
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Potențialul terapeutic al *Craterellus cornucopioides* L. : O analiză detaliată a compoziției chimice și proprietăților medicinale

Doctorand **Mariana-Gabriela Bumbu**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Ioan Marcus**



INTRODUCERE

Ciupercile medicinale sunt recunoscute de mult timp ca fiind rezervoare valoroase de compuși biologic activi, iar potențialul lor de a contribui la terapiile moderne a atras un interes științific tot mai mare. *Craterellus cornucopioides* L. (cunoscută sub numele de trompeta piticului) este o ciupercă comestibilă din familia *Cantharellaceae*, foarte apreciată culinar, însă bogăția sa fitochimică și potențialul farmacologic rămân încă incomplet caracterizate. Studii recente asupra diverselor specii de ciuperci indică faptul că extractele derivate din ciuperci pot oferi diverse bioactivități inclusiv efecte antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene și hepatoprotectoare făcându-le candidați promițători pentru descoperirea de medicamente și dezvoltarea de nutraceutice. Cu toate acestea, în ceea ce privește *C. cornucopioides* în mod specific, investigațiile sistematice și riguroase care combină profilarea chimică cuprinzătoare cu bioanalize mecaniciste sunt încă limitate.

Această teză abordează această lacună prin furnizarea unui studiu a acestei ciuperci, combinând biochimia cu evaluarea farmacologică *in vitro* și *in vivo*. Lucrarea își propune în primul rând să elucideze compoziția chimică a extractelor de *C. cornucopioides* folosind tehnici cromatografice și spectrofotometrice, identificând și cuantificând astfel compușii fenolici majori, derivații cafeici și alți metaboliți relevanți. În paralel cu analiza compoziției, studiul evaluează capacitățile antioxidante (prin teste precum DPPH, ABTS, ORAC și CUPRAC), activitatea antimicrobiană (microdiluție în bulion și metode conexe) și efectele citotoxice în modele celulare. Se pune un accent deosebit pe potențialul hepatoprotector, examinat atât prin teste celulare, cât și prin modele experimentale care evaluează leziunile hepatice.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată "*Potențialul terapeutic al Craterellus cornucopioides* L.: O analiză detaliată a compoziției chimice și proprietăților medicinale" este structurată în două părți principale, și anume: Partea I – Stadiul actual al cunoașterii, respectiv Partea a II-a – Contribuția personală.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte este alcătuită din trei capitole și oferă o sinteză a informațiilor actuale privind compoziția chimică și proprietățile biologice ale ciupercii *Craterellus cornucopioides*. Aceasta este urmată de o prezentare a principalelor modele experimentale utilizate în studiile *in vivo* pe ciuperci, precum și de o analiză a rolului compușilor fenolici în manifestarea activităților biologice.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea a II-a cuprinde 3 studii unde sunt prezentate ipoteza de lucru și obiectivele principale ale cercetării, materialele și metodele utilizate în vederea atingerii obiectivelor propuse, rezultatele obținute, discuțiile, concluziile și recomandările, precum și elementele de originalitate ale tezei.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE PRINCIPALE ALE TEZEI

Ipoteza cercetării se bazează pe faptul că extractele din ciuperca sălbatică *Craterellus cornucopioides* (L.) obținute din trei regiuni geografice distincte din România (Cluj, Sălaj și Suceava) conțin compuși biologic activi capabili să exercite multiple efecte farmacologice (hepatoprotectoare, antioxidante, antimicrobiene, citotoxice și antiparazitare) ale căror intensitate și specificitate sunt influențate de condițiile de mediu, iar variațiile structurale și cantitative ale metaboliților bioactivi între regiuni determină diferențe în potențialul terapeutic, scopul acestei teze fiind cuantificarea acestor efecte prin teste *in vitro* și *in vivo* și corelarea lor cu profilul biochimic al fiecărui extract.

Pentru a îndeplini scopul stabilit, obiectivele principale au fost structurate astfel:

01. Caracterizarea profilului compușilor biochimici obținuți din extractele de *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers. prin determinări cantitative și calitative, evaluarea *in vitro* a potențialului antioxidant prin metode complementare și corelarea acestora cu analiza parametrilor edafici ai solului din cele trei locații de recoltare.

