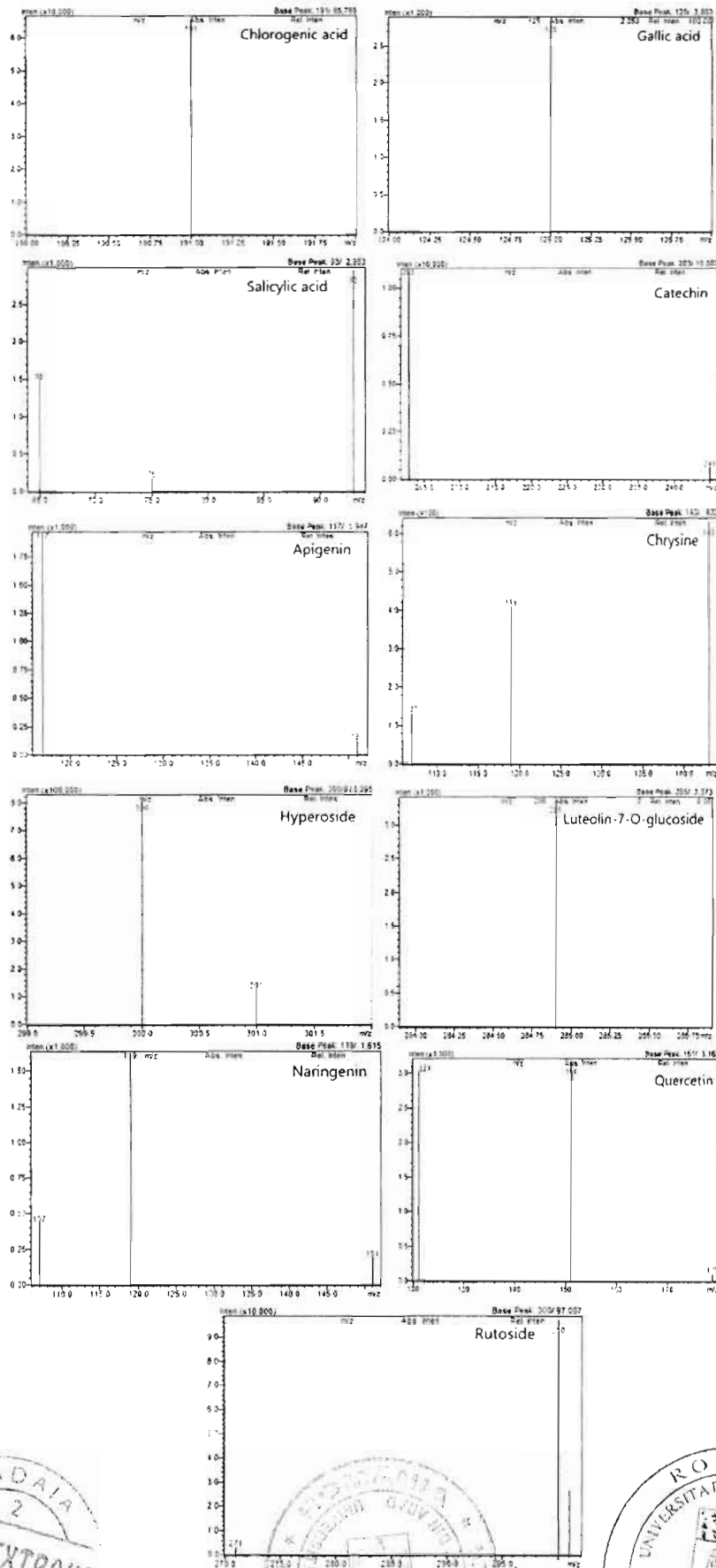
77.

