

**CONTRIBUȚII LA CERCETAREA
UNOR GEMODERIVATE UTILIZATE
ÎN FITOTERAPIA AFECȚIUNILOR RESPIRATORII**

REZUMAT TEZA

CUPRINS

PARTE GENERALĂ	1
Criterii care au stat la baza alegerii temei de cercetare.....	1
1.1. Frecvența crescută a afecțiunilor respiratorii.....	1
1.2. Utilizarea gemoterapicelor în practica medicală.....	2
1.3. Lipsa unor cercetări științifice a gemoterapicelor.....	3
1.4. Stadiul cunoașterii temei abordate pe plan internațional și național a cercetării în domeniu	3
2. Obiectivele cercetării.....	3
2. OBȚINEREA GEMOTERAPICELOR CERCETATE	4
2.1. Obținerea gemoterapicelor folosite în cercetarea clinică (procedeu PlantExtract).....	4
2.2. Produsele vegetale utilizate la obținerea unor gemoderivate folosite în experimentul clinic.....	5
2.2.1. <i>RIBES NIGRUM</i> L.	5
2.2.1.1. Denumiri populare	5
2.2.1.2. Compoziție chimică	5
2.2.1.3. Cercetări farmacologice anterioare.....	5
2.2.1.4. Organotropism și posologie.....	5
2.2.2. <i>ROSA CANINA</i> L.....	6
2.2.2.1. Denumiri populare	6
2.2.2.2. Compoziție chimică	6
2.2.2.3. Cercetări farmacologice anterioare.....	6
2.2.2.4. Organotropism și posologie.....	7
2.2.3. <i>BETULA PUBESCENS</i> EHRH	7
2.2.3.1. Denumire populară	7
2.2.3.2. Compoziție chimică	7
2.2.3.3. Cercetări farmacologice anterioare.....	7
2.2.3.4. Organotropism și posologie.....	8
2.3. Alte produse gemoterapice utilizate în tratament	8
2.3.1. Extract de călin (<i>Viburnum lantana</i> L.DH1)	8
2.3.2. Extract de carpen (<i>Carpinus betulus</i> L.).....	8
2.3.3. Tinctura de propolis.....	9

2.4. Alte preparate utilizate în studiul clinic.....	9
CERCETĂRI PERSONALE.....	11
3. CONTROLUL CALITĂȚII GEMOTERAPICELOR SUPUSE CERCETĂRII	11
3.1. Analiza compușilor sterolici.....	11
3.1.1. Material și metodă.....	11
3.1.2. Rezultate și discuții	12
3.1.3. Concluzii.....	12
3.2. Analiza compușilor polifenolici prin LC și MS.....	12
3.2.1. Material și metodă.....	13
3.2.2. Rezultate și discuții	14
3.2.3. Concluzii.....	14
3.3. Determinarea acțiunii antioxidante prin DPPH – <i>Ribes nigrum</i> L., <i>Rosa canina</i> L., <i>Betula pubescens</i> Ehrh., <i>Carpinus betulus</i> L., <i>Viburnum lantana</i> L. și <i>Propolis</i> tinctura	16
3.4. Activitatea antibacteriană a gemoterapicelor supuse cercetării	16
4. Experiment clinic	17
4.1. Studiu privind eficacitatea gemoterapicelor menționate în afecțiunile respiratorii.....	17
4.1.1. Justificarea și protocolul studiului	17
4.1.2. Metodologia cercetării	18
4.1.3. Rezultate și discuții	20
4.1.4. Studiu clinic cu extract de <i>Ribes nigrum</i> L. - DH1 (Plantextract Cluj-Napoca).....	20
4.1.5. Studiu clinic cu extract din mlădițe de măceș - (Rosa canina DH1) și muguri de mesteacăn pufos (<i>Betula pubescens</i> DH1)	23
4.2. Evaluări comparative ale tratamentelor efectuate pe cele două loturi martor	27
4.3. Analiza unui simptom clinic –tusea la administrarea unor gemoterapice (gemoderivate) - RN, RC.....	28
4.4. Rezultate analitice	28
4.4.1. Repartizarea pe grupă de vârstă a eșantioanelor de subiecți	29
4.4.2. Repartiția pe sexe a eșantionului de subiecți	29
4.4.3. Repartiția pe boli și grupe de vârstă a eșantionului de subiecți.....	29
4.5. Discuții integrative	32
4.6. Limitele studiului	33
5. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE	33
6. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	40

PARTE GENERALĂ

Dintre activitățile omenești, activitatea terapeutică a fost întotdeauna un subiect extrem de controversat deoarece medicina reprezintă una dintre primele expresii raționale ale luptei pentru supraviețuire.

De aceea, de-a lungul timpului s-au dezvoltat numeroase procedee terapeutice, dintre care enumerăm: fitoterapia (gemoterapia), aromaterapia, apiterapia etc. Se poate afirma că fitoterapia este contemporană cu apariția omului, resursele naturale reprezentând un vast câmp de cercetare, dar și un izvor de binefacere pentru specia umană.

Evaluarea compoziției chimice (calitative și cantitative) a fost posibilă datorită evoluției tehnologiei în domeniul aparatului de control (detectarea constituenților chimici în concentrație de 10^{-9}). Astfel s-a dezvoltat cromatografia în strat subțire, (CSS) și de lichide (HPLC = High performance liquid chromatography), cuplată sau nu cu spectrometria de masă (HPLC/MS) care au permis ulterior depistarea și cuantificarea principiilor active, precum și măsurarea unor constante biochimice umane.

Criterii care au stat la baza alegerii temei de cercetare

- 1.1. frecvența crescută a afecțiunilor respiratorii;
- 1.2. utilizarea gemoterapicelor în practica medicală;
- 1.3. lipsa unor cercetări științifice a gemoterapicelor utilizate în tratament (norme de calitate bazate pe concentrația principiilor active).
- 1.4. stadiul cunoașterii temei abordate pe plan internațional și național al cercetării în domeniu

1.1. Frecvența crescută a afecțiunilor respiratorii

Sezonul rece se caracterizează prin frecvența mare a afecțiunilor căilor respiratorii. Acestea sunt foarte sensibile la variațiile factorilor atmosferici, respectiv temperatura mediului ambiant, umiditatea, curenții de aer și poluanții, pentru a nu enumera decât câțiva dintre ei.

Potrivit datelor furnizate de Societatea română de pneumologie, în România există în jur de două milioane de pacienți diagnosticați cu astm și bronșită cronică respectiv BPOC, dar această cifră este departe de a reprezenta o număratoare finală, din cauză că majoritatea celor care au BPOC sunt fumători.

Conform reprezentanților Societății române de alergologie și imunologie clinică, 70-80 % dintre cei care suferă de alergii, prezintă și boli asociate, precum astmul bronșic. De

altfel, incidența acestor afecțiuni a crescut considerabil în ultimii ani, potrivit unui comunicat Centrofarm – (remis Ziare.com-25.febr.2009).

1.2. Utilizarea gemoterapicelor în practica medicală

a. Frecvența reacțiilor adverse ale medicației alopate

Utilizarea pe scară largă a antibioticelor în tratamentul formelor acute de boală (viroze respiratorii, rinite alergice, astm bronșic, BPOC) a dus la apariția în timp a rezistenței la antibiotice, urmarea fiind necesitatea descoperirii unor substanțe chimice mai puternice, cu apariția concomitentă a unor reacții de intoleranță a pacienților, cele mai frecvente situații observate în compartimentele UPU fiind alergodermiile și reacțiile digestive de tip: grețuri, vărsături, dureri abdominale, etc.(232, 272, 282).

b.Recomandările tip prospect ale gemoterapicelor

În ultimii ani apariția pe piață a multor preparate denumite gemoterapice, sau gemoderivate, impune o cercetare mai amănunțită a compușilor chimici activi în vederea standardizării lor, pentru a asigura calitatea și reproductibilitatea rezultatelor. Toate determinările s-au efectuat pe MG=DH1.

A. Ribes nigrumL. MG=DH 1 - antialergic și antiinflamator natural:

- *sindroame alergice*: scăderea incidenței și ameliorarea sindroamelor alergice;
- *sindroame inflamatorii*: la nivel local și general, în special cele de la nivelul articulațiilor;
- *sistem respirator*: infecții gripale acute și cronice, stări febrile, rinite.

Acțiuni stipulate în prospecte: stimulează secreția corticosteroidelor, efect cortizon-like (fără efectele secundare ale cortizonului de sinteză), stimulator al imunității (198).

B. Rosa canina L.– vitamină C naturală, antiinflamator, antialergic, vitaminizant

Pe *sistem imunitar* induce scăderea incidenței infecțiilor respiratorii (profilactic); ameliorează simptomele din infecții acute și cronice ale căilor respiratorii precum și tulburările de creștere ale copiilor cauzate de infecțiile recidivante ale sistemului respirator.

Acțiune generală: antiinflamator și antialergic, remediu al tulburărilor inflamatorii recidivante, vitaminizant (198).

C. Betula pubescens Ehrh. - antiinflamator, este un drenor excelent al țesuturilor infiltrate cu exces de reziduri metabolice, stimulează reacțiile catabolice, acționând asupra funcțiilor detoxifiante hepatice.

- *metabolism general* - eliminarea toxinelor și fortificarea organismului;
- *sistem respirator* - ameliorarea simptomelor din infecții acute și cronice
- *sistem osteo-articular* - remineralizarea oaselor și ameliorarea durerilor articulare
- *cavitate bucală*- ameliorarea simptomelor din afecțiuni gingivale (198).

D. *Carpinus betulus* L.- remediu biologic important, antihemoragic, indispensabil în cazul unui sindrom trombocitopenic, sindroame de insuficiență hepatică însoțite de tulburări ale crazei hematice (anemie, trombocitopenie).

Este un bun antiinflamator – sindroame respiratorii spastice și tusigene, tuse spastică, sindroame rinosinusale bronhice, bronșite acute și cronice (198, 240).

E. *Viburnum lantana* L.- reglator neurovegetativ, spasmolitic și antialergic al căilor respiratorii fiind indicat în astmul simplu și complicat în toate formele de dispnee astmatiformă [teren tuberculinic – dr. Tetau M.(249)]. Este remediul stărilor alergice cronice decompensate (198).

1.3. Lipsa unor cercetări științifice a gemoterapicelor

Preparatele gemoterapice se utilizează doar tradițional, de aici necesitatea fundamentării științifice prin elaborarea unor norme de calitate bazate pe conținutul în principii active și a mecanismului de acțiune, care să le confirme calitățile terapeutice.

1.4. Stadiul cunoașterii temei abordate pe plan internațional și național a cercetării în domeniu

La nivel național și internațional gemoterapia se practică cu produse care nu sunt standardizate în principii active, răspunzătoare de acțiunea terapeutică. Nu se pune accent pe cantitatea de principii active, care trebuie să fie constantă, ci pe raportul produs vegetal/gemoterapic (1/10 din tinctura mamă).

Prospectele asociate confundă compoziția chimică a produselor vegetale din care se obțin cu compoziția gemoterapicelor. Gemoterapicele s-au utilizat până în prezent doar în baza practicii tradiționale, fără verificare farmacologică sau clinică, deși metoda este destul de larg utilizată în diverse țări: Franța, Italia, Germania, Marea Britanie, etc.

Dezavantaje

Reproductibilitatea rezultatelor nu este posibilă, de aici răspunsuri diferite ale pacienților la doze diferite din același preparat.

Nu se poate stabili o corelație între compoziția chimică și acțiunea preparatului, necunoscându-se cantitatea principiilor active din gemoterapicul utilizat.

2. Obiectivele cercetării

Fundamentarea științifică a utilizării gemoterapicelor obținute din *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L., *Betula pubescens* Ehrh., *Viburnum lantana* L., *Carpinus betulus* L., folosite în tratamentul unor afecțiuni respiratorii;

- cercetarea compoziției chimice în vederea standardizării lor;

- completarea normei de calitate a gemoterapicelor supuse cercetării cu precizarea conținutului în derivați polifenolici (acizi fenol-carboxilici), flavone, triterpene-steroli prin cercetări HPLC, HPLC/SM.
- verificarea *in vitro* a acțiunii antimicrobiene și antioxidante;
- fundamentarea științifică a unora din utilizări (antibacteriană, antioxidantă) prin determinarea activității antibacteriene (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) și antioxidante (prin metoda DPPH).
- verificarea clinică a beneficiilor terapeutice pe loturi de bolnavi și precizarea mecanismului de acțiune.

2. OBTINEREA GEMOTERAPICELOR CERCETATE

2.1. Obținerea gemoterapicelor folosite în cercetarea clinică (procedeu PlantExtract)

Stabilirea perioadei de recoltare funcție de calitatea materiei prime și alegerea solventului adecvat pentru extragerea principiilor active.

Maceratele glicerinice sunt preparate lichide din fitocomplexe de plante medicinale, care rezultă prin extracția materiei prime de origine vegetală, soluție care extrage complet componenții vegetali fără denaturarea principiilor active conținute în plantă. Materia primă (muguri, rădăcini, sau mlădițe), este recoltată către sfârșitul iernii sau începutul primăverii, perioade în care au o concentrație maximă de principii vitale. Produsele vegetale sunt recoltate neapărat proaspete din habitatul natural evitând recoltarea în perioade climatice care ar putea determina deteriorarea plantei. Este important să fie exclusă prezența ierbicidelor și insecticidelor. Recoltarea adecvată a produselor vegetale constituie cea mai bună garanție pentru conservarea proprietăților principiilor active conținute în ele. Odată recoltate, produsele vegetale trebuie supuse preparării remediilor în următoarele 48 de ore. Gemoterapia utilizează extracte de țesuturi vegetale proaspete în primă diluție decimală Hahnemaniană. Maceratul glicerinic propriu-zis este diluat în proporție de 1:10, cu un amestec de apă, alcool, glicerină, (20:30:50). Astfel, 100 ml macerat glicerinic DH1 corespund la 0,5g s.u. La finalul procesului de preparare, tincturile mamă sunt controlate prin probe organoleptice (miros, gust, culoare), probe fizice (stabilirea densității, gradului alcoolului, eventuale reziduuri), probe chimice pentru controlul principiilor active din tincturile mamă, prin spectrofotometrie, dozarea principiilor active. Gemoterapicele sunt conservate în recipiente de sticlă brune depozitate în locuri închise, ferite de lumină (198).