02. Evaluarea *in vitro* a efectului antimicrobian, citotoxic și antiparazitar al extractelor obținute din *Craterellus cornucopioides* L..

03. Investigarea *in vivo* a potențialului efect hepatoprotector și antioxidant al extractelor obținute din *Craterellus cornucopioides* L. într-un model experimental de hepatotoxicitate acută.

STUDIILE CERCETĂRII

Studiul 1 - Studiu integrat privind extractele din *Craterellus cornucopioides* L.: caracterizare fizico-chimică, activitate antioxidantă și analiza solului din zonele de recoltare

Activitățile de cercetare ale studiului:

- Recoltarea și obținerea extractelor etanolice din ciuperci;
- Protocolul de eșantionare și metodele analitice pentru determinarea parametrilor edafici ai solului;
- Profilul nutrițional și conținutul energetic al probelor de ciuperci.
- Dozarea fotometrică a compușilor bioactivi din extracte;
- Analiza cromatografică HPLC-DAD-ESI⁺ cu identificarea compușilor fenolici;
- Evaluarea activității antioxidante a extractelor de *C. cornucopioides* prin metodele DPPH, ORAC, CUPRAC, ABTS și FRAP;

Rezultatele studiului:

❖ Analiza indicatorilor edafici fundamentali în probele de sol

Analiza solurilor din Cluj, Suceava și Sălaj a evidențiat condiții predominant acide, cu pH variind de la puternic acid la moderat acid în funcție de adâncime și locație, ceea ce influențează creșterea și diversitatea fungilor. Conținutul de humus și azot este cel mai ridicat în stratul de litieră, scăzând semnificativ la adâncimi de 15 și 30 cm, Suceava prezentând cea mai bună retenție a materiei organice și a azotului. Fosforul și potasiul mobil sunt, de asemenea, concentrați în stratul superficial, scăzând odată cu adâncimea, ceea ce indică o disponibilitate redusă a nutrienților pentru rădăcini și micoriză în straturile mai adânci.

❖ Compoziția nutrițională și valoarea energetică a probelor de ciuperci

Tabel 1

Compoziția nutrițională și valoarea energetică a probelor de *Craterellus cornucopioides* L. recoltate din județul Suceava în anii 2018, 2022 și 2023, județul Sălaj în anul 2022 și județul Cluj în anul 2022.

Potențialul terapeutic al *Craterellus cornucopioides* L. : O analiză detaliată a compoziției chimice și proprietăților medicinale

Probe <i>C. cornucopioides</i> L.	Umiditate (mg/g)	Grăsimi totale (mg/g)	Proteină (mg/g)	Cenușă (mg/g)	Carbhidrați (mg/g)	Energie (kcal/100 g)
Suceava 2018	118.4±0.2	34.8±0.5	465±1.0	127.9±0.4	253.9±0,7	318.88±0,05
Suceava 2022	106.3±1.5	41.4±0.1	473.2±0.8	98.7±0.1	280.4±1.0	338.7±0,09
Suceava 2023	129±0.2	25.8±0.7	462.1±0.5	91.5±0,2	291.6±0,4	324.7±0,03
Sălaj 2022	125.3±0.3	39.4±0.2	467.1±0.7	104±0.2	264.2±0,4	327.98±0,04
Cluj 2022	103.1±0.2	34.6±0.1	469.7±1.2	95.5±0.1	297.1±0,3	337.86±0,02

❖ **Conținutul total de polifenoli și acizi carboxilici**

Tabel 2

Conținutul total de polifenoli și de derivați ai acidului cafeic în extractele de *C. cornucopioides*

Extract analizat	TPC (mg GAE/g+SD)	TPAC (mg CAE/g+SD)
<i>C.C. Cluj 2022</i>	23.21 ± 0.21	15.96 ± 0.14
<i>C.C. Sălaj 2022</i>	23.01 ± 0.02	16.05 ± 0.45
<i>C.C. Suceava 2022</i>	28.74 ± 0.25	19.74 ± 0.26
<i>C.C. Suceava 2023</i>	26.64 ± 0.36	18.64 ± 0.26

* Notă: Fiecare valoare reprezintă media ± SD a trei măsurători independente.