Plansa 14. Spectrele de masă ale componentelor identificate din EGMA_03.2019



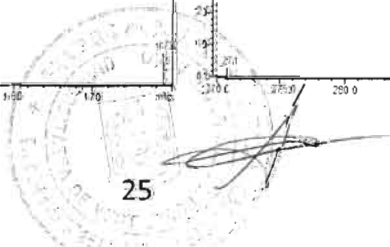
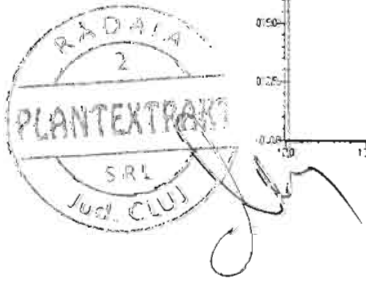
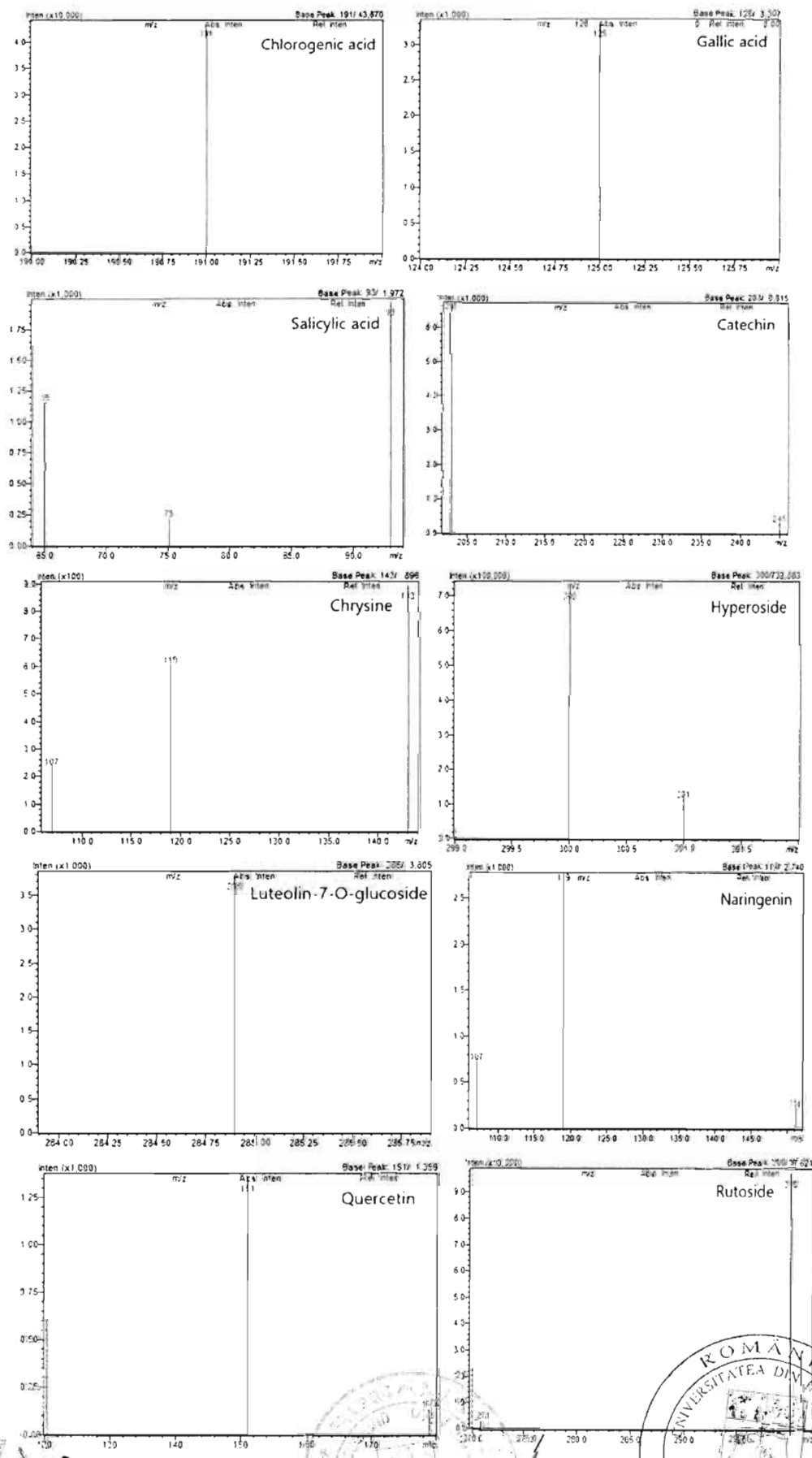
76