Proces tehnologic și controlul calității (PlantExtract).

Ca orice producător și Plantextract Cluj-Napoca dispune de un laborator de control al calității produselor elaborate (101, 102, 104, 105). În cazul de față controlul constă în:

- controlul calității materiilor prime;
- controlul calității produsului finit.

2.2. Produsele vegetale utilizate la obținerea unor gemoderivate folosite în experimentul clinic

2.2.1. RIBES NIGRUM L.

2.2.1.1. Denumiri populare

Denumiri populare în lb. română: Agriș-negru, coacăză-neagră, pomișoară-neagră, smordin, smordina-neagră, strugurei-negri, struguri negri (25, 90).

Încadrare sistematică: regn - *Plantae*, încregatură - *Magnoliophyta*, clasa *Magnoliopsida*, ordin - *Saxifragales*, familia - *Grossulariaceae*, gen- *Ribes*, specia – *Ribes nigrum*.

2.2.1.2. Compoziție chimică

Mugurii - au concentrații mai mari de heterozide fenolice, vitamină C = 107mg/g și de aminoacizi, mai ales arginină, prolină și alanină. Concentrațiile de arginină din muguri sunt de 5,7mg/g, în timp ce în frunze sunt de 0,77mg/g. (25, 88, 90, 198).

2.2.1.3. Cercetări farmacologice anterioare

Ribes nigrum L. conține diverse tipuri de acizi fenolici cu un efect antioxidant puternic, care le conferă posibilitatea de utilizare la scară largă ca un produs tip supliment alimentar. Cercetarea acestora s-a efectuat prin spectroscopie și HPLC pentru a diferenția procentul de acizi fenolici în plante sălbatice și din culturi convenționale (7,31). Alte cercetări efectuate în Japonia au demonstrat efectul antiviral [virusul gripal A, B, herpes simplex-1(238)]. Acest efect a fost evidențiat prin cromatografie pe fracțiile D până la G separate care au dovedit efectul antiviral potent împotriva virusurilor gripale A și B.

Studiile recente au arătat că substanțele de tip flavonoide sunt potențate de frecvența derivaților polifenolici (picnogenol, proantocianidine) (31, 48, 146, 148). Prin acest test s-a demonstrat că maceratul glicerinic din muguri de coacăz negru produce inhibiție de 70-90% la doze cuprinse între 50-250mg/kg corp, față de administrarea de indometacin care nu produce o inhibiție mai mare de 70% la nivelul procesului inflamator (198).

2.2.1.4. Organotropism și posologie

Acțiunea gemoterapicului *Ribes nigrum* L. DH1, este direcționată în mod deosebit asupra glandelor suprarenale, determinând eliberarea de substanțe cu acțiune antiinflamatorie și antialergică, comportându-se ca un cortizon natural, acțiune cortizon - like. Experimental,

activează și stimulează 11-oxi-steroidii și determină creșterea nivelului corticosteroidilor, care sunt activatori ai răspunsului endogen în procesele de inflamație; printre altele, mugurii de *Ribes nigrum* L. previn și inhibă procesele inflamatorii și prin acțiune inhibitorie directă asupra catenelor enzimatică care produc prostanoizi.

Posologie - conform prospectului

Adulți și copii peste 7 ani: în general câte 2 mL, în puțină apă, de 2-3 ori pe zi, înainte de mese, copiii sub 7 ani câte 1 pic/kg corp.

2.2.2. ROSA CANINA L.

2.2.2.1. Denumiri populare

Măcie□, cacadăr, călcădăriu, cecadar, cascadin, , măcăcinele cioarei, măcăcinele coțofanei, mosmon, răsură, rug de măceș, rug sălbatic, rugul-vacii, ruja, rujită, scoabe, scochin, scoruș nemțesc, sipică, suieș, trandafir, trandafir de câmp, trandafir sălbatic, tufă de rug, zgorghin, ciucuri de măcăcine-fructele (25).

Încadrare sistematică: Regn: *Plantae*; subregn: *Cormobionta*, încrângătura: *Magnoliophyta*, *Angiospermatophyta*, Clasă: *Magnoliatae*, ordin: *Rosales*, familie: *Rosaceae*; Subfamilile: *Rosoideae*, gen: *Rosa*, specie: *Rosa canina* (<https://ro.wikipedia.org/wiki/Regn>)

2.2.2.2. Compoziție chimică

Valoarea nutritivă și terapeutică a măceșelor este dată de conținutul în vitamina C, carotenoide (beta caroten, licopen și izomeri ai rubixantinelor), dintre care unele sunt provitamine A, vitaminele E, K, PP, D, B1, B2, zaharuri simple, acid malic, pectine.

Florile (petalele) sunt bogate în uleiuri volatile (geraniol, citronelol, eugenol), ceară, acid galic, flavonoide galbene și antociani de culoare roșie închisă.

Fructele (bacele) conțin vitamine, (acid ascorbic 0,5%, vitamina A, vitamina E), aluminiu, vanilină, polifenoli (flavonoide, până la 0,3% și 1-2,5% taninuri), în special leucoantociani și catechine, acizi organici (9,8% acid malic, 3% acid citric), 5% acid galic, 18-28% carbohidrați (glucoză, zahăr invertit, zaharoză, alte zaharuri), 4% pectine, mircină, săruri minerale, 2,7% proteine, complexe asemănătoare auxinei, ulei gras în semințe, saponine (88, 198).

2.2.2.3. Cercetări farmacologice anterioare

Dr. Robin Christensen și colab. de la spitalul Frederikberg (Danemarca) și Universitatea din Copenhaga au demonstrat efectul măceșului asupra osteoartritelor; studiul a inclus 306 pacienți cărora li s-a administrat *Rosa canina* L. Rezultatele au evidențiat răspunsul pozitiv antiinflamator prin administrarea o perioadă mai lungă de timp a extractului de măceș. (39, 41, 43).

În 2001 Ross Nagel și Willich de la Univ. Humbold din Berlin au fost primii care au demonstrat experimental, că *Rosa canina* poate inhiba stresul oxidativ; reducerea semnificativă a durerii a dus la îmbunătățirea mobilității articulare (273).

2.2.2.4. Organotropism și posologie

Rosa canina L. este remediul inflamației localizate, recidivante. Are organotropism pentru sistemul reticuloendotelial, căile respiratorii superioare și schelet.

Experimental reechilibrează profilul proteic. Asupra metabolismului proteic crește albuminele și scade alfa-1 și alfa-2 globulinele, reduce alfa-2 euglobulinele și reechilibrează gama globulinele. Asupra metabolismului lipidic și lipoproteic posedă o ușoară activitate ambivalentă asupra beta-lipoproteinelor (198).

2.2.3. BETULA PUBESCENS EHRH.

2.2.3.1. Denumire populară - mesteacăn pufos, mesteacănaș (25, 88).

Încadrare sistematică: Regn: *Plantae*, subregn: *Tracheobionta*, superdiviziune: *Spermatophyta*, diviziune: *Magnoliophyta*, clasă: *Magnoliopsida*, subclasă: *Hamamelidae*, ordin: *Fagales*, familia: *Betulaceae*, gen *Betula*, specii: *Betula aetnensis* Rafin., *Betula nana* L., *Betula pendula* Roth, (luirig.altervista.org/schedeit/ae/betula_pubescens.htm)

2.2.3.2. Compoziție chimică

Frunzele conțin acid betulinic, acid tanic (8-9%), tanin (5-9%), glucoza (8-9%) și urme de alcaloid; un ulei eteric esențial (0,04-0,05%), esterul butilic al acidului betuloretic; saponine (3,2%), mici procente din acid nicotinic, mircetin-3-digalactozid cu agliconul său numit miricetină, derivați ai acidului cafeic (acid clorogenic), acid ascorbic (0,3%) (9, 15, 58, 59).

Rădăcina conține betulina, acid betulinic, betulalbumina (288).

Amenții; contin fenoli (6%); crezol, catecol, pirogalol, 5-propil pirogalol, dimetil eter, 5-metil-pirogaloldimetileter.

Sunt prezente printre altele triterpene și saponine: betulina și betulinol, flavonoide, digalactozide, tip miricetină, cumarine (scoarță), fenolglucozide, antociani, alantoina și acizi grași (198).

2.2.3.3. Cercetări farmacologice anterioare

Unii autori (E. Steineggr, R. Hansel 1963) - atribuie îndeosebi saponinelor activitatea terapeutică a produsului însă acestea se găsesc în cantitate de circa 3% și sunt întrecute de cea a flavonoidelor (57); acestea sunt reprezentate de hiperozidă, qercitină, miricetol 3-digalactozidă, 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavonă, catehine (A. Elbanovwska, F. Kaczmarek, 1966), dar la această acțiune mai participă sinergic și unele componente terpenoidice (62).

2.2.3.4 Organotropism și posologie

Betula pubescens Ehrh. stimulează reacțiile catabolice ale acidului uric, ureei, colesterolului, acționează asupra funcțiilor detoxifiante hepatice prin intermediul activării macrofagelor (celule Kupfer hepatice). Pe planul reacției inflamatorii *Betula pubescens* Ehrh. este remediul fazei inflamației exudative atunci când există o tendință de cronicizare în evoluția procesului inflamator, el dominând mai bine fenomenele patologice ale peretelui vascular (198).

Posologie

Mod de administrare: câte 50 picături (2 mL), în puțină apă, de 1-2 ori, înainte de masă. În caz de asociere cu alte gemopreparate se recomandă 50-75 picături (2-3 mL) în puțină apă, o dată pe zi.

2.3. Alte produse gemoterapice utilizate în tratament

Deoarece studiile clinice efectuate pe pacienți au impus utilizarea și a altor produse gemoterapice, este nevoie să detaliem câteva caracteristici generale ale unor preparate care au făcut obiectul studiului farmacognozie. Fără a intra în foarte multe detalii descriptive, voi sistematiza câteva aspecte generale importante pentru studiu.

2.3.1. Extract de călin (*Viburnum lantana* L.- DH1)

Denumire populară - dârmoz.

Componentele sale principale sunt salicozide, în frunze sunt prezenți tanini, gume, enzime și săruri ale unor acizi organici. În scoarță au fost izolați: 1,97% taninuri acid formic și valerianic, urme de acid salicilic, amidon, proteine (2,4%), dextrină, pentozani (16%), zaharoză, o rășină acidă (6,5%) care prin saponificare produce acid valerianic, heptacozan, sitosterină. Au mai fost identificate printre altele, următoarele substanțe: un ulei volatil (0,3%), pectină, potasiu, zaharoză, viburnină (substanță amară cu compoziție nedefinită) și în rădăcini acidul valerianic (3, 198, 250).

2.3.2. Extract de carpen (*Carpinus betulus* L.)

Denumiri populare: carpan, carpin, garnita, mustaret.

Componentii și principiile active nu sunt încă bine cunoscute, frunzele conțin taninuri, ceară și săruri minerale (198).

Utilizări terapeutice

Gemoterapia utilizează mugurii de carpen ca un remediu cu proprietăți antihemoragice, în afecțiuni rinofaringiene și pulmonare recidivante; are proprietăți de cicatrizare și ameliorare a spasmelor (44, 239).

2.3.3. Tinctura de propolis

Originea vegetală a propolisului a fost afirmată de către Rosch, Vansell, Bisson, Lavie și citată de Neacșu C.(180).

Compoziția chimică a propolisului

Cercetările au dus la identificarea prin HPLC a flavonelor: crizina, tectocrizina, galangină, izalpină, ramnocitrină, quercitrină, pinostrobina - (Popravco et al.) (205) și acizi fenolcarboxilici, caracterizați prin activitate antibacteriană pe *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (12, 76, 150).

Grupele majore de substanțe existente în propolis: 55% rășini și balsamuri; 7,5% - 35% ceruri de natură vegetală cu solubilități diferite în alcool și solvenți apolari; 10% uleiuri volatile; 5% polen; 5% acizi grași; microelemente: Fe, Zn, Cu, Co, Mn, Al, Ag, Mg, Si, Ti, Mo.

Flavonoidele prezintă proprietăți antimicotice și antibacteriene, confirmate experimental pe animale (Papay V. et al., 1985) (192). Deoarece flavonoidele din compoziția tincturii de propolis are multiple acțiuni terapeutice, cercetătorii au extins investigațiile în numeroase afecțiuni: cardiace, respiratorii, dermatologice, stomatologice (L. Serafim - Apiterapia în România) (220).

2.4. Alte preparate utilizate în studiul clinic

O scurtă trecere în revistă a acestora evidențiază tropismul lor pe aparatul respirator. Am considerat utilă menționarea acestor preparate, deoarece ele au intrat de-a lungul timpului în diversele scheme de tratament pe care le-am utilizat în mod personalizat la pacienți cu patologie respiratorie (2 - 4 - 6 luni). Deși ele nu au făcut obiectul acestei cercetări, este importantă cunoașterea lor, pentru a demonstra variabilitatea care există în natură, oferindu-ne multiple posibilități de tratament.

1. Extract din muguri de alun (*Corylus avellana*) D1

2. Ashwagandha

3. Baraka (ulei din semințe de negrilică – *Nigella sativa*)

4. Bettarax forte (Rotta Natura) conține trei frăți pătași – *Viola tricolor*, frunze de mesteacăn – *Betula pendula*, frunze de coada șoricelului – *Achillea millefolium*.