❖ **Identificarea compușilor fenolici prin HPLC-DAD-ESI+**

Au fost identificați 8 compuși aparținând la doua subclase diferite. Acizii hidroxibenzoici au fost reprezentați de acidul galic, acidul gentisic, acidul protocatehuic și acidul p-Hidroxibenzoic. Subclasa acizilor hidroxicinamici a fost reprezentată de acidul clorogenic, acidul cafeic, acidul ferulic și acidul p-Coumaric.

În extractul din Cluj din 2022, cea mai mare concentrație de compuși fenolici, exprimată în echivalent GAE, a fost observată pentru acidul gentisic (757,590 μg/mL), urmată de acidul protocatehuic (194,302 μg/mL), iar cea mai scăzută concentrație a fost pentru acidul ferulic (29,545 μg/mL). În extractul din Sălaj din 2022, acidul gentisic a prezentat din nou cea mai mare cantitate de GAE (659,743 μg/mL), urmat de acidul p-hidroxibenzoic (324,410 μg/mL), în timp ce acidul galic a avut cea mai mică concentrație (20,616 μg/mL). În extractele din Suceava, atât pentru 2022, cât și pentru 2023, cea mai mare cantitate de GAE a fost înregistrată pentru acidul gentisic (842,946 μg/mL și respectiv 805,770 μg/mL), urmată de acidul protocatehuic (377,504 μg/mL și 439,365 μg/mL). Cea mai scăzută concentrație de GAE a fost detectată în acidul galic pentru Suceava 2022 (51,844 μg/mL) și în acidul ferulic pentru Suceava 2023 (37,515 μg/mL).

❖ **Activitatea antioxidantă**

Tabel 3

Activitatea antioxidantă a celor 4 extracte de *C. cornucopioides* (media $\pm$ dev.std)

Extract analizat	DPPH (μ M TE/g)	FRAP (μ M TE/g)	CUPRAC (μ M TE/g)	ORAC (μ M TE/g)	ABTS (μ M TE/g)
<i>C.C. Cluj 2022</i>	13.01 $\pm$ 2.08	30.60 $\pm$ 0.25	157.61 $\pm$ 32.02	133.75 $\pm$ 0.49	34.78 $\pm$ 2.20
<i>C.C. Sălaj 2022</i>	8.31 $\pm$ 2.21	29.83 $\pm$ 1.98	83.13 $\pm$ 9.45	123.96 $\pm$ 2.93	32.28 $\pm$ 3.14
<i>C.C. Suceava 2022</i>	23.03 $\pm$ 1.34	24.47 $\pm$ 8.28	258.31 $\pm$ 12.89	147.06 $\pm$ 2.92	48.05 $\pm$ 1.26
<i>C.C. Suceava 2023</i>	12.98 $\pm$ 0.61	20.97 $\pm$ 3.38	185.62 $\pm$ 13.42	132.77 $\pm$ 2.72	38.68 $\pm$ 0.63

Studiul 2 - Evaluarea *in vitro* a efectelor antimicrobiene, citoprotectoare și antihelmintice ale extractelor din *Craterellus cornucopioides* L. asupra tulpinilor bacteriene și fungice, culturilor celulare LX1 și helminților intestinali *Toxocara canis*

Activitățile de cercetare ale studiului:

- Testarea potențialului antimicrobian al extractelor din ciuperci;
- Evaluarea viabilității celulare prin testul CCK-8 pe linia LX1;
- Evaluarea *in vitro* a extractelor fungice asupra ouălor de *Toxocara canis*.