Plansa 15. Spectrele de masă ale componentelor identificate din EGMA_01.2020



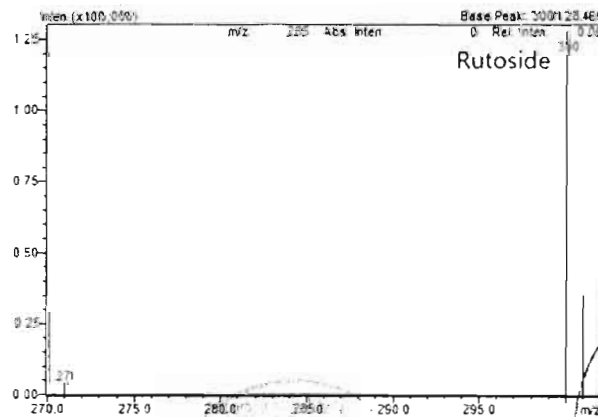
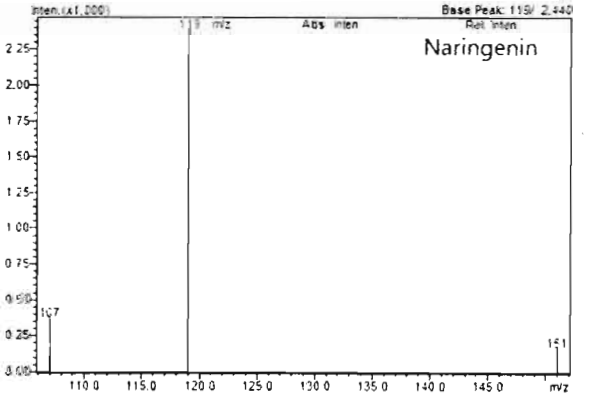
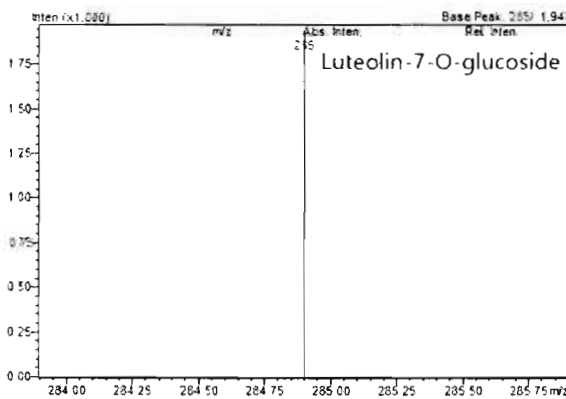
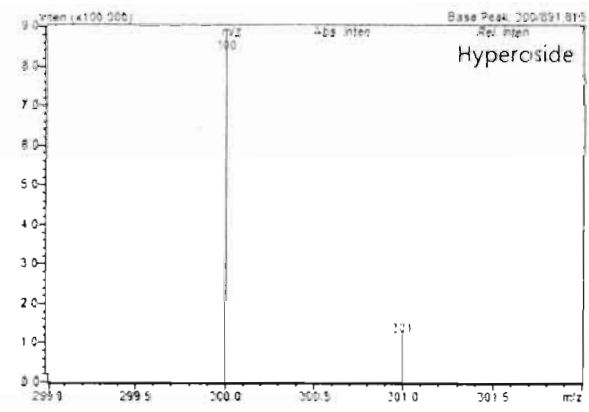
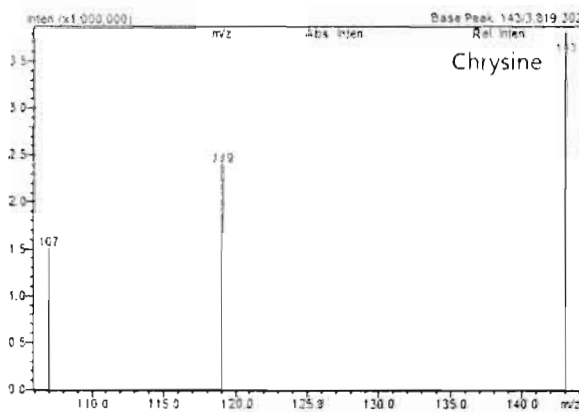
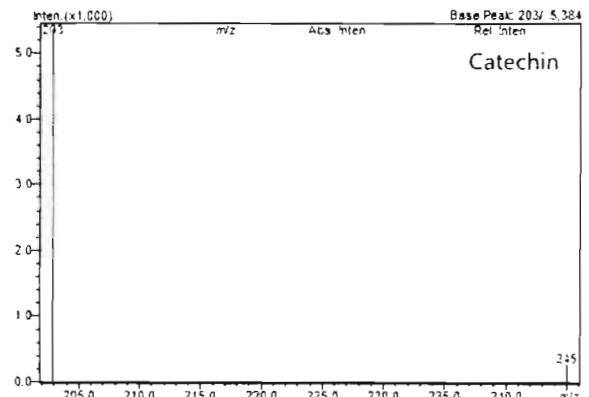
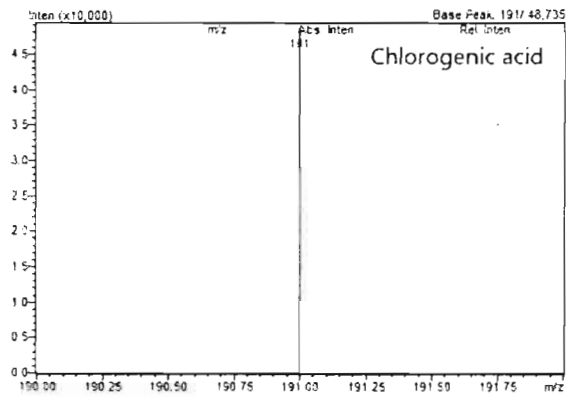
75