5. Extract de brad (*Abies pectinata*-DH1)

6. Giardinophyt-extracte vegetale de cimbru (*Thymus vulgaris*), vetrice (*Chrysanthemum vulgare*), semințe de mărar (*Anethum graveolens*), cuișoare (*Eugenia caryophyllata*) și extract de propolis.

7. Extract de Lemn câinesc (*Ligustrum vulgare* DH1)

8. Meridianul trei focare - cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), coacăz negru (*Ribes nigrum*L.), coada-racului (*Potentilla anserina*), coada-□oricelului (*Achillea millefolium*), iarba-mare (*Inula helenium*), lemn-dulce (*Glycyrrhiza glabra*),pir (*Agropyron repens*), revent (*Rheum officinale*), soc (*Sambucus nigra*), splinu□a (*Solidago virgaurea*), alcool etilic alimentar (72).

9. Meridianul plămân (Acupunctura lichidă): angelică (*Angelica archangelica*), cimbru de grădină (*Satureja hortensis*), coada-calului (*Equisetum arvense*), ghimbir (*Zingiber officinalis*),iarbă-mare (*Inula helenium*), mu□tar alb (*Sinapis alba*), pătlagină (*Plantago major*), plămânărică (*Pulmonaria officinalis*), podbal (*Tussilago farfara*), rozmarin (*Rosmarinus officinalis*), salvie (*Salvia officinalis*), scorti□oară (*Cinnamomum cassia*), alcool etilic alimentar. Indica□ii: se recomandă ca adjuvant în: amigdalită, faringită, laringită, traheită, bron□ită, astm bron□ic, tuse, silicoză (conform prospect).

10. Extract de meri□or DH1 (*Vaccinium vitis idaea* DH1) - Nivele de acțiune: intestin, căi urinare, aparat osteoarticular, vase arteriale, aparat genital feminin și masculin.

11. Poligemma sinusuri (Plantextract Cluj-Napoca)

Comparație de extracte gemoterapice din muguri de *Ribes nigrum* L., *Carpinus betulus* L., *Betulus pubescens* Ehrh, *Alnus glutinosa*.

12. Extract porumbar (*Prunus spinosa* DH1) - Nivele de acțiune: ax hipotalamo-hipofizo-suprarenalian, ochi, aparat cardio-vascular, rinichi, plămâni, piele, uter.

13. Respiral forte - Extract muguri plop (*Populus nigra*), Propolis, ulei esen□ial de mentă (*Mentha piperita*), ulei esen□ial de eucalipt (*Eucalyptus globulus*), ulei esen□ial de pin (*Pinus sylvestris*), ulei esen□ial de cimbru de cultură (*Thymus vulgaris*), ulei esen□ial de tea-tree(*Melaleuca alternifolia*) arbore de ceai (DACIA PLANT).

Aceste preparate au făcut parte din terapia pacien□ilor de-a lungul celor 6 luni de tratament,fiind necesară introducerea lor datorită unor situa□ii particulare ale subiec□ilor.

CERCETĂRI PERSONALE

3. CONTROLUL CALITĂȚII GEMOTERAPICELOR SUPUSE CERCETĂRII

3.1. Analiza compușilor sterolici

Cercetările noastre au constat în analize tip HPLC și LC-MS a sterolilor, flavonelor și acizilor fenolcarboxilici (AFC), deoarece sterolii sunt menționați în literatura de specialitate ca având proprietăți antiinflamatoare (1, 24, 31, 37, 119), flavonele și AFC - antioxidante.

3.1.1. Material și metodă

Probele utilizate în studiu sunt reprezentate de gemoterapicele PlantExtract – Cluj Napoca: *Ribes nigrum* DH1 (RN), *Rosa canina* DH1 (RC), *Betula pubescens* DH1 (BP), *Tinctura propolis* (P), *Viburnum lantana* DH1 (VL), *Carpinus betulus* DH1(CB).

Pentru analiza sterolilor din gemoterapicele DH1 - RN, RC, BP, VL, CB, și P s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă - LC/MS (5, 11, 16, 24, 193, 204).

Standarde: pentru determinarea cantitativă a sterolilor au fost utilizate ca standarde, beta-sitosterolul, stigmasterolul, campesterolul, ergosterolul și brasicasterolul.

Aparatura: HPLC cuplat cu spectrometru de masă; HP 1100 Series binary pump; autosampler HP 1100 Series; termostat HP 1100 Series; spectrometru de masa Agilent Ion Trap 1100 SL

Condițiile de lucru HPLC: Coloana analitică : Zorbax SB-C18 100 mm x 3.0 mm i.d., 5 μm; faza mobilă: amestec metanol: acetonitril 10:90 (v/v), eluție izocratică; debitul: 1 ml/min, temperatura: 45°C; detecția MS/MS, mod MRM; volumul de injectare: 5 μl

Condițiile de lucru MS: Sursa de ioni: APCI (atmosferic pressure chemical ionisation); mod ionizare: pozitiv, nebulizator: azot, presiune 60 psi; Vaporizare 400°C; Gaz de uscare: azot, debit 7 L/min, temperatura 325°C; potențial capilar: -4000V; mod analiză: monitorizare ioni specifici ai sterolilor

În condițiile cromatografice anterioare, timpii de retenție ai sterolilor analizați sunt: 2,4 minute pentru ergosterol, 3,7 min atât pentru stigmasterol cât și pentru campesterol (coeluție) și 4,2 minute pentru sitosterol.

Metoda MS

Deoarece în condițiile de ionizare toți sterolii pierd o moleculă de apă, ionii detectați de spectrometru sunt întotdeauna de forma $[M-H_2O+H]^+$. Detecția MS a pus în

evidență ionii - părinte ai sterolilor analizați (ioni părinte = ioni care se formează după ionizarea substanței, înainte de o eventuala fragmentare).

3.1.2. Rezultate și discuții

Toate gemoterapicele cercetate conțin doar beta-sitosterol. Întrucât cercetarea prezenței acestor derivați s-a extins asupra altor gemoterapice utilizate în fitoterapie (VL, CB) și asupra tincturii de propolis, semnalăm absența tuturor sterolilor cercetați în gemoterapicul de carpen (*Carpinus betulus*) și prezența în mici cantități doar a beta-sitosterolului în gemoterapicul de călin (*Viburnum lantana* L.) (2,033μg/mL). Tinctura de propolis cercetată conține 1,516 μg/mL beta-sitosterol. Întrucât compoziția chimică a propolisului este influențată de numeroși factori pedo-climatici și de speciile vizitate de albine în scopul recoltării lui, conținutul în fitosteroli ar putea fi variabil (51, 75, 122).

Cea mai mare cantitate de betasitosterol se găsește în gemoterapicul obținut din coacăz negru (21,598μg/mL). În celelalte gemoterapice cercetate cantitățile de betasitosterol sunt destul de apropiate în mesteacăn pufos-17,251 μg/mL, în măceș - 15,859 μg/mL.

3.1.3. Concluzii

Gemoterapicele DH1 de *Ribes nigrum* L., *Betula pubescens* Ehrh. și *Rosa canina* L. conțin beta-sitosterol în cantități suficiente de mari pentru a putea contribui la efectul antiinflamator (188). Concentrațiile de steroli determinate sunt prezentate în tabelul I (concentrațiile în cont de diluția efectuată și sunt exprimate în μg/mL).

Tabelul I. Concentrațiile sterolilor în probele analizate

Proba	Ergosterol	Stigmasterol	Beta-Sitosterol	Campesterol	Brassicasterol
	Concentrație (μg/ml)				
x1	0,000	0,000	15,859	0,000	0,000
x2	0,000	0,000	17,251	0,000	0,000
x3	0,000	0,000	21,598	0,000	0,000
x4	0,000	0,000	1,516	0,000	0,000
x5	0,000	0,000	2,033	0,000	0,000
x6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Legendă: x1= măceș; x2=mesteacăn pufos DH1; x3=coacăz negru DH1; x4=propolis tinctură; x5=călin DH1; x6=carpen DH1.

3.2. Analiza compușilor polifenolici prin LC și MS

Pentru analiza compușilor polifenolici din gemoterapicele supuse cercetării, s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (LC/MS).

3.2.1. Material și metodă

Se poate aplica pentru analiza calitativă a 18 compuși și cantitativă pentru 14 compuși.

Standarde: au fost utilizate standarde de compuși polifenolici: acizi fenolici (cafeic, clorogenic, caftaric, gentizic, ferulic, sinapic, paracumaric), glicozide ale quercetinei (quercitrin, hiperozide, izoquercitin, rutin) și agliconi flavonici (quercetin, miricetin, fisetin, patuletina, luteolin, kaempferol, apigenin).

Analiza compușilor polifenolici prin detecție UV

Compușii au fost detectați la lungimea de undă corespunzătoare maximului lor de absorbție din spectrul UV, acizii polifenolcarboxilici la $\lambda=330$ nm iar flavonoidele și agliconii acestora la $\lambda=370$ nm (fig.1).

Analiza polifenolilor prin detecție MS

Prelucrarea probelor de analizat

Au fost analizate în paralel două probe din fiecare gemoterapic, una ca atare iar cealaltă hidrolizată. S-a practicat hidroliza pentru îndepărtarea catenei glucidice în cazul flavonelor.

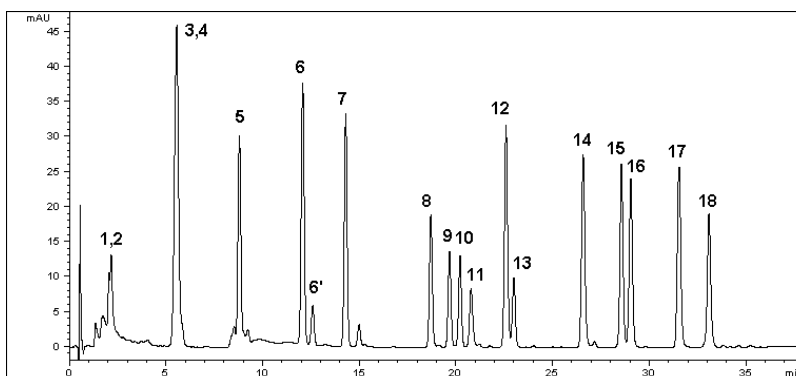


Fig. 1. Cromatograma unui amestec de 18 polifenoli, detecție UV la $\lambda=330$ și $\lambda=370$ nm

Deoarece unii agliconi flavonici sau unii acizi polifenol-carboxilici nu se află în stare liberă, ci legată(glicozide, esterii, etc.), pentru scindarea hidrolitică a esterilor acizilor fenol-carboxilici, s-a practicat hidroliza acidă care va duce la eliberarea acestor compuși din forma legată și ar aduce mai multe informații despre polifenolii produsului cercetat. Deoarece, în timpul hidrolizei pot avea loc procese de oxidare a polifenolilor, analiza are mai mult valoare calitativă decât cantitativă.

Hidroliza se face după urmatorul protocol: o parte extract se diluează cu o parte soluție HCl 2 N și se menține pe baia de apă la 80 °C timp de 60 min. Se corectează volumul de lichid evaporat în timpul hidrolizei prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de apă distilată și se injectează în sistemul cromatografic. Rezultatele sunt cuprinse în tabelul III.

3.2.2. Rezultate și discuții

În RC, BP, RN predomină heterosidele quercetolului exprimate în $\mu\text{g/mL}$ (147,875 quercitrină, 28,392 hiperozidă, 22,542 isoquercitrină în RC; 16,111 isoquercitrină, 1,714 rutozidă și 10,826 quercitrină în BP) și agliconii (5,294 quercetol, 1,146 kaempferol, în RN).

Ca acizi fenol-carboxilici predomină acidul *p*-cumaric (1,464 în RC; 56,132 în BP; 13,742 în RN). Cantitatea de acid cafeic/acid clorogenic, după separare, a fost de: 1,48/41,00 în RC; 1,38/13,90 în BP; 18,43/16,09 în RN; 282,7/3,12 în P; 0,17/1,67 în VL și neidentificabil /5,44 în CB (189) (tabel II).

3.2.3. Concluzii

Metodele de determinare cantitativă prin HPLC/MS sunt reproductibile și ca atare propunem introducerea lor în metodologia de determinare a calității gemoterapicelor respective. Limitele urmează a fi precizate în urma mai multor determinări.