Rezultatele studiului:

❖ Activitatea antimicrobiană și antifungică prin metoda zonei de inhibiție

Extracetele au demonstrat cea mai puternică activitate împotriva bacteriilor Gram-pozitive, cum ar fi *B. cereus*, MSSA și MRSA, în timp ce bacteriile Gram-negative, *E. coli* și *P. aeruginosa*, au fost mai rezistente. Lipsa completă a efectului împotriva *P. aeruginosa* evidențiază rezistența sa la extractele de ciuperci, în timp ce activitatea împotriva MRSA sugerează că extractele pot conține compuși cu potențial împotriva stafilococilor rezistenți la antibiotic (Tabel 4). Activitatea antifungică a extractelor împotriva *C. albicans* a prezentat o inhibare moderată, toate cele patru extracte prezentând zone de inhibare de 10,00 $\pm$ 0,00 mm. Acest lucru indică faptul că extractele au un potențial antifungic. Fluconazolul a produs o zonă de inhibare semnificativ mai mare, de 21,00 $\pm$ 0,00 mm, confirmând eficacitatea sa antifungică superioară (Tabel 5).

Tabel 4

Activitatea antimicrobiană a extractelor de cercetat prin metoda zonei de inhibiție (mm) și deviația standard

Extract	MSSA	MRSA	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Potentialul terapeutic al *Craterellus cornucopioides* L. : O analiză detaliată a compoziției chimice și proprietăților medicinale

Cluj 2022	15.75±0.4 3	15.00±0.0 0	16.00±0.0 0	11.75±0.4 3	11.00±0.0 0	10.00±0.0 0	0
Sălaj 2022	15.00±0.0 0	14.25±0.4 3	16.75±0.8 3	9.00±0.00	14.25±0.4 3	9.00±0.00	0
Suceava 2022	16.50±0.5 0	15.25±0.4 3	17.00±0.7 1	10.75±0.4 3	10.00±0.0 0	9.00±0.00	0
Suceava 2023	15.00±1.0 0	14.25±0.4 3	17.00±0.0	16.50±0.5 0	14.00±1.0 0	9.00±0.00	0
Gentamicină	19.00±0.0 0	17.00±0.2 5	20.00±0.0 0	10.00±0.0 0	22.00±0.5 0	19.00±0.0 0	18.00±0.0 0

Tabel 5

Activitatea antimicrobică a extractelor de cercetat prin metoda zonei de inhibiție (mm) și deviația standard

Extract	<i>Candida albicans</i>
Cluj 2022	10.00±0.00
Sălaj 2022	10.00±0.00
Suceava 2022	10.00±0.00
Suceava 2023	10.00±0.00
Fluconazol	21.00±0.00

❖ **Activitatea antimicrobiană prin metoda microdiluției în bulion**

Valorile MIC și MBC/MFC obținute pentru extractele testate indică o activitate antimicrobiană variabilă în funcție de proveniența probei și de microorganismul țintă. Extractul din Cluj 2022 a prezentat cea mai bună activitate antibacteriană generală, cu valori MIC cuprinse între 0,23–0,93 mg/mL, evidențiind o inhibiție eficientă asupra tulpinilor de MSSA și MRSA, precum și asupra *Bacillus cereus*. Extractul din Sălaj 2022 a arătat o activitate comparabilă, menținând valori similare ale MIC și MBC, în special față de MSSA, unde efectul bactericid apare la aceeași concentrație (0,23 mg/mL), sugerând o acțiune rapidă și potentă. Extractele din Suceava 2022 au avut o eficiență mai scăzută, necesitând concentrații mai mari pentru inhibiția bacteriană (MIC 0,29–1,16 mg/mL), în timp ce Suceava 2023 a demonstrat o activitate îmbunătățită, mai ales împotriva MSSA, MRSA și *Bacillus cereus* (MIC 0,27–0,54 mg/mL). În cazul *Candida albicans*, toate extractele au avut valori ale MFC >0,93–1,16 mg/mL, ceea ce indică o activitate antifungică slabă comparativ cu fluconazolul (MIC 8 mg/L). Comparativ cu gentamicina (MIC 3–4 mg/L), extractele prezintă o activitate mai redusă, dar relevă un potențial antimicrobian natural semnificativ, în special în probele din Cluj și Sălaj.

❖ **Activitatea antimicrobiană anti-biofilm**

Rezultatele evidențiază faptul că extractele au demonstrat o activitate antibiofilm dependentă de tulpină și de timp. Cele mai puternice și mai consistente efecte au fost observate împotriva MSSA, unde toate extractele au rămas active după 48 de ore.