Plansa 16. Spectrele de masă ale componentelor identificate din EGMA_02.2020



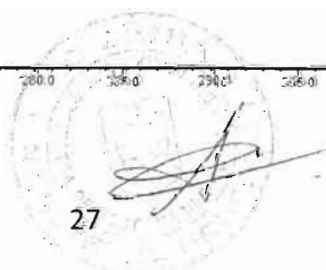
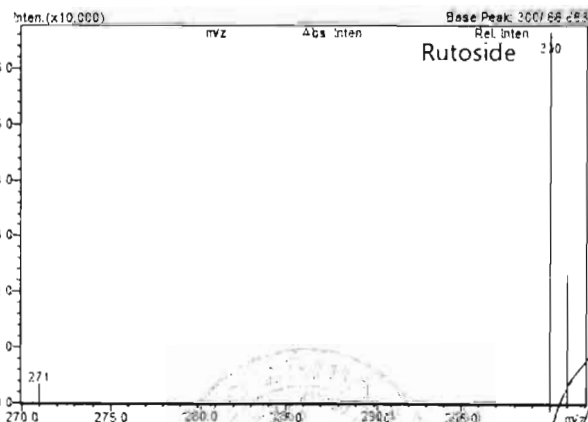
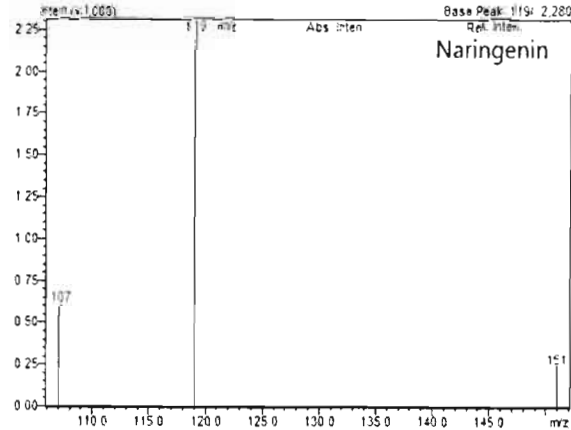
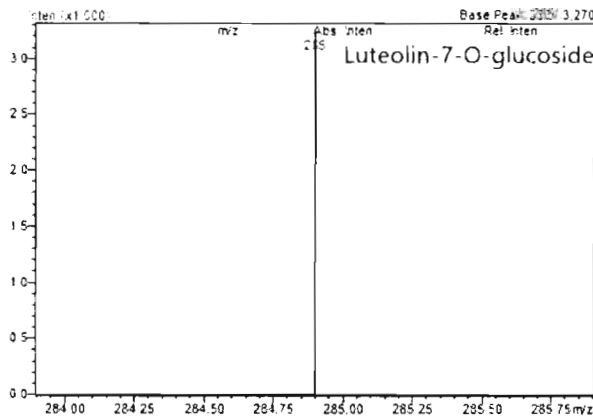
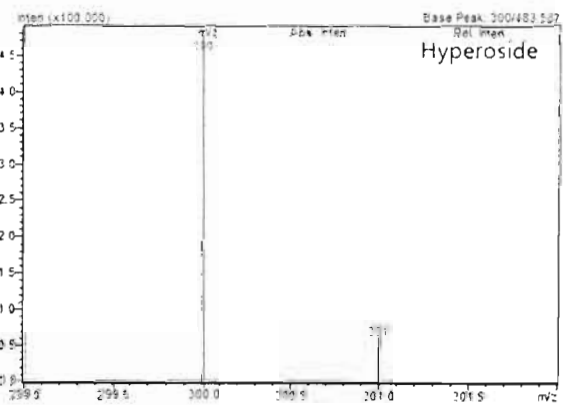
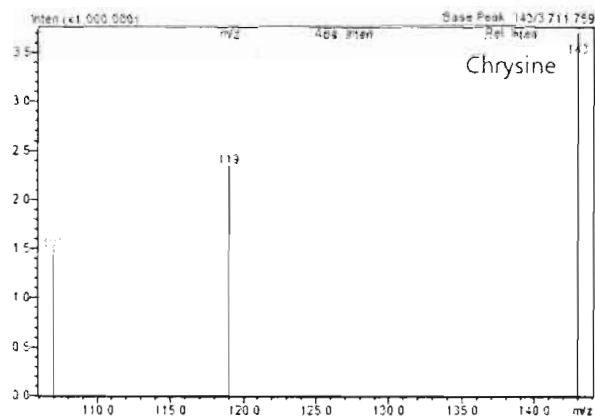
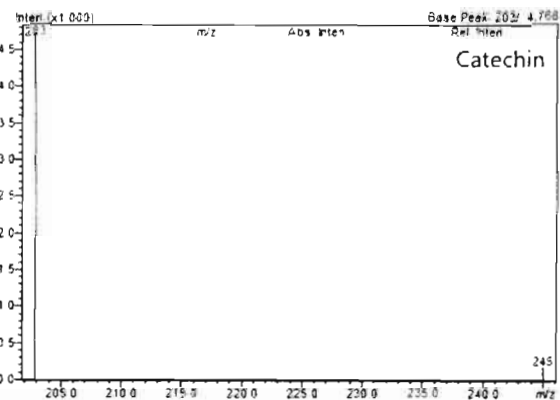
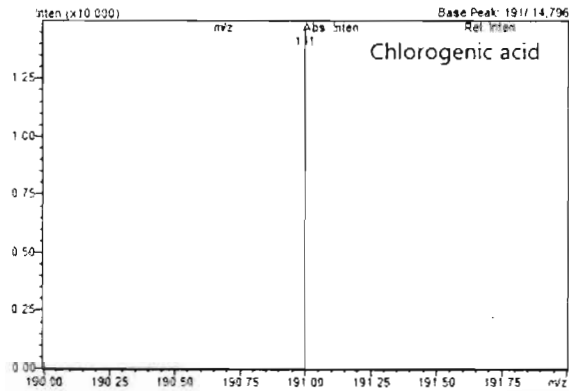
74