Tabel II Determinare cantitativă a acidului cafeic și clorogenic

Produs	Acid cafeic ($\mu\text{g/mL}$)	Acid clorogenic ($\mu\text{g/mL}$)	Ioni specifici de identificare (m/z)
P	282,70	3,12	Acid cafeic: m/z 179 > m/z 135 Acid clorogenic: m/z 353 > m/z 191
RN	18,43	16,09	
BP	1,38	13,90	
CB	NF	5,44	
RC	1,48	41,00	
VL	0,17	1,67	

Tabel III Conținutul în polifenoli al gemoterapicelor și tincturii de propolis (μg/mL)

Compuși polifenolici	m/z	R _T ± SD (min)	P	RN	BP	CB	RC	VL
			NH / H					
acid <i>p</i> -Coumaric	163	9,48 ± 0,08	196,48	13,74	56,13	NF	1,46	NF
			222,48	11,03	46,74	2,68	9,34	NF
acid ferulic	193	12,8 ± 0,10	154,0	6,82	3,33	NF	NF	NF
			198,19	6,27	6,97	NF	NF	NF
acid sinapic	223	14,3±0,10	NF	0,71	NF	NF	NF	NF
			NF	0,17	2,18	NF	NF	NF
Hiperozidă	463	19,32 ± 0,12	NF	19,99	70,46	4,12	28,39	NF
			NF	NF	NF	NF	NF	NF
Isoquercitrină	463	19,60 ± 0,10	NF	71,54	16,11	NF	22,54	NF
			NF	NF	NF	NF	NF	NF
Rutin	609	20,20 ± 0,15	NF	27,57	1,74	NF	14,36	NF
			NF	NF	NF	NF	NF	NF
Myricetin	317	21,13 ± 0,12	4,58	2,27	NF	NF	NF	NF
			3,32	11,14	0,26	NF	0,97	NF
Quercitrină	447	23,64 ± 0,13	1,47	11,58	10,82	19,42	147,87	NF
			NF	NF	NF	NF	NF	NF
Quercetină	301	26,80 ± 0,15	14,11	5,29	4,31	NF	2,98	NF
			4,09	44,16	29,52	3,1	76,37	NF
Luteolină	285	29,10±0,19	2,59	0,46	NF	NF	NF	NF
			1,21	NF	NF	0,38	NF	NF
Kaempferol	285	32,48 ± 0,17	14,49	1,14	57,08	NF	0,35	NF
			2,02	7,3	14,23	0,56	16,66	NF
Apigenină	279	33,10±0,15	9,78	NF	22,33	NF	NF	NF
			5,471	NF	8,80	NF	NF	NF

Notă: NF-not found, sub limita de detecție

3.3. Determinarea acțiunii antioxidante prin DPPH – *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L., *Betula pubescens* Ehrh., *Carpinus betulus* L., *Viburnum lantana* L. și *Propolis tinctura*

S-a utilizat radicalul liber DPPH (difenil-picril hidrazina) pentru a evalua abilitatea de a dona un atom de hidrogen a remediilor gemoterapice și a antioxidanților sintetici, quercetin și BHT (butil-hidroxi-toluen). Rezultatele sunt exprimate în concentrație inhibitorie 50% (IC₅₀). Toate mostrele au redus radicalul DPPH în moduri diferite. Cu cât valoarea IC₅₀ este mai mică, cu atât un produs are activitate antioxidantă mai bună (16, 17, 53, 65, 119, 125, 126, 136). Tabelul IV evidențiază potențialul antioxidant al produselor cercetate.

Tabel IV Potențialul antioxidant al produselor cercetate

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)	Sample	IC ₅₀ (μg/mL)
P	2,79 ± 0.08	RC	5,81 ± 0,12
RN	19,52 ± 1.28	VL	30,08 ± 2,14
BP	16,39 ± 1.46	Quercetin	5,59 ± 0,13
CB	28,71 ± 1.84	BHT	15,88 ± 1,06

Concluzii

Tinctura de propolis prezintă cea mai puternică acțiune antioxidantă (IC₅₀= 2,79 μg/mL). Luând în considerare rezultatele, se poate evidenția efectul antioxidant în următoarea ordine crescătoare: VL <CB <RN <BP <BHT <RC < quercetin <P. Proantocianidinele, flavonoidele și acidul ascorbic conținute în fructele de *Rosa canina* L. îi imprimă cele mai bune proprietăți antioxidante împotriva HOCl și H₂O₂.

Această metodă este reproductibilă și accesibilă laboratoarelor de profil (189).

Rezultatele sunt în concordanță cu cercetările lui Daels-Rakotoarison *et al.*(2002), (56) care a raportat valori ale IC₅₀ de 5,73 μg/mL, 1,33 μg/mL și 2,33 μg/mL pentru anionul superoxid, acid hipocloros și peroxidul de hidrogen efectuate prin metoda *cell-free* pentru evaluarea activității antioxidante.

3.4. Activitatea antibacteriană a gemoterapicelor supuse cercetării

S-au utilizat bacterii gram pozitive - *Staphylococcus aureus* (ATCC 49444) și *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114) și bacterii gram negative - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Toate microorganismele testate au fost obținute de la laboratorul de biotehnologii alimentare, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca, România. Bacteriile au fost cultivate pe mediu de cultură

Muller-Hinton Agar. Acestea au fost depozitate la 4°C și subcultivate o dată pe lună. Pentru evaluarea activității antimicrobiene, extractul obținut se evaporă la sec, sub presiune redusă la 30 °C și resuspendat în 1 mL de apă bidistilată. Date tehnice cu privire la această metodă au fost deja publicate (43, 56, 150, 216, 219).

S-au determinat doi parametri: concentrațiile minime inhibitorii (CMI) și concentrațiile minime bactericide (CMB). Acestea sunt redate în tabelul V.

Tabel V. Rezultatul efectului antibacterian *in vitro*

Germe	Antibiotic Standard	CMI/CMB(mg/mL)					
		P	RN	BP	CB	RC	VL
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03	0,014	0,93	0,23	1,87	0,46	7,5
	0,06	0,029	1,87	0,46	3,74	0,93	15
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,015	0,014	1,87	0,93	7,5	0,11	7,5
	0,03	0,029	3,75	1,87	15	0,23	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,06	0,23	0,93	0,93	0,93	0,93	1,87
	0,03	0,46	1,87	1,87	3,74	1,87	7,5
<i>Escherichia coli</i>	0,12	0,46	1,87	1,87	3,75	3,75	3,75
	0,12	0,93	3,75	3,75	7,5	7,5	7,5

Concluzii

Staphylococcus aureus este tulpina bacteriană cea mai sensibilă la acțiunea P, BP, RC. P și RN au prezentat și un efect inhibitor față de *Listeria monocytogenes*. P prezintă cea mai bună activitate împotriva tulpinilor bacteriene *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli* (189).

4. Experiment clinic

Sistemul imunitar poate întâmpina dificultăți în procesul de apărare, mai ales în zonele urbane, adică acolo unde colectivitățile de adulți sau copii sunt populate de microorganisme (bacterii, virusuri) și unde stresul emoțional sau/și fizic este mai intens decât cel din zonele rurale (35).

4.1. Studiu privind eficacitatea gemoterapicelor menționate în afecțiunile respiratorii

4.1.1. Justificarea și protocolul studiului

Studiul este orientat spre câteva afecțiuni respiratorii la copii, adolescenți și adulți (viroze repetate - VR, bronșite - B, astm bronșic - AB, rinite alergice - RA, alergodermii -

A). Terapia clasică a acestor afecțiuni, cuprinde atât tratament alopat menționat, dar și posibilitatea unor terapii noi, de tipul gemoterapiei (*Propolis* - P, *Ribes nigrum* DH1 - RN, *Rosa canina* DH1- RC, *Viburnum lantana* DH1 -VL, *Carpinus betulus* DH1- CB și *Betula pubescens* EHRH.-BP).

Scopul acestui studiu constă în verificarea eficacității administrării unor gemoterapice (gemoderivate) pe o perioadă de 2-4 sau 2-6 luni, separat sau în paralel cu medicația alopată. Alegerea gemoderivatelor s-a bazat pe confirmarea proprietăților antiinflamatorii, antioxidante și antimicrobiene dovedite prin cercetările anterioare (188, 189).

Rezultatele acestui studiu ar putea fi folosite în noi protocoale terapeutice de abordare integrativă a pacientului.

4.1.2. Metodologia cercetării

Studiul s-a desfășurat pe o perioadă de 6 luni, între 1 mai 2011 și 31 noiembrie 2011, fiind efectuat de medicul investigator Dr. Orodan Leucian Mihaela în cabinetul Apimedica Arad.

A. Pregătirea studiului

Constă în alegerea gemoterapicelor, a populației studiate și a metodei de lucru.

Gemoterapicele utilizate în tratament: *Propolis* - P, *Ribes nigrum* DH1 - RN, *Rosa canina* DH1- RC, *Viburnum lantana* DH1 -VL, *Carpinus betulus* DH1- CB, *Betula pubescens* EHRH.-BP.

Alegerea subiecților și metoda de eșantionare

Subiecții au provenit dintre pacienții care s-au adresat cabinetului Apimedica - Dr. Orodan Leucian Mihaela din Arad, unde li s-au prescris combinații de gemoderivate (gemoterapice). Acești pacienți cu vârste cuprinse între 3 luni și 68 de ani au fost introduși în studiu pe măsura prezentării la cabinet, unii dintre ei folosind anterior diverse terapii alopatate, care nu au fost eficiente în privința suferințelor acuzate.

De aceea, eșantionarea lor s-a practicat în mod secvențial. Pentru desfășurarea studiului, s-a urmărit ca fiecare eșantion să conțină în medie 30 de pacienți. Acest aspect nu a putut fi îndeplinit, deoarece pe grupa de vârstă sub 20 de ani, adresabilitatea a fost în perioada respectivă, foarte mare. De aceea subiecții, în număr total de 131, au fost repartizați pe grupe de vârstă:

Grupă vârstă sub 20 de ani : 61 pacienți, grupă vârstă 20 – 29 de ani : 19 pacienți, grupă vârstă 30 – 59 de ani : 28 pacienți, grupă vârstă peste 60 de ani : 23 pacienți

S-au mai efectuat încă 5 loturi de pacienți care au cuprins : rinita alergică : 61 pacienți, viroze repetate : 31 pacienți, bronșite repetate : 29 pacienți, alergodermie : 3 pacienți, astm bronșic : 7 pacienți.

Datorită mijloacelor financiare limitate, ca martor am folosit 2 loturi cu un număr mai mic de subiecți (lot M1 = 17, lot M2 = 16) pe subiecți considerați a fi sănătoși, cărora le-am determinat anumiți parametri menționați de literatura de specialitate ca fiind influențați de administrarea anumitor fitopreparate :

M1-cortizol seric – la cei tratați cu RN

M2- IgE și eozinofilia – la cei tratați cu RC și BP

Un alt aspect ținut sub observație a fost atenuarea sau dispariția tusei după administrarea gemoderivatelor M3.

B. Metoda de studiu

Examinarea clinică

Prima etapă a constat în examinarea pe aparate a subiecților, informarea asupra tratamentului (chestionar informat), analizele biochimice utile (VSH, fibrinogen, proteină C reactivă, hemoleucogramă cu formulă leucocitară).

Aplicarea tratamentelor specifice – gemoderivate, urmate de monitorizarea efectelor

Tratamentul a constat în administrarea unor gemoterapice subiecților pe de-o parte, pentru a observa modificarea unor constante biochimice, respectiv modificarea/dispariția simptomelor clinice (tuse, rinoree). Timpul de administrare a fost între 6 săptămâni – 2 luni, în funcție de simptomele prezentate.

Prelucrarea rezultatelor

Culegerea și gruparea datelor s-a făcut pe categorii de variabile. În urma prelucrării preliminare, s-au obținut indicatori primari sub forma valorilor biochimice obținute (cortizol seric, IgE, eozinofilie). Pe baza acestora s-au evidențiat unele aspecte de ansamblu legate de acțiunea preparatelor supuse cercetării și reproductibilitatea rezultatelor.

C. Materiale utilizate în studiu

S-au utilizat extracte gemoterapice, producător PlantExtract Cluj-Napoca : RN, RC, CB, P, VL, BP, în doză unică de 2 mL la adulți, respectiv o picătură/kg corp la sugar și copii până la 7 ani.

D. Obținerea consimțământului informat

Subiecților li s-a cerut să completeze un chestionar cu întrebări referitoare la nume, prenume, sex, adresă, fumat, antecedente personale, antecedente patologice, diagnostic cunoscut, boli asociate (Anexa I).

4.1.3. Rezultate și discuții

Întrucât s-au utilizat mai multe gemoterapice în protocolul de tratament, era necesar să obiectivăm acțiunea gemoterapicului pe constante biochimice, motiv pentru care s-a trecut la un studiu pe 2 loturi de 17/16 subiecți cărora li s-au administrat extracte de *Ribes nigrum* L., respectiv combinația *Rosa canina* L. și *Betula pubescens* Ehrh., pe o perioadă de 6 săptămâni.

Scopul acestui studiu care s-a efectuat cu mijloace financiare proprii, a fost de a demonstra modificarea unor constante biochimice de către diluția decimală Hahnemaniană.

Numărul subiecților a fost mic, astfel încât nu s-au putut obține date statistice clare. S-au ales **cortizolul seric, IgE, eozinofilele** acestea fiind markeri specifici ai inflamației și alergiei. S-au ales aceste constante deoarece pacienții nu prezentau modificări ale constantelor menționate anterior, ei fiind considerați de la început aparent sănătoși. Pornind de la datele obținute anterior prin studiile farmacologice efectuate, am parcurs următorii pași :

4.1.4. Studiu clinic cu extract de *Ribes nigrum* L. - DH1 (Plantextract Cluj-Napoca)

Material și metode

Lotul M1 – 17 subiecți care nu prezentau afecțiuni cunoscute sau asociate și nu utilizau alte tratamente complementare sau alopate. Examenul clinic și probele de laborator nu au evidențiat modificări. Sângele s-a recoltat la aceiași oră (7-7.30). Pacienții nu foloseau alte tratamente, pentru a observa diferențele care apar prin utilizarea gemoterapicului.

Conform indicațiilor menționate în literatură, (sindroame alergice, sindroame inflamatorii-local/general, aparat respirator), (143, 175, 179) am realizat un studiu clinic pe lotul M1 administrându-le RN macerat glicerinic în doză de 2mL la adulți, respectiv 1pic/kgcorp în cazul copiilor până în 10 ani timp de 6 săptămâni.

Rezultate și discuții

Având în vedere că valorile au scăzut la 9 dintre pacienți și au crescut la 6, nu se poate trage o concluzie unitară, cum că tratamentul cu gemoterapic de coacăz negru ar scădea valorile cortizolemiei.

Se observă însă că ele tind să se situeze în niște limite cu variații mai mici după tratament (anterior de tratament între 5,8 și 16, după tratament între 6 și 14,5).

Luând în considerare limitele normale (conf. Synevo 6,2-19,43 mg/dL între orele 7-10 dimineața) se poate trage concluzia că mai degrabă normalizează valorile cortizolemiei

tinzând să o crească la cei cu valori mici și să o scadă la cei cu valori mari, acesta fiind punctul esențial al tratamentului.