Extractul Cluj 2022 a prezentat, de asemenea, o activitate tardivă promițătoare împotriva MRSA. În contrast, *E. coli* a prezentat cea mai mare rezistență, cu o inhibare slabă observată la 48 de ore. Aceste rezultate sugerează că anumite extracte de ciuperci, în special în extractele din Cluj și Suceava 2023, își păstrează sau chiar îmbunătățesc potențialul antibiofilm pe măsură ce biofilmul se maturizează, prezentând în unele cazuri activități comparabile cu controlul antibiotic, gentamicina.

❖ Evaluarea citotoxicității extractului prin metoda CCK-8

Rezultatele testului CCK-8 au evidențiat un efect antiproliferativ dependent de concentrație al extractului de *Craterellus cornucopioides*, manifestat prin scăderea valorilor de absorbanță odată cu creșterea concentrației. Cele mai pronunțate efecte citotoxice au fost observate la concentrațiile de 2,5 mg/mL (pentru extractul de 50 mg/mL) și 15 mg/mL (pentru extractul de 200 mg/mL), însă, per ansamblu, toate concentrațiile testate au prezentat o citotoxicitate mai redusă decât martorul. Determinarea IC_{50} nu a indicat o inhibare a creșterii celulare de 50%, ceea ce sugerează o toxicitate scăzută a extractului asupra celulelor hepatice LX1. Prin urmare, se poate concluziona că extractul de *C. cornucopioides* exercită un efect antiproliferativ modest, fără a fi considerat citotoxic în intervalul de concentrații testat (Figura 1).

Figura 1

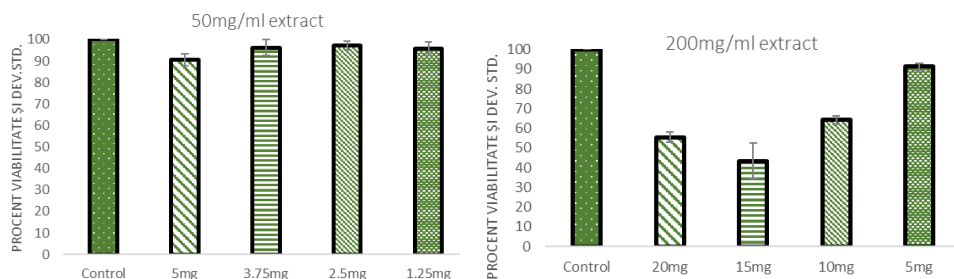


Fig 1. Viabilitatea celulară a liniei celulare LX1 exprimată ca și media $OD_{450} \pm SD$ după tratamentul cu extract de *C. cornucopioides* în concentrație de 50mg/ml și 200mg/ml

❖ Evaluarea efectului antiparazitar

La compararea eficacității extractelor provenite din Sălaj și Suceava, Cluj și Suceava, precum și Cluj și Sălaj, nu s-au înregistrat diferențe semnificative statistic la finalul perioadei de evaluare ($p > 0,05$). Acest rezultat sugerează că, deși au existat variații minore în efectele ovicide și larvicide între extracte, activitatea antiparazitară globală s-a menținut similară între regiunile analizate. Analiza comparativă în funcție de momentul evaluării a evidențiat o diferență semnificativă statistic între zilele 7 și 10 ($p < 0,05$), în timp ce diferențele dintre zilele 3 și 7 până la 10 nu au fost semnificative ($p > 0,05$). Prin urmare, se poate concluziona că cea mai pronunțată variație a eficacității extractelor apare între zilele 7 și 10 de expunere.

Studiul 3 - Determinarea *in vivo* a potențialului efect hepatoprotector și antioxidant al extractelor din *Craterellus cornucopioides* L. în hepatotoxicitatea indusă de tetraclorura de carbon (CCl₄) la șoarecii din linia BALB/c

Activitățile de cercetare ale studiului:

- obținerea modelelor experimentale eficiente și predictibile de leziune hepatică acută, *in vivo*, la șoarecii BALB/c, prin administrarea tetraclorurii de carbon;
- Tabel 6. organizarea grupurilor experimentale