Plansa 17. Spectrele de masă ale componentelor identificate din CA_RAMEB_CHR_PEG



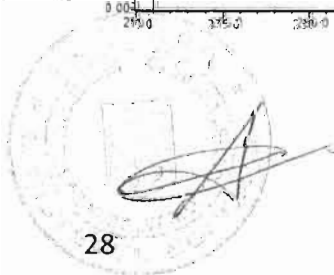
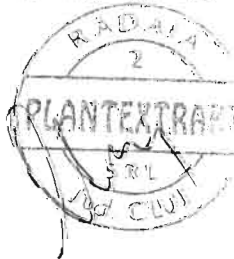
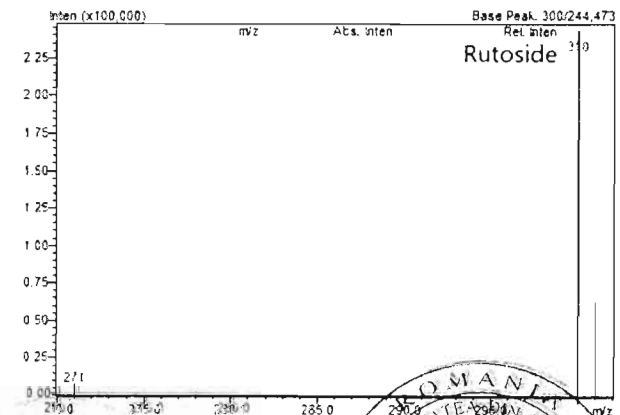
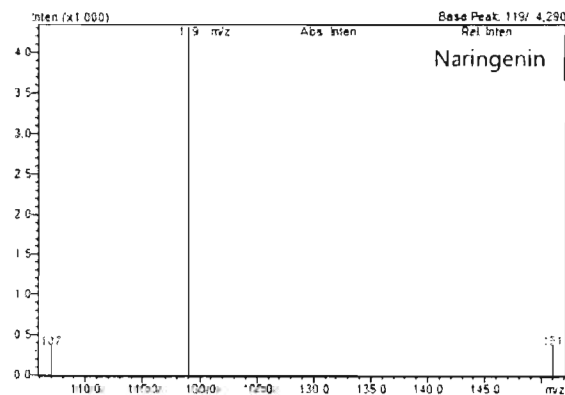
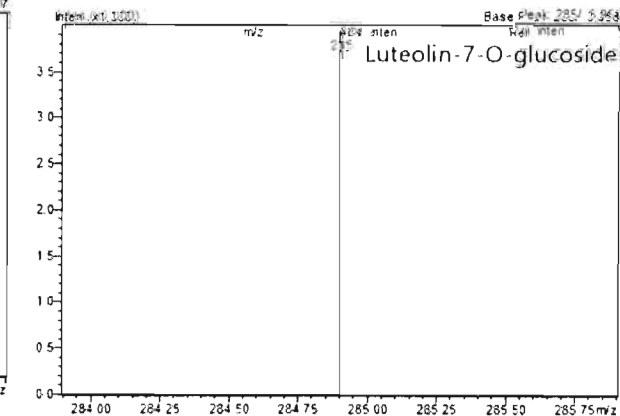
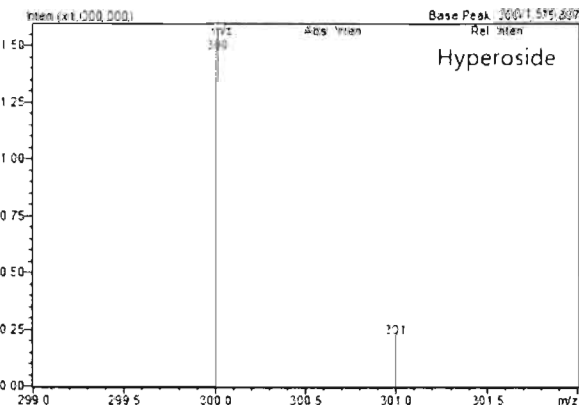
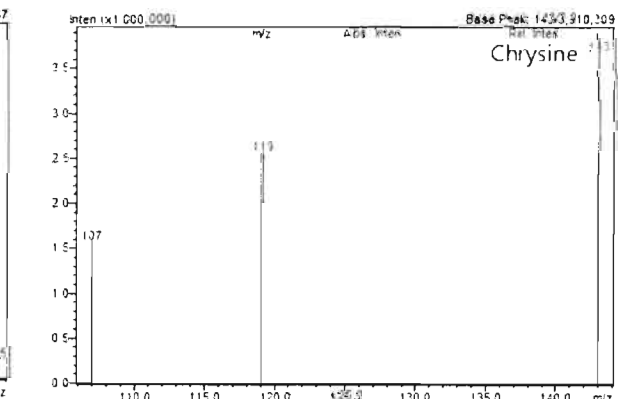
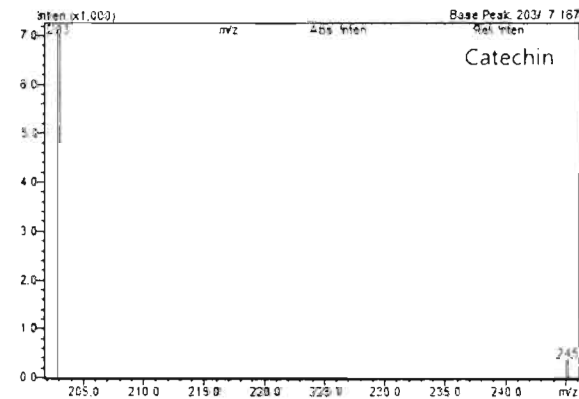
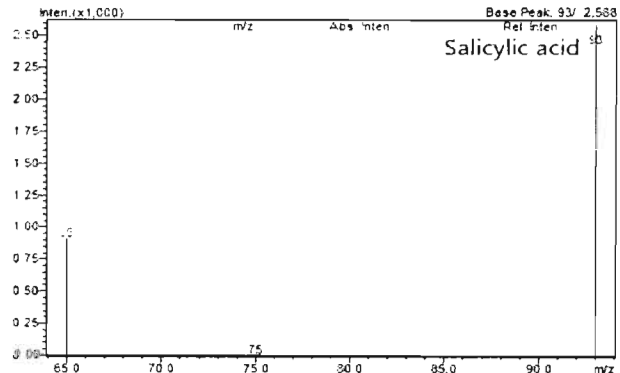
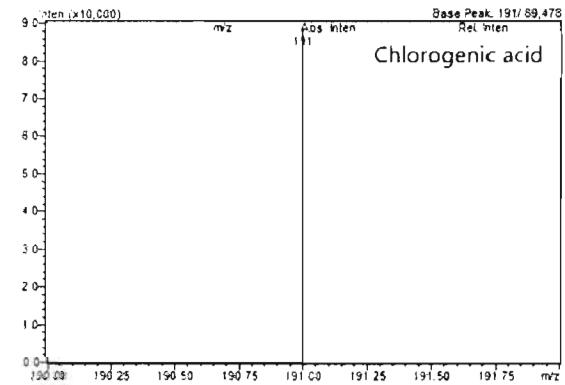
73