Tabel VI. Lot M1 - Valorile cortizolului seric sub tratament cu *Ribes nigrum* L.

Valori Cortizol seric			
Nume, prenume, vârsta	Valori înainte de tratament	Valori după tratament	Diferența cortizol seric
B.L. - 58	13,50	11,60	1,90
C.R. - 44	14,90	10,20	4,70
L.C. - 42	11,10	8,50	2,60
C.M. - 42	13,50	13,50	0,00
B.G. - 11	11,70	12,60	-0,90
B.S. - 5	14,50	14,50	0,00
D.I. - 12	12,00	9,50	2,50
C.O. - 13	13,50	11,60	1,90
C.T. - 12	9,00	7,30	1,70
Z.T. - 16	5,80	6,00	-0,20
Z.C. - 5	9,30	7,00	2,30
G.O. - 58	11,40	10,40	1,00
T.O. - 3	13,30	13,70	-0,40
M.L. - 21	16,00	13,90	2,10
L.C. - 78	8,30	11,30	-3,00
P.S. - 49	11,20	12,70	-1,50
B.B. - 18	6,90	9,70	-2,80

Ipoteza 1. RN scade valorile cortizolului

Media valorilor cortizolului seric pre-tratament este 11,52, iar abaterea standard de 2,87. Valorile limită înregistrate sunt situate între 5,80 și 16,00. Media valorilor cortizolului seric post-tratament este de 10,82 cu o abatere standard de 2,57, valorile extreme fiind 6,00 și 14,50.

Analiza distribuțiilor, prin metoda Kolmogorov-Smirnov pentru un eșantion indică următoarele:

- pre-tratament: $Z = 0,607$ la $p = 0,855$
- post-tratament: $Z = 0,446$ la $p = 0,989$.

Deoarece $p > 0,05$ în ambele cazuri, putem conchide că distribuția nu este semnificativ diferită de o distribuție normală, de tip gaussian.

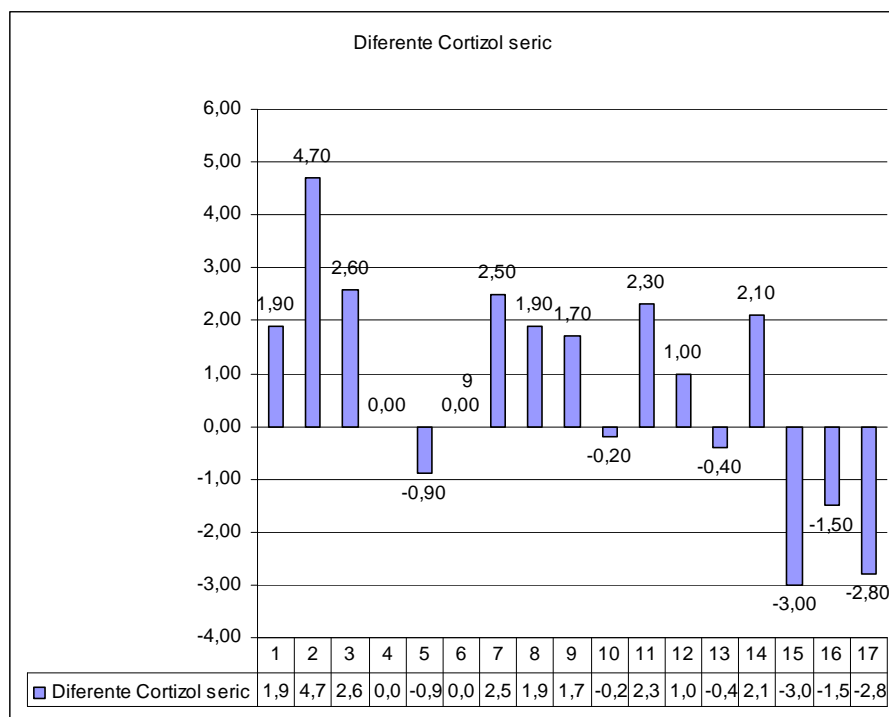


Fig. 2. Lot M1 - Diferențele cortizolului seric

Distribuțiile fiind normale vom utiliza testul „t” pentru măsurători repetate.

Rezultatele obținute sunt: $t(16)=1,403$ la $p=0,09$ (test unilateral). Deoarece $p>0,05$, pragul de eroare minim admis, rezultă că diferențele în ceea ce privește cortizolul seric pre și post-tratament nu sunt semnificative statistic.

Nivelele cortizolului seric post-tratament nu sunt semnificativ mai scăzute comparativ cu cele pre-tratament. Există un risc de eroare prea ridicat pentru a susține că efectele obținute sunt semnificative și că ele s-ar datora tratamentului aplicat.

Ipoieza se respinge.

Aș interpreta scăderea cortizolului, dacă este la un subiect sănătos cu valori crescute sau la limita superioară anterior, ca fiind un răspuns tip feedback negativ pe bucla secreției endogene de cortizol, adică scade secreția endogenă datorită suplimentării cu "efect cortizol-like" prin administrarea de coacăz negru, posibil ca toleranță mai bună la stres, sau efect de feedback pozitiv, la subiecții cu valori serice scăzute bazal. În această situație ar fi fost interesant să se determine valorile cortizolemiei la 2 săptămâni pentru a surprinde momentul creșterii sau scăderii

valorilor cortizolemiei. Din lipsa suportului financiar acest experiment nu a fost efectuat considerând că 6 săptămâni ar fi un timp optim pentru a trage niște concluzii.

Concluzii

Ribes nigrum - macerat glicerinic influențează secreția de cortizol dar nu putem trage o concluzie unitară privind creșterea sau scăderea acestor valori și prin ce mecanism are loc această variație.

4.1.5. Studiu clinic cu extract din mlădișe de măceș - (*Rosa canina* DH1) și muguri de mesteacăn pufos (*Betula pubescens* DH1)

Lot M2 - 16 subiecți cărora li s-a administrat RC și BP timp de 6 săptămâni. S-au determinat valorile Ig E și valorile eozinofiliei la început și la 6 săptămâni după administrarea preparatelor.

Tabel VII. Lot M2 - Valorile IgE sub tratament cu RC și BP

Valori IgE			
Nume, prenume, vârstă	Valori înainte de tratament	Valori după tratament	Diferențe IgE
M.A. - 3	35,00	36,90	-1,90
M.AL. - 4	25,00	25,00	0,00
M.B - 14	25,00	25,50	-0,50
C.B. - 15	63,50	59,80	3,70
C.A. - 17	25,00	29,00	-4,00
D.V. - 53	25,00	86,80	-61,80
D.I. - 12	34,20	39,40	-5,20
F.M. - 36	25,00	31,20	-6,20
K.E. - 5	12,30	25,00	-12,70
G.L. - 8	55,00	90,60	-35,60
M.P. - 4	139,00	442,40	-303,40
M.V. - 35	68,30	89,10	-20,80
N.B. -14	747,70	875,10	-127,40
B.L. - 45	54,20	61,60	-7,40
G.E. -14	139,00	156,20	-17,20
N.F. - 25	25,00	29,00	-4,00

Valorile IgE cresc la 14 pacienți, scad la 1 pacient, în timp ce în cazul unui pacient valorile IgE nu se modifică (fig.2, tabel VII).

Dintre cei 16 pacienți tratați, 14 au avut valori mai mari după tratament, 1 a fost staționar și 1 a prezentat valori mai mici - prin urmare este oarecum clar că tratamentul a crescut per ansamblu valorile IgE la acești pacienți.

RC și BP sunt niște stimulante imune ușoare și oarecum nespecifice - deci e normal într-o oarecare măsură să crească valorile unor anticorpi, fie ei și de tip IgE, discuție care s-ar putea face și în cazul unor pacienți cu parazitoze, la care reactivitatea IgE este semn de reactivitate față de parazit (29, 87).

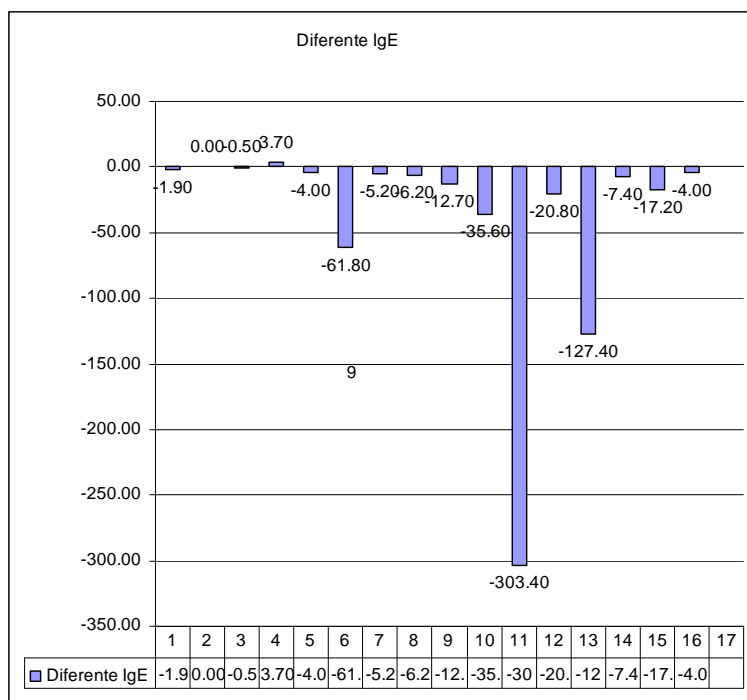


Fig. 3. Diferențe IgE în urma tratamentului cu RC și BP

Determinările de IgE s-au efectuat în perioada august-septembrie, aceste fapte putând interfera cu interpretarea rezultatelor - un pacient alergic în sezon având valori în creștere ale IgE dar aceștia nu acuzau fenomene de tip alergic cunoscute.

Deasemenea, un pacient alergic la polen de Betulaceae - din care face parte și mesteacănul ar putea avea valori în creștere ale IgE după expunerea la acest preparat.

Ipotеза 2. - Nivelul Ig.E scade semnificativ în urma tratamentului gemoterapic aplicat.

Indicatorii statistici descriptivi

- pre-tratament: media = 93,01; abaterea standard = 178,71; mediana = 34,60; valoarea minimă = 12,30; valoarea maximă = 747,70. Se înregistrează o eroare standard de măsurare ridicată (SE = 44,67), datorată a două valori extreme în seria de date.
- post-tratament: media = 131,41; abaterea standard = 223,33; mediana = 49,60; valoarea minimă = 25,00; valoarea maximă = 875,10. Se înregistrează o eroare standard de măsură ridicată (SE = 55,83), datorată a două valori extreme în seria de date.

Analiza normalității distribuțiilor (metoda Kolmogorov - Smirnov pentru un eșantion) indică:

- pre-tratament: $Z = 1,47$ la $p = 0,027$, rezultând o diferență statistică semnificativă față de distribuția normală.

- post-tratament: $Z = 1,54$ la $p = 0,017$, rezultând o diferență statistică semnificativă față de distribuția normală.

Datorită faptului că distribuțiile nu pot fi considerate normale, vom utiliza testul neparametric Wilcoxon. Rezultatele obținute sunt: $Z = -3,408$ la $p = 0,001$. Mărimea efectului $r = 0,602$ indică un efect ridicat, adică o diferență importantă.

Diferențele la nivelul IgE sunt semnificative statistic, dar în sensul opus celui anticipat. Valorile IgE cresc semnificativ post-tratament.

Ipoteza se respinge.

În ceea ce privește eozinofilia sub tratament cu gemoterapie de măceș și mesteacăn pufos:

Dintre cei 16 pacienți 10 au avut creșteri după tratament și 6 au avut scăderi, deci pare a fi o tendință la a crește eozinofilele, iar valorile cu care cresc sunt predominante.

Există totuși un pacient cu valori mari ale eozinofiliei (10,70) înainte de tratament, la care valorile scad ușor după (9,4), dar și unul la care valorile erau mici și normale înainte de tratament (3,80) și cresc foarte mult după (10,60).

Aceste fapte impun din nou discuția cu eventuale intercurențe sau alergii - pentru că datele sunt neunitare (de exemplu: eozinofilele tind să scadă ușor după faza inițială a unei parazitoze sau la sfârșitul unui sezon de alergii și cresc în timpul sezonului - deci nu se pot trage concluzii certe numai pe baza unor date de laborator - depinde și de statusul imun și de sănătate sau boală al aceluși pacient).

Ipoteza 3.- Nivelul eozinofilelor scade semnificativ în urma administrării tratamentului alternativ.

Media valorilor eozinofilelor pre-tratament se ridică la 4,07, cu o abatere standard de 2,70. Mediana ia valoarea 3,75, iar eroarea standard de măsurare este egală cu 0,674. Valorile extreme sunt: minim = 1,20; maxim = 10,70.

Media valorilor eozinofilelor post-tratament este de 4,75, cu o abatere standard de 3,01 și mediana egală cu 4. Eroarea standard de măsurare ia valoarea 0,752. Valorile extreme sunt: minim = 1,30; maxim = 10,60.

Media în cazul seriei de date post-tratament este superioară mediei valorilor eozinofilelor pre-tratament.

Analiza normalității distribuțiilor (test Kolmogorov-Smirnov pentru un eșantion) indică următoarele:

- pre-tratament: $Z = 1,044$ la $p = 0,226$ ($p > 0,05$), așadar putem considera distribuția ca fiind normală, de tip gaussian.

post-tratament: $Z = 0,618$ la $p = 0,84$ ($p > 0,05$), aşadar putem considera distribuția ca fiind Testul „t” pentru măsurători repetate indică următoarele: $t(15) = -1,407$ la $p = 0,09$ (test unilateral). Diferențele observate nu sunt semnificative statistic la un prag de eroare inferior lui 0,05.