Grupuri experimentale	Protocol de administrare
I Control - (n=5)	0.2 mL soluție salină (NaCl) 0.9% p.o timp de 6 săptămâni 3x/săptămână
II Control + (n=5)	0.2 mL ulei CCl ₄ p.o. timp de 6 săptămâni 3x/săptămână
III Ac. Clor. (n=5)	0.2 mL ulei CCl ₄ + 0.2 mL Acid clorogenic p.o. timp de 6 săptămâni 3x/săptămână
IV Crat 50(n=5)	0.2 mL ulei CCl ₄ + 0.2 mL extract <i>Craterellus cornucopioides</i> L. 50mg/kg p.o. timp de 6 săptămâni 3x/săptămână
V Crat 200(n=5)	0.2 mL ulei CCl ₄ + 0.2 mL extract <i>Craterellus cornucopioides</i> L. 200mg/kg p.o. timp de 6 săptămâni 3x/săptămână
VI Control - (n=5)	0.2 mL soluție salină (NaCl) 0.9% p.o doză unică
VII Toxi (n=5)	0.2 mL extract <i>Craterellus cornucopioides</i> L. 2000mg/kg p.o. doză unică

- evaluarea efectului hepatoprotector si toxic al extractelor prin determinarea parametrilor biochimici;
- analiza histopatologică a țesutului renal și hepatic.

Rezultatele studiului:

- ❖ Administrarea CCl₄ a indus leziuni hepatice severe, evidențiate prin inflamație nodulară multifocală, degenerare vacuolară și steatoză micro- și macroveziculară, asociate cu congestie și dilatare vasculară, în timp ce rinichii nu au prezentat modificări patologice semnificative. Tratamentul cu extractul de *Craterellus cornucopioides* a demonstrat un efect hepatoprotector dependent de doză, reducând progresiv severitatea leziunilor. La doza de 50 mg/kg s-a observat diminuarea infiltratului inflamator și a necrozei, menținerea activității macrofagelor și o regenerare parțială a arhitecturii hepatice. Efectele cele mai evidente s-au înregistrat la doza de 200 mg/kg, unde structura hepatică a fost aproape complet restabilită, inflamația și degenerarea celulară au fost minime, iar steatoza și acumularea de pigment biliar s-au redus semnificativ (Figura 2).

Figura 2

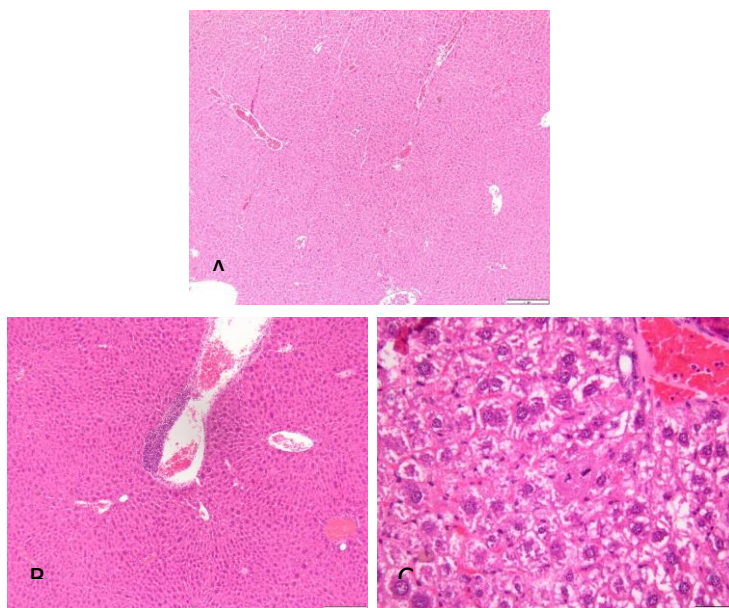


Fig 2. Aspecte histopatologice ale parenchimului hepatic în diferitele loturi experimentale. (A) Control (șoarece nr. 3, HE)—aspect histologic normal al țesutului hepatic, SH=0; (B) Crat 50 (șoarece nr. 1, HE)— focar inflamator perivascular izolat, reacție inflamatorie ușoară, SH=2; (D) Crat 200 (șoarece nr. 1, HE)— degenerescență vacuolară, congestie și necroză focală, SH=3; HE—colorație Hematoxilina-eozină. SH—scor histopatologic.