Plansa 18. Spectrele de masă ale componentelor identificate din CA_HPBCD_CHR_PEG



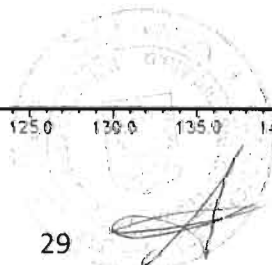
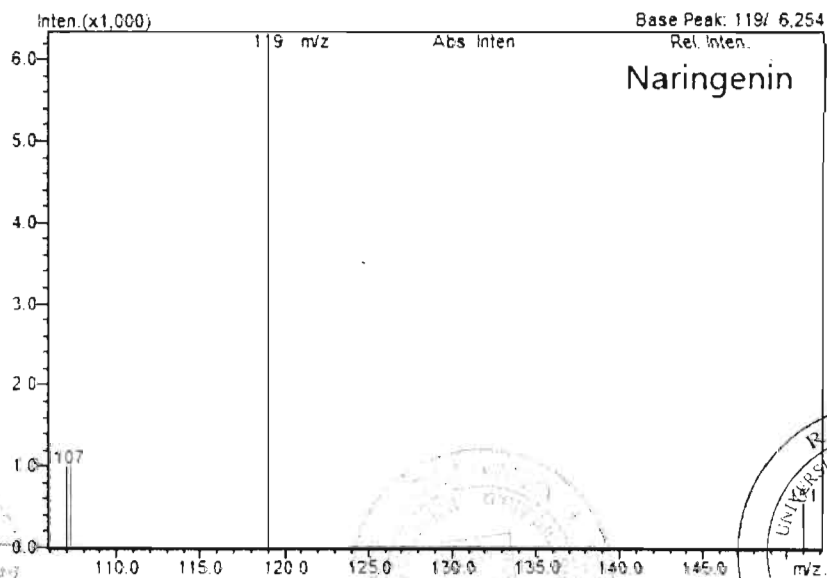
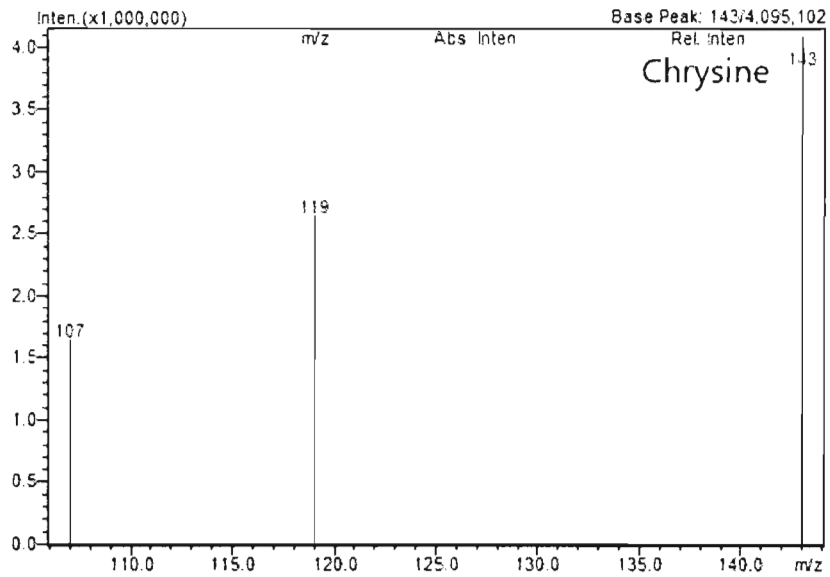
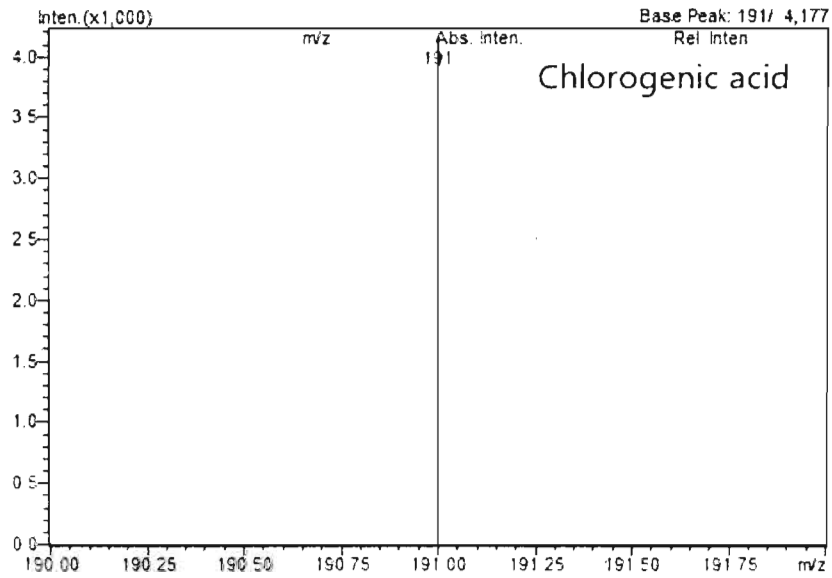
72