Diferențele înregistrate nu sunt ne semnificative statistic. Mai mult, valorile eozinofilelor tind să crească post-tratament, nu să scadă. Există un risc de eroare mult prea ridicat de a susține că efectul observat nu este unul aleator și că ar putea fi explicat de tratamentul aplicat.

Ipooteza se respinge.

Tabel VIII.Lot M2 - Eozinofilia în urma tratamentului cu RC și BP

Valori Eozinofile			
Inițiale, vârstă	Valori înainte de tratament	Valori după tratament	Diferențe eozinofile
M.A.- 3	1,40	1,30	0,10
M.AI – 4	4,00	3,60	0,40
M.B.-14	3,80	2,90	0,90
C.B.-15	3,70	4,40	-0,70
C.A.- 17	2,60	4,90	-2,30
D.V.-53	3,80	10,60	-6,80
D.I.-12	2,42	3,30	-0,88
F.M.-36	10,70	9,40	1,30
K.E – 5	9,40	9,80	-0,40
C.L.- 8	5,50	5,00	0,50
M.P. – 4	2,90	3,40	-0,50
M.V. -35	1,20	1,30	-0,10
N.B.-14	2,20	1,80	0,40
B.L. – 45	6,00	6,10	-0,10
G.E. -14	3,86	6,40	-2,54
N.F. – 25	1,70	1,80	-0,10

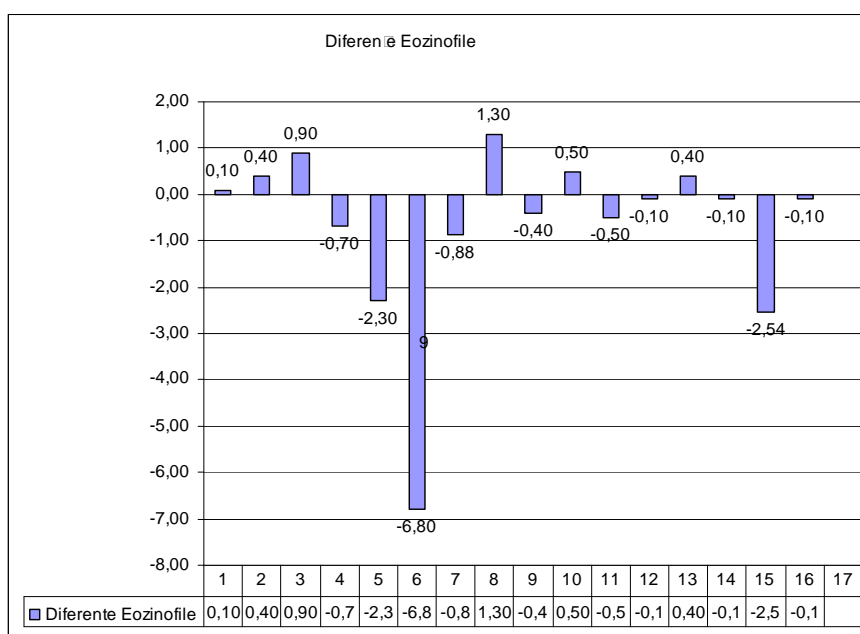


Fig. 4. Diferențele eozinofiliei în urma tratamentului cu RC și BP

4.2. Evaluări comparative ale tratamentelor efectuate pe cele două loturi martor

Repartizarea subiecților pe cele două loturi a fost un proces secvențial. La repartizarea într-un lot sau altul, s-au urmărit strict 3 markeri specifici alergiei (cortizol seric, IgE, eozinofilie). Resursele financiare fiind proprii și limitate, nu am reușit să realizăm loturi mai mari de pacienți care să permită analize statistice mai detaliate. Totuși, acestea pot reprezenta un punct de plecare pentru o evaluare cantitativă mai clară a valorilor markerilor.

Numărul subiecților fiind mic, nu s-au putut obține date statistice mai clare.

Asocierea RC și BP nu a permis o interpretare corectă a datelor, datorită acțiunilor diferite dovedite a celor 2 gemoterapice (RC- antialergic, BP- antiinflamator).

Comparând rezultatele obținute pe loturile de subiecți supuși tratamentului, pentru evaluarea cortizolului, IgE, eozinofiliei, nu se pot trage concluzii certe cu privire la acțiunea antiinflamatorie sau antialergică, menționate. O explicație ar fi numărul mic de pacienți luați în studiu, propunerea fiind pentru o cercetare mai amplă pe loturi mai mari de subiecți cărora să li se administreze strict câte un remediu pentru a elimina eventualele interferențe datorate asocierii lor (RC- antialergic, BP- antiinflamator, dar nu antialergic).

Deși a apărut în unele situații o creștere a IgE, subiecții nu au prezentat simptome specifice de tip alergic și nici nu au avut în antecedentele personale episoade semnificative din punct de vedere clinic.

Deși există numeroase studii de specialitate fitofarmacologice care dovedesc acțiunile antiinflamator, antioxidant, antialergic, al preparatelor, nu am găsit nici un studiu gemoterapic via experiment clinic, abordarea cercetării personale, fiind oarecum îngreunată de lipsa de date.

Concluzii:

Întrucât dintre toate gemoterapicele studiate RC are cel mai mare potențial antioxidant, considerăm că în bună parte acțiunea antialergică se datorează reducerii radicalilor liberi de oxigen rezultați din oxidarea lipidelor membranare.

Diluția decimală Hahnemaniană – DH1 poate influența constantele biochimice.

Subiecții luați în studiu nu au prezentat nici o reacție secundară/adversă prin administrarea acestei terapii, aspect important înănd cont de reacțiile secundare ale medicației alopate care prezintă diverse reacții adverse conforme cu prospectele lor.

4.3. Analiza unui simptom clinic –tusea la administrarea unor gemoterapice (gemoderivate) - RN, RC.

Deoarece analiza constantelor biochimice a fost limitată ca valoare, am ales un marker clinic – tusea (30, 66, 80, 100).

S-a ales un eșantion lot M3 - 54 de subiecți din cei 131 luați în studiu cu diverse afecțiuni respiratorii (viroze repetate- 20, bronșite - 22, astm bronșic - 5), pentru validarea unei ipoteze clinice.

Ipoteza 4. Tusea ca simptom se ameliorează semnificativ post-gemoterapie.

Rezultatele calculului statistic χ^2 sunt: $\chi^2 = 3,051$ la $p = 0,041$ (test unilateral); $p < 0,05$. Observăm că tusea, ca simptom, este mai puțin prezentă în urma gemoterapiei, după 2 luni. Diferența este una semnificativă statistic.

Concluzii

În urma gemoterapiei, tusea ca simptom, este semnificativ ameliorată după 2 luni. Efectul crește atunci când tratamentul este prelungit încă 2 luni.

Ipoteza se validează.

Întrucât tusea este declanșată de leucotriene, compuși rezultați din metabolismul lipidelor sub influența lipooxigenazei, iar compușii reducători de tip flavonoide o blochează, presupunem că RC, RN și P acționează prin acest mecanism (27).

Tabel IX. Lot M3 - Tusea ca simptom la 2 luni după gemoterapie (RN, RC)

la 2 luni		simptom		Total
		fara tuse	tuse	
pre-tratament		19	35	54
		23,5	30,5	54,0
		-4,5	4,5	
post-tratament		28	26	54
		23,5	30,5	54,0
		4,5	-4,5	
Total		47	61	108
		47,0	61,0	108,0

4.4. Rezultate analitice

A fost supus studiului un număr de 131 de pacienți cu diferite patologii respiratorii (viroze repetate - VR, bronșite - B, astm bronșic - AB, rinite alergice - RA, alergodermii - A). Majoritatea pacienților (aprox 80%) s-au prezentat pentru o consultație după scheme diferite de tratament alopate. În general, au predominat forme diferite de viroze respiratorii-acute sau cronice care au folosit antibioterapie pe perioade lungi de timp. O caracteristică

esențială a tuturor cazurilor a fost neconcordanța între simptomatologia clinică a pacientului și diagnosticul prezentat, situație des întâlnită în diagnosticul fals de astm bronșic.

Toți pacienții au fost îndrumați să-și efectueze analizele pentru a elimina existența unei infecții sau a unei alte patologii colaterale. În acest sens ei au efectuat: VSH, hemoleucograma cu formula leucocitară, fibrinogenul, proteina C reactivă, examenul de urină, ASLO, exudat nazal, exudatul faringian, cortizolul seric, IgE, probele ventilatorii, radiografia pulmonară, testele alergice.

Loturile nu sunt în general echilibrate din punct de vedere numeric, deoarece repartizarea a fost efectuată în mod secvențial conform cu prezentarea pacienților la cabinet. Acest aspect a limitat oarecum studiul, neexistând o colaborare cu alte centre care să permită furnizarea unor informații multiple pentru o prelucrare de date ulterioară.

4.4.1. Repartizarea pe grupă de vârstă a eșantioanelor de subiecți

În tabelul X sunt reprezentate vârstele din loturile de tratament. Se observă clar o predominanță a lotului tânăr sub 20 de ani, ponderea fiind dată de predominanța acestor afecțiuni la vârsta copilăriei și adolescenței. De remarcat o distribuție aproape egală a loturilor de vârstă de până la 60 de ani, urmată de grupa de peste 60 (34, 224, 225

Tabel X. Repartiția pe grupe de vârstă a eșantioanelor de subiecți

Grupă vârstă sub 20 ani	Grupă vârstă 20-29 ani	Grupă vârstă 30-59 ani	Grupă vârstă peste 60 ani
61	19	28	23

4.4.2. Repartiția pe sexe a eșantionului de subiecți

Referitor la sexul subiecților 55 au fost bărbați și 76 femei, în total 131 pacienți.

Analizând eșantioanele de tratament, se observă o ușoară dominanță a sexului feminin în ceea ce privește adresabilitatea. Procentul nu este însă semnificativ, dar există studii care consemnează o sensibilitate mai crescută a femeii la apariția unor probleme de tip respirator, mai ales a rinitei alergice. Femeia are o structură psiho-emoțională specială, posibil legată de ciclurile menstruale, sarcină, menopauză, dar și de fumat care pot determina anumite reacții specifice, inclusiv cele legate de o hiperreactivitate (34, 224, 162).

4.4.3. Repartiția pe boli și grupe de vârstă a eșantionului de subiecți

Tabel XI. Repartiția pe boli și grupe de vârstă

Nr.crt.	Boală	Sub 20 ani	20 - 29 ani	30 - 59 ani	Peste 60 ani
1	Rinită alergică	26	11	19	5
2	Viroze repetate	21	5	4	1
3	Bronșite repetate	18	4	6	1

4	Alergodermie	1	1	1	0
5	Astm bronșic	0	0	5	2

La nivelul întregului număr de 131 pacienți, repartiția acestora pe grupe de vârstă este prezentată în tabelul XI. Se remarcă numărul mare de subiecți la categoria sub 20 de ani, o categorie de pacienți aflată la vârstă la care sistemul imunitar este în curs de maturizare, sau se resimt unele probleme ale copilăriei mici. Este cunoscut faptul că la vârsta copilăriei, există o frecvență mai mare a problemelor de tip respirator date de contactul cu colectivitatea nouă în care copilul își desfășoară activitatea.

Pe segmentul de până la 29 de ani, se observă o incidență mai mică a afecțiunilor respiratorii, posibil datorate strict unei hipersensibilități, sau unor motive izolate: umezeală, frig, aer condiționat.

La eșantionul 30-59 de ani, se observă creșterea incidenței afecțiunilor respiratorii, mai ales a rinitei alergice posibil legat de afecțiunile cronice care încep să se instaleze odată cu vârsta.

Curios este că la grupa de peste 60 de ani, numărul acestora a devenit mai mic. Explicația provine posibil de la faptul că afecțiunile respiratorii cronice (BPOC, astm bronșic) sunt mai frecvente, iar pacienții au optat pentru medicația alopată (34, 35, 224).

Pornind de la aceste date minime, am încercat o reîncadrare diagnostică cât mai aproape de datele obținute clinic prin anamneză și examinarea clinică a pacientului. În urma acestor delimitări, am obținut următoarele eșantioane de pacienți cu viroze repetate, bronșite repetate, rinite alergice, alerгодermii, astm bronșic (tabelele XII – XVI).

Tabel XII. Viroze repetate

Viroze repetate	Tratament alopă	Tratament naturist	Durata tratament
31	Ketof, Aerius, Singulair, antibiotice,	RN, RC, BP, CB, P, AP, HR, VL, PS, Argint coloidal	2 – 4 luni

Pacienții care s-au prezentat la cabinet acuzaau repetarea unor episoade de tip viral la intervale variabile de timp (1- 4 luni), care necesitau administrarea de antibiotice.

Administrarea gemoterapicelor s-a efectuat pe o durată de minim 2 luni.

Într-o primă etapă simptomul clinic - tusea, a cedat în proporție foarte mare aspect evidențiat anterior. Celelalte gemoterapice s-au anexat în tratament datorită unor situații particulare care au vizat statusul pacientului și nu neapărat cercetarea în sine.

Tabel XIII Bronșite repetate – status postbronșite

Bronșite repetate	Tratament alopăt	Tratament naturist	Durata tratament
29	Ketof,Aerius,Singulair,antibiotice	RN, RC, BP, P, HR, VL, AP, Giardinophyt	2 - 4 luni

Examinarea clinică a acestor pacienți alături de analizele de laborator, nu au evidențiat modificări.

Specificitatea acestui grup constă în administrarea pe o perioadă lungă de timp (6-12 luni) a medicației antihistaminice, fără a avea date certe clinice și paraclinice care să explice administrarea acestora. Singura explicație posibilă este legată de interpretarea apariției bronșitelor ca un sindrom hiperreactiv (221). Persistența unei tuse cu sau fără expectorație în ciuda terapiei, dovedește inutilitatea sau încadrarea greșită a simptomatologiei clinice. Aceștia prezentau ca simptomatologie clinică: tuse persistentă iritativă sau expectorantă, fără febră, repetarea acestor episoade la intervale scurte de timp chiar în cadrul aceleiași luni.