- ❖ administrarea extractului la doza maximă testată de 2000 mg/kg nu a produs efecte toxice evidente, indicând o bună toleranță și siguranță a acestuia. Animalele tratate și-au menținut starea fiziologică normală și au prezentat chiar o creștere ușoară, dar semnificativă statistic, a greutateii corporale comparativ cu grupul martor ($p < 0,05$), ceea ce sugerează absența oricărei toxicități sistemice și un profil de siguranță favorabil al extractului (Tabel 7).

Potentialul terapeutic al *Craterellus cornucopioides* L. : O analiză detaliată a compoziției chimice și proprietăților medicinale

Tabel 7. parametrii biochimici ai șoarecilor BALB/c după administrarea extractului de *Craterellus cornucopioides* la 2000 mg/kg (toxicitate acută)

	T1	T2	T3	T4	T5	Media	Dev. Std	ref	Unit
ALB	2.8	2.9	2.7	3	3	2.88	0.1304	2.5-4.8	g/dl
TP	4.8	4.9	5.5	5.8	5.6	5.32	0.4438	3.5-7.2	g/dl
GLOB	2	2.1	2.8	2.8	2.7	2.48	0.3962	0.6	g/dl
A/G	1.36	1.39	0.99	1.05	1.12	1.182	0.1824		
TB	0.2	0	0.9	0	0.3	0.28	0.3701	0.1-0.9	mg/dl
ALT	91	187	266	223	136	180.6	69.19	40-189	U/l
ALP	149	131	117	166	158	144.2	20.02	66-262	U/l
AMY	1897	1539	1920	1706	1815	1775	156.5	220-2000	U/l
Crea	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.16	0.05477	0.1-0.3	mg/dl
Urea	34.19	34.11	46.44	39.14	36.4	38.06	5.117	32.82-39.66	mg/dl
U/C	170.95	170.55	no	no	182,000	174.5	6.498		
GLU	307.96	176.5	189.94	179.72	184.54	207.7	56.26	196-278	mg/dl
Ca	9.76	9.3	9.23	9.38	9.32	9.398	0.2093	7.9-10.5	mg/dl
Phos	8.1	7.5	6.28	7.56	6.79	7.246	0.713	5.6-9.2	mg/dl
K	5.54	5.58	6.98	6.75	5.4	6.05	0.7514	5.7-11.1	mmol/dl
Na	149.4	149.3	147.8	149.4	148.7	148.9	0.6907	136-157	mmol/dl

- ❖ Tratamentul a redus nivelurile serice de bilirubină, GGT, ALT, ALP și TBA, sugerând recuperarea integrității hepatocelulare, îmbunătățirea fluxului biliar și normalizarea funcției excretoare.

RECOMANDĂRI

1. Realizarea de studii *in vitro* și *in vivo* la multiple concentrații ale extractului, în vederea determinării indicelui terapeutic optim și a raportului doză–efect;
2. Desfășurarea de investigații *in vitro* pe diverse tipuri de probe biologice, pentru identificarea și caracterizarea completă a proprietăților farmacologice (antioxidante, antiinflamatoare, antimicrobiene și citoprotectoare);
3. Efectuarea de studii suplimentare *in vitro* pe culturi celulare hepatice standardizate, pentru confirmarea și aprofundarea efectelor citoprotectoare și regenerative observate în testele *in vivo*;
4. Realizarea de investigații *in vivo*, atât experimentale, cât și clinice, pentru evidențierea și consolidarea efectului hepatoprotector și pentru susținerea includerii extractelor de *C. cornucopioides* ca adjuvanți în tratamentul patologiei hepatice;
5. Continuarea cercetărilor, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, pentru determinarea precisă a mecanismelor moleculare și a locurilor de acțiune;

6. Evaluarea profilului toxicologic și de siguranță al extractului la doze repetate și pe termen lung, în vederea stabilirii unei eventuale aplicabilități clinice;
7. Extinderea studiilor către alte proprietăți biologice potențiale (antiparazitare, antitumorale, imunomodulatoare), care ar putea susține utilizarea acestei ciuperci