Plansa 19. Spectrele de masă ale componentelor identificate din CA_RAMEB_CHR



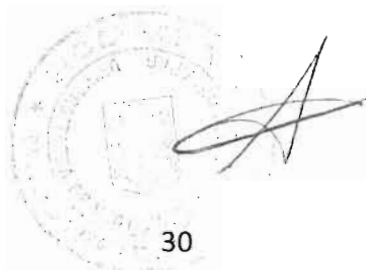
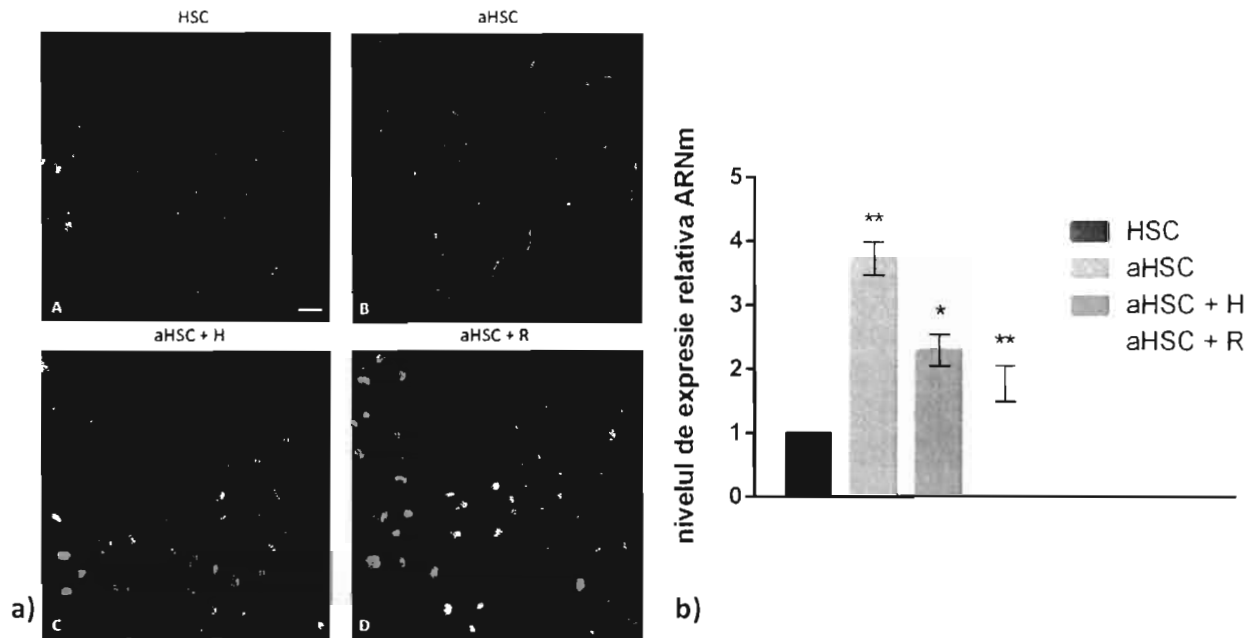
79

Plansa 20. Spectrele de masă ale componentelor identificate din CA_HPBCD_CHR

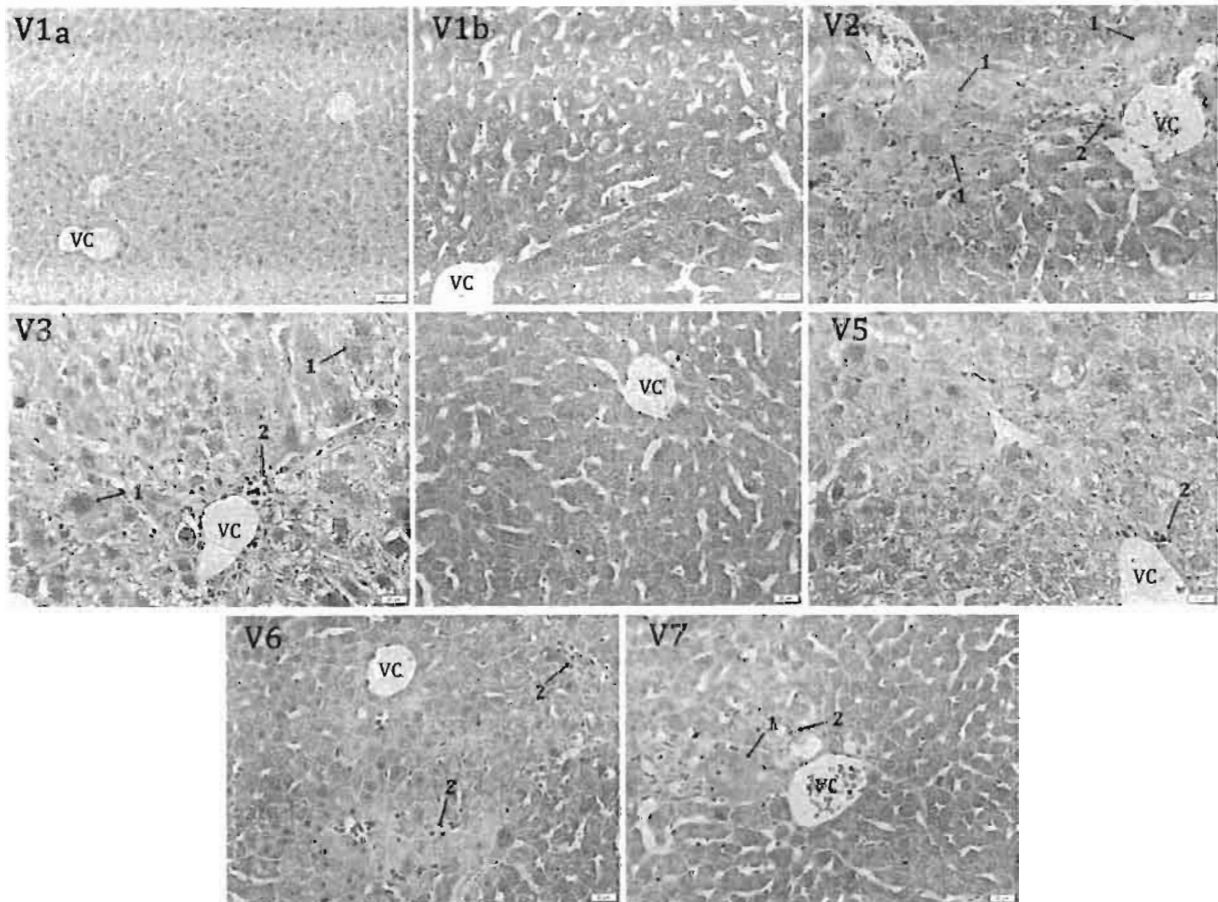


701

Plansa 21. Imagini de microscopie de fluorescență obținute cu obiectivul de 20x care evidențiază prezența TGF- β 1 marcată cu anticorp cuplat cu Alexa Fluor 488 (verde) și nucleii cu DAPI (albastru) în: A) HSC – celule hepatice stelate latente; B) aHSC – celule hepatice stelate activate induse cu TGF- β 1; C) aHSC + H – celule hepatice stelate activate tratate cu complexul CAG-CHR/HPBCD 40 μ M; D) aHSC + R – celule hepatice stelate activate tratate cu complexul CAG-CHR/RAMEB 40 μ M. Bară 50 μ m; b) Nivelul expresiei relative a *tgf- β 1* în HSC. Semnificație statistică: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



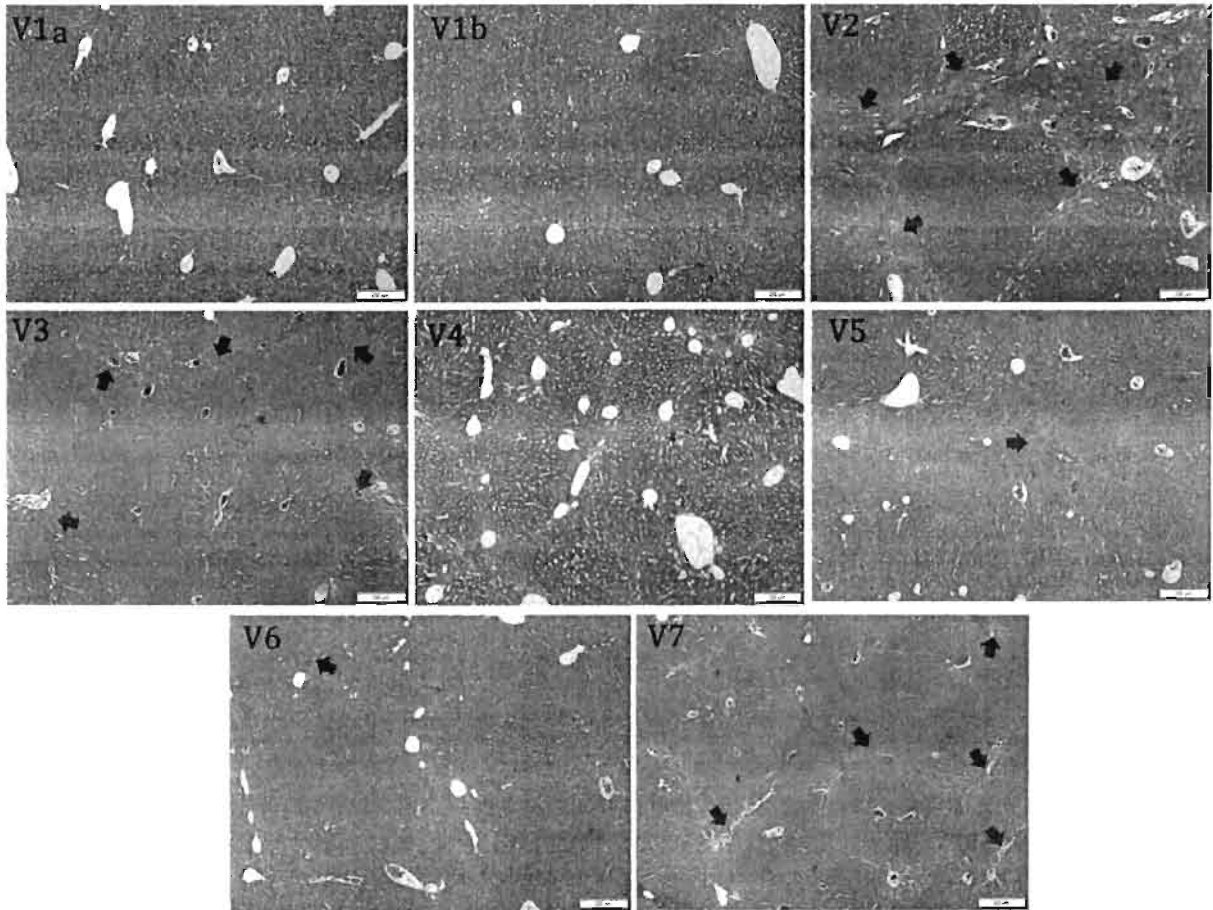
Plansa 22. Evaluarea histologică a activitatii anti-fibrotice in vivo a compoziției fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine



Legenda: V1a- control sanatos; V1b-control diabetic; V2-fibroza; V3-reversia fibrozei; V4-CAG-CHR/Cyclo; V5- CAG; V6- CHR/Cyclo; V7- CHR; 1 – hepatocite spumoase hipertrofiate; 2 – infiltrat inflamator; VC- vena centrolobulară. Col.H&E, 20 μm



Plansa 23. Evidențierea proliferării de colagen la loturile experimentale în col. tricromică Van Gieson.



Legendă: V1a- control sanatos; V1b-control diabetic; V2-fibroza; V3-reversia fibrozei; V4-CAG-CHR/Cyclo; V5- CAG; V6- CHR/Cyclo; V7- CHR; 1 – hepatocite spumoase hipertrofiate; 2 – infiltrat inflamator; VC- vena centrolobulară. 200 μm