Cu această ocazie în să subliniez necesitatea încadrării clinice și paraclinice corectă a pacienților, mai ales a copiilor care pot repeta diferite procese infecțioase pe fondul unor parazitoze neinvestigate sau/și a unor carențe vitaminice și minerale legate de procesul de creștere. Administrarea HR, VL, AP, Giardinophyt, a fost necesară tocmai pentru a rezolva infecțiile parazitare prezente, care pot mări pragul de reactivitate.

Prezentarea pacienților cu rinite alergice a fost legată de administrarea îndelungată (6 – 96 luni !) Parazitozele intestinale au fost prezente la 15 subiecți din categoria de vârstă sub 20 de ani, la 3 la categoria 20 – 29 ani, respectiv 3 la categoria de vârstă 30 – 59 ani. a preparatelor antihistaminice, care la un moment dat nu mai aveau efectele pozitive așteptate

Tabel XIV Rinite alergice

Rinite alergice	Tratament alopăt	Tratament naturist	Durata tratament
61	Ketof,Aerius,Singulair antibiotice, Bixtonim,	RN, RC, BP, AP, HR, VL, BP, Poligema	2 - 4 luni

	Prednison, Berotec, Claritine, Xyzal, Telfast, Ventolin, Olynth	Sinus, Betarax, Respiral forte, Argint coloidal, Meridian 3 focare, Giardinophyt	
--	---	---	--

Tratamentul antiparazitar a modificat tabloul rinitei până la dispariție. Testele alergologice au dovedit prezența diverselor alergii (cel mai frecvent praf, mucegai, polen, aditivi alimentari, aceștia din urmă fiind evidențiați mai ales de pacienții care consumau alimente semipreparate – fast food, cartofi congelați prăjiți). Apariției copiilor relateau dispariția sau scăderea episoadelor alergice odată cu tratamentul parazitozelor.

La adulți schimbarea modelului alimentar și de viață (factor stress) a permis reducerea sau renunțarea completă la tratamentul alopatic. Cu cât terapia alternativă a fost mai corectă și mai îndelungată cu atât simptomele s-au remis mai mult. Cura salină s-a dovedit a fi de un real ajutor în terapia pacientului(34, 38, 90, 109, 141).

Tabel XVI Astm bronșic

Astm bronșic	Tratament alopatic	Tratament naturist	Durata tratament
7 pacienți	Prednison, Borenar, Berotec, Ventolin	RN, RC, BP, Brahmi, Acupunctură, Ashwagandha, Betarax , Propolis,	2 - 6 luni

Acest eșantion de pacienți a acuzat din punct de vedere clinic, următoarele simptome: tuse cu sau fără expectorație, dispnee. Examinarea clinică pe aparate a evidențiat la nivel pulmonar, un murmur vezicular diminuat cu prezența unor raluri bronșice, specifice formelor cronice de astm. Categoria de vârstă a fost 30 – 59 ani, respectiv peste 60 de ani. Îmbunătățirea statusului pacienților, a apărut la primele 2 luni de administrare, prin reducerea tusei, aspect relevat în studiul menționat anterior (66, 80, 161).

4.5. Discuții integrative

Scopul studiului a constat în cercetarea și/sau verificarea eficacității unor gemoterapice și a metodelor complementare de tratament în scopul validării lor.

Cel mai mare număr de subiecți aparține vârstei de până la 20 de ani și este urmat de cel între 30 – 59 de ani, pentru care patologia este specifică. Grupa de vârstă tânără a optat pentru această terapie datorită informării și deschiderii acestor persoane față de o terapie complementară. De remarcat interesul crescut al părinților și al populației tinere pentru acest tip de terapie.

Nu există informații cu privire la interesul mai scăzut al celorlalte categorii de vârstă.

Ponderea persoanelor de sex feminin, a fost în toate situațiile ușor crescută față de cea masculină, cunoscută fiind preponderența unor afecțiuni la această categorie.

Este important de menționat creșterea ponderii acestor afecțiuni, legată de dezvoltarea economică, industrială a tuturor țărilor, dar și de folosirea excesivă a antibioterapiei, mai ales în România, care poate modifica pragul de reactivitate al subiecților (186).

4.6. Limitele studiului

Acest studiu prezintă câteva limite care trebuie menționate:

- a. Studiul nu este de tip randomizat, ci secvențial pe măsura prezentării acestora la cabinet.
- b. Subiecții au fost repartizați în funcție de simptomatologia acestora, observându-se la prezentarea lor o încadrare incorectă din punct de vedere al diagnosticului.
- c. Polimedicația acestor pacienți nu a permis o evaluare corectă a tuturor constantelor biochimice, acești subiecți, deoarece s-au prezentat la un interval de 2-12 luni de la momentul primului simptom (boală).
- d. Numărul mic al subiecților și resursele financiare personale limitate, nu a permis urmărirea mai multor aspecte, inclusiv biochimice, ale acestora.
- e. Studiile celor 2 loturi de pacienți (17/16), nu au dovedit acțiunile farmacologice evidențiate anterior (antiinflamator, antialergic).
- f. În prezentul studiu a fost implicat un singur medic, ceea ce a făcut ca posibilele modificări ale tratamentelor să fie evitate, însă procedeele limitează validitatea datelor obținute.
- g. Utilizarea RC și BP în același studiu nu a fost suficientă pentru a dovedi o activitate farmacologică.
- h. Studiile nu au permis o evaluare clară a unui singur gemoterapic deoarece pacienții doreau soluții rapide pentru rezolvarea problemelor cu care se confruntau, astfel încât a fost dificil să evaluăm care ar fi fost evoluția dacă se folosea o monoterapie. Din acest motiv s-a impune o continuare a studiului clinic pe pacienți cu patologie unică cu administrarea unei monoterapii.

5. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Cercetările privind eficacitatea gemoterapiei în tratamentul afecțiunilor respiratorii, s-au desfășurat pe o perioadă limitată (2 luni – 6 luni) și a cuprins un număr de 131 de subiecți care prezentau diverse probleme de tip respirator. Pacienții au fost repartizați pe grupe de vârstă, sex, afecțiuni, pentru a încerca să demonstrăm eficiența acestui tip de tratament la toate categoriile de subiecți. Pentru a dovedi legătura dintre compoziția chimică și acțiunile acestor gemoterapice – antiinflamator, antioxidant, antibacterian, am

parcurs 2 etape cu rezultate surprinzătoare : negăsind documentație, decât pe planta matură, a fost necesară cercetarea compoziției chimice ale acestor produse prin analize tip HPLC, LC, MS, DPPH, respectiv activitatea antimicrobiană pe germeni (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli*).

Rezultatele analizei sterolilor au evidențiat că toate gemoterapicele cercetate conțin doar beta-sitosterol, de asemenea semnalăm absența tuturor sterolilor cercetați în gemoterapicul de carpen (*Carpinus betulus*) și prezența în mici cantități doar a beta-sitosterolului în gemoterapicul de călin (*Viburnum lantana* L.) (2,033μg/mL). Tinctura de propolis cercetată conține 1,516 μg/mL beta-sitosterol. Cea mai mare cantitate de betasitosterol se găsește în gemoterapicul obținut din coacăz negru (21,598μg/mL). În celelalte gemoterapice cercetate cantitățile de betasitosterol sunt destul de apropiate în mesteacăn pufos-17,251 μg/mL, în măceș - 15,859 μg/mL .

Rezultatele analizei HPLC, exprimată în μg/mL, arată că în RC, BP, RN predomină heterozidele quercetolului (147,875 quercitrină, 28,392 hiperozidă, 22,542 isoquercitrină în RC; 16,111 isoquercitrină, 1,714 rutozidă și 10,826 quercitrină în BP) și agliconii (quercetol 5,294, kaempferol 1,146, în RN).

Ca acizi fenol-carboxilici, exprimați în μg/mL, predomină acidul *p*-cumaric (1,464 în RC; 56,132 în BP; 13,742 în RN). Cantitatea de acid cafeic/acid clorogenic, după separare, a fost de: 1,48/41,00 în RC; 1,38/13,90 în BP; 18,43/16,09 în RN; 282,7/3,12 în P; 0,17/1,67 în VL și neidentificabil /5,44 în CB. Metodele de determinare cantitativă prin HPLC/MS sunt reproductibile și ca atare propunem introducerea lor în metodologia de determinare a calității gemoterapicelor respective. Limitele urmează a fi precizate în urma mai multor determinări.

Tinctura de propolis prezintă cea mai puternică acțiune antioxidantă (IC₅₀= 2,79 μg/mL). Luând în considerare rezultatele, se poate evidenția efectul antioxidant în următoarea ordine crescătoare: VL < CB < RN < BP < BHT < RC < quercetin < P.

În ceea ce privește activitatea antibacteriană *Staphylococcus aureus* este tulpina bacteriană cea mai sensibilă la acțiunea P, BP, RC. P și RN au prezentat și un efect inhibitor față de *Listeria monocytogenes*. P prezintă cea mai bună activitate împotriva tulpinilor bacteriene *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli*.

În ceea ce privește cercetarea clinică, s-a demonstrat că diluția decimală hahnemaniană DH1 poate modifica constantele biochimice fără a putea concretiza evidențierea efectului antialergic și antiinflamator propus.

Experimentul clinic care s-a efectuat a dat posibilitatea pacienților să-și reducă sau chiar să renunțe definitiv la medicație îndeosebi cea antialergică.

Tusea ca simptom clinic, respectiv testele alergice, au răspuns pozitiv la administrarea gemoterapiei, aspect esențial pentru un punct de plecare în alte studii, mai ales clinice.

Originalitatea tezei

1. Studiile farmacologice s-au adresat în premieră pe gemoterapicele PlantExtract Cluj-Napoca – RN, RC, BP, VL, CB, pentru un studiu comparativ chimic (antioxidant, antibacterian, antiinflamator) și clinic. Introducerea propolisului a fost necesară datorită utilizării sale în mod frecvent în diferite afecțiuni respiratorii.

2. Utilizarea unei combinații originale (RN, RC, BP) în toate afecțiunile respiratorii pentru a dovedi acțiunile menționate anterior, în scopul utilizării lor ulterioare, în experiment clinic.

3. Demonstrarea acțiunii pe constante biochimice a diluției decimale, aspect important pentru dezvoltarea nanoterapiilor.

4. Efectuarea unor cercetări farmacologice via experiment clinic, pentru a demonstra modul de acțiune al acestora.

Perspectivile pe care le deschide teza

Rezultatele obținute în urma cercetării farmacologice, deschid noi perspective pentru continuarea altor cercetări. Este necesar ca acestea să țină cont de limitele pe care le-am arătat în prezenta teză, dar și de completarea investigațiilor pentru a obține rezultate obiective care să fie corelate cu datele fitochimice obținute. Cercetarea limitată doar la obținerea datelor fitochimice și farmacologice, fără continuarea cercetării clinice, nu va îmbunătăți managementul terapiilor bolilor respiratorii.

6. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aigner T, Fundel K, Saas J, et al. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2006;54(11):3533–3544.
2. Akram Khan M¹, Afzal M² Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: *Inflammopharmacology*. 2016 Apr 11).
3. Altun M.L., Saltan Çitoğlu G., Sever Yılmaz B., Özbek H. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Viburnum opulus*. *Pharmaceutical Biology*, 2009, 47(7):653-8.).
5. Andriamadio J.H., Rasoanaivo L.H., Benedec D., Vlase L., Gheldiu A-M., Duma M., et al., HPLC/MS analysis of polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of *Artabotrys hildebrandtii* O. Hoffm. Extracts. *Nat Prod Res*, 2015, 29(23): 2188-2196.
7. Anttonen MJ¹, Karjalainen RO., *J Agric Food Chem*. 2006 Oct 4;54(20):7530-8. High-performance liquid chromatography analysis of black currant (*Ribes Nigrum* L.), fruit phenolics grown either conventionally or organically: *J Agric Food Chem*. 2006 oct 4;54(20) Institute of Applied Biotechnology)
9. Bakhvalov S.A., Martem'ianov V.V., Kukushkina T.A., Vyoschina G.I. - The dynamics of phenolic compounds and soluble sugars in the leaves of the silver birch (*Betula pendula* Roth.) after defoliation and their significance in Entomological Plant Resistance, *Biology Bulletin*, 2009, 36(5): 449-454.
10. Bălășoiu Maria-Luiza, Daniela Călina, Laurian Vlase, Maria Viorica Bubulică, Qualitative and quantitative determination of polyphenol content of *Scilla bifolia*, *Journal of Medicinal Plants Research* 6(20):3664-3671, 2012
11. Balasoiu, ML ; Calina, D ; Vlase, L ; Bubulica, MV ; Chirigiu, L , Quantitative Determination of Caffeic Acid, Chlorogenic Acid and Luteolin-7-glucoside from *Scilla bifolia* by HPLC-MS, *Revista de chimie* 65(3): 290-294, 2014
16. Benedec D., L. Vlase, D. Hanganu, I. Oniga, Antioxidant Potential and Polyphenolic Content of Romanian *Ocimum Basilicum*, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3):1263 - 1270, 2012.
24. Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. Biological activity of blackcurrant extracts (*Ribes nigrum* L.) in relation to erythrocyte membranes. *BioMed Research International*, 2014, Article ID 783059.
25. Borza Al. □i colab. *Dictionar etnobotanic*, Ed. Academiei R.S. Romania, 1968, pag.30.-31, 147, 149

26. Bota C., Deliu C. Effect of plant growth regulators on the production of flavonoids by cell suspension cultures of *Digitalis lanata*. *Farmacologia*, 2015, 63(5):716-719.
27. Bruneton P. -Pharmacognosie, Phytochimie. Plants medicinalis, ed. II. TEC-DOC Londra .Paris, New York, 1993, pag. 277-278,
30. Bush A. Paediatric problems of cough. *Pulm Pharmacol Ther* 2002; 15:309-15
31. Butnariu M. Detection of the polyphenolic components in *Ribes nigrum* L. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2014, 21(1): 11-14.
34. Cazzoletti L., Marcello Ferrari, Mario Olivieri, Giuseppe Verlato, Leonardo Antonicelli, Roberto Bono, Lucio Casali, Isa Cerveri, Pierpaolo Marchetti, Pietro Pirina, Andrea Rossi, Simona Villani, Roberto de Marco The gender, age and risk factor distribution differs in self-reported allergic and non-allergic rhinitis: a cross-sectional population-based study *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2015; 11: 36.
35. Cesaroni G, Badaloni C, Porta D, Forastiere F, Perucci CA. Comparison between various indices of exposure to traffic-related air pollution and their impact on respiratory health in adults. *Occup Environ Med*. 2008;65:683–690.
36. Chang C. Yang M., Wen H., Cem J. - Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food. Drug Anal.*, 2002, 10:178-182.
38. Chaulet P. After health sector reform, whither lung health. *International Journal of Tuberculosis Lung Disease*, 1998, 2 (S): 349–359.
39. Chikanza IC, Fernandes L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2000;9(7):1499–1510.
41. Christensen R, Bartels EM, Altman RD, et al. Does the hip powder of *Rosa canina* (rosehip) reduce pain in osteoarthritis patients? – a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; Apr 11
43. Chrubasik C., Roufogalis B.D., Müller-Ladner U., Chrubasik S. A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytotherapy Research*, 2008, 1, 22(6):725-33.
44. Cieckiewicz E , Angenot L , Gras T , Kiss R , Frédéric M, Potential anticancer activity of young *Carpinus betulus* leaves. University of Liège, CIRM, Laboratory of Pharmacognosy, Liège, Belgium. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* [2012, 19(3-4):278-283]
48. Constantino L. Albasini A., Rastelli G., Benvenuti S. Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Univ. di Modena, Italy - Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase, *Planta med*. 1992

50. Costea T., Istudor V., Gostin I., Olah N. - Researches upon indigenous herbal Products for therapeutic valorification in 7 metabolic diseases. Note II. Polyphenols analysis of Betulac Medicine in evolution, 2012, XVII (4):717-723.
51. Costea T., Istudor V., Gostin I., Olah N. - Researches upon indigenous herbal Products for therapeutic valorification in 7 • metabolic diseases. Note II. Polyphenols analysis of Betulac Medicine in evolution, 2012, XVII (4):717-723.
53. Costea T., L. Vlase, V. Istudor, M.I. Popescu, C.-e Gîrd, Researches Upon Indigenous Herbal Products for Therapeutic Valorification in Metabolic Diseases. Note Ii. Polyphenols Content, Antioxidant Activity And Cytoprotective Effect of Betulae Folium Dry Extract, Farmacia, 2014, 62(5):961-970 Aug. 58(4):342-4
56. Daels-Rakotoarison D.A., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Luyckx M., Dine T., Bailleul F., Cazin, M., Cazin J.C. - Effects of Rosa canina fruit extract on neutrophil respiratory burst. *Phytotherapy research*, 2002, 16(2):157-61
57. Dallenbach-Tolke K., Nyiredy S., Gross G.A., Sticker O. - Flavonoid glycosides from *Betula pubescens* and *Betula pendula*, *J.Nat. Prod.*, 1986, 49:1155-1156.
58. Dehelean C. A., Pânzaru S. C., Peev C. I., Soica C. Andal D. S., Characterisation of birch tree leaves, buds and bark dry extracts with antitumor activity, *Journal of Optoelectronics and Advanced Material*, 2007, 9(3) : 783-787.
59. Demirci B., Paper H.D., Demirci F., Baser K. C.H., Franz G. – Essential oil of *Betula pendula* Roth. buds. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2004, 1(3) : 301-303
62. EMEA – *Betula pendula* Roth, *Betula pubescens* Ehrh., folium, Assessment report for the development of community monographs and for inclusion of herbal substance (s), preparation (s) or combinations thereof in the list, Doc Ref EMEA/HMPC/260018/2006, London 2008
65. Eom HJ, Kang HR, Kim HK, Jung EB, Park HB, Kang KS, Kim KH. Bioactivity-guided isolation of antioxidant triterpenoids from *Betula platyphylla* var. *japonica* bark. *Bioorg Chem.* 2016 Apr 1;66:97-101.
66. Everett CF, Kastelik IL et al. Chronic persistent cough in the community: a questionnaire survey. *Cough*, 2007; 23, 3-5.
72. Freysdottir J., Sigurpalsson M.B., Omarsdottir S., Olafsdottir E.S., Vikingsson A., Hardardottir I. Ethanol extract from birch bark (*Betula pubescens*) suppresses human dendritic cell mediated Th1 responses and directs it towards a Th17 regulatory response in vitro. *Immunology letters*, 2011, 136(1):90-6.
75. Ganguly A. Das B. Ray A. Sen N., Dasgupta S.B. Mukhopadhyay S., Majumder K.H. - Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase, inhibits reactive oxygen species-

- mediated apoptotic topoisomerase I-ADN cleveable complex formation in prostate cancer cells, but does not affect the process of cell death, *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11848-11858.
76. Garcia - Vigueira C, Greenaway W, Whatley F. Composition of propolis from two different Spanish regions. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1992;47:634–637
80. Gibson GJ. Obesity, respiratory function and breathlessness. *Thorax*. 2000;55:S41–S44. Pub. Med
87. Grażyna Czaja-Bulsa, Michał Bulsa The natural history of IgE mediated wheat allergy in children with dominant gastrointestinal symptoms *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014; 10(1)
88. . Grigorescu E. și colab.-Index fitoterapeutic-Ed.Cantes-Iasi-2001,pag 419, 420, 520, 80
90. Guerra S, Sherrill DL, Martinez FD, Barbee RA. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:419–425.
100. Hwang SW, Oh U: Hot channels în airways: Pharmacology af the vanilloid receptor. *Curr Opin Pharmacol* 2:235-242, 2002.
101. HCS 13/2007 referitoare la aprobarea Ghidului privind procedura care trebuie urmată de deținătorii autorizației de punere pe piață în desfășurarea activităților de farmacovigilență
102. HCS 14/2007 privind aprobarea Ghidului privind cerințele pentru sistemele de farmacovigilență, monitorizarea conformității și inspecțiile de farmacovigilență
104. Volumul 9A din “Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Guidelines on Pharmacovigilance for Medicinal Products for Human Use, September 2008”.
105. Directiva 2001/83/EC, cu modificările și completările ulterioare
109. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and optic eczema: ISSAC. *Lancet* 1998; 351: 1225-32.
116. Jine Y., Lis M., Szczyпка M., Obminska-Mrukowicz B. – Influence of betulinic acid on lymphocytes subsets and humoral immune response in mice, *Polish Jurnal of Veterinary Sciences*, 2012, 15(2) : 303-313.
119. Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 1999,47: 3954–3962.
122. Katircioğlu H, Mercan N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5(11):1151–1153
125. Kilicgun H., Altiner D. Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*. *Pharmacognosy Magazine*, 2010, 6(23):238.
126. Kilicgun H., Dehen A. In vitro antioxidant effect of *Rosa canina* in different antioxidant test systems. *Pharmacognosy Research*, 2009, 1(6):417.

136. Kratchanova M., Denev P., Ciz M., Lojek A., Mihailov A. –Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of 2 extraction systems, *Acta Biochimica Polonica*, 2010, 57 (2) : 229-234
141. Lanata CF, Rudan I, Boschi-Pinto C, Tomaskovic L, Cherian T, Weber M, et al. Methodological and quality issues in epidemiological studies of acute lower respiratory infections in children in developing countries. *Int J Epidemiol*. 2004;33:1362–72
143. Lemanske R.F. Jr. , *J Allergy Clin Immunol* 2002.
146. Liu P, Kallio H, Yang B. Flavonol glycosides and other phenolic compounds in buds and leaves of different varieties of black currant (*Ribes nigrum* L.) and changes during growing season. *Food Chem*.2014;160:180–189. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.056.
148. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79: 727-47.
150. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*.1995;26(2):83–99..28. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins.*Food Chemistry*. 2004;84(3):329–339.
161. Mello CG, Irwin RS, Curley FJ: Predictive value of the character, timing and complications of chronic cough in diagnosing its cause. *Arch Intern Med* 156:997-1003, 1996.
162. Mei Lan K. Han, Dirkje Postma, David M. Mannino, Nicholas D. Giardino, Sonia Buist, Jeffrey L. Curtis, and Fernando J. Martinez "Gender and Chronic Obstructive Pulmonary Disease", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 176, No. 12 (2007), pp. 1179-1184.
175. Mösges R, Klimek L. Today's allergic rhinitis patients are different: new factors that may play a role. *Allergy*. 2007;62:969–975.
179. Murray and Nadel's, *Textbook of respiratory medicine*, fourth edition, Chung KF, Widdicombe JG, Cough, 29, 2005, 831-47.
180. Neacșu C.- Compendiu de apiterapie- ed. Tehnică, București 2002, pg.102-134
184. Nowak R., Gawlik-Dziki U. Polyphenols of *Rosa L.* leaves extracts and their radical scavenging activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2007, 62(1-2):32-8.
188. Orodan M., Laurian V., Istudor V.- Analysis of sterolic compounds from vegetal extracts of *Ribes nigrum*, *Rosa canina*, *Betula pubescens*, *Carpinus betulus*, *Viburnum lantana* and Propolis tincture *Fiziologia*-2015.252(86)
186. Olteanu I., Totul despre hiperreactivitatea bronșică

189. Orodan M., Vodnar D.C., Toiu A.M., Pop C.E., Vlase L., Istudor V. Arsene A.L.- Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant effect of some gemmotherapeutic remedies used in respiratory diseases- *Revista Farmacia*, 2016 Vol.64, 2
192. Papay V., Toth L., Soltesz M., Nagy E. and Litkei G. (1985), Flavonoids and Bioflavonoids Symposium Proc. 7th Hungarian Bioflavonoids Symposium, Szeged, Hungary. *Studies in organic chemistry* 23 (L. Farkas et al., ed.), 233-240, Elsevier, Amsterdam 1986.
193. Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2009, 2(5): 270-278.
197. Peev C. I., Vlase L., Antal D. S., et al. Determination of some polyphenolic compounds in buds of *Alnus* and *Corylus* species by HPLC. *Chemistry of Natural Compounds*, 2007, 43(3): 259-262.
198. Pitera F. - Compendiu de gemoterapie clinică - Ed. Fundația creștină de homeopatie Simile Constanța, 2000.-pg-36 -38, 42, 52, 53, 74, 76, 86, 87, 148-150, 161, 231-233, 235, 274
204. Pop G.; Galuscan A; Peev C; Militaru A; Vlase L; Ardelean L; Rusu LC, HPLC-MS Identification of Sterol Fractios from Vegetable Oil, *REVISTA DE CHIMIE* 63(10):1046-1050, 2012
205. Popravco S A. 1976. Plant sources of *propolis*. *Pchelovodstvo* 97:21-23. In e. CRANE, Bees and beekeeping-science, Practice and World Resources 1990.
216. Salvat A., Antonacci L., Fortunato R.H., Suarez E.Y., Godo H. M. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plants species from Northern Argentina. *Phytomedicine*, 2004, 11:230-234.
219. Schikov A.N., Djachuk G.I., Sergeev D.V., Pozharitskaya O.N., Esaulenko V., Kosman V.M., Makarov V.G. – Birch bark extract as therapy for chronic hepatitis C. – a pilot study, *Phytomedicine*, 2011, 18(10) : 807-810.
220. Serafim L.(1994) - Propolis and Pollen as associate treatment in atherosclerosis, in “*Apitherapy in Romania*”, *Apimondia Publishing House*, Bucharest, 144-164
221. Schneider F.,Bunu C.,Tănăsie G.,Mederle C.,Păunescu V.,: Human bronchial responsiveness. Local mechanisms of modulation; *Fiziologia. Physiology*; 3 ; 1996; 26:7-12.
230. Shakibaei M, De Souza P. Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biology International*. 1997;21(2):75–86.
232. Sharma V. K., GG Sethuraman, Adverse cutaneous reactions to drugs: an overview Department of Dermatology, Venereology and Leprology, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India., India, Year : 1996 | Volume : 42 | Issue : 1 | Page : 15-22

238. Suzutani T., Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M, Knox YM - *Phytoter Res.*,- Anti-herpes activity of an extract of *Ribes nigrum* L. 2003 Jun;17(6):609-13
240. Tabart J, Franck T, Kevers C, Pincemail J, Serteyn D, Defraigne JO, Dommes J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. *Food Chem.* 2012;131:1116–1122. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.076.
249. Tetau M.-Gemmotherapy,a clinical guide edition du details inc
250. Trease and Evans-Pharmacognosy-Ed.Saunders 1996-Viburnum opulus-pag.478
- 272.Wilkinson D., Hollander S.A comparison of drug literature coverage by Index Medicus and Drug Literature Index.,*Bull Med Libr Assoc.* 1973 Oct;61(4):431-2.
273. Willich SN, Rosnagel K, Roll S, et al. Rose hip herbal remedy in patients with rheumatoid arthritis—a randomised controlled trial. *Phytomedicine.* 2010;17(2):87–93.
279. XXX - Farmacopeea Română, Ed. a X-a, Ed. Medicală, București, 1993.
280. xxx - PDR for Herbal Medicine third Edition. Editura Thompson, 2005, p.81-82,94,97, 260 675-676, 765-766.:
288. Zhao G, Yan W., Cao D.- Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43(3): 959-962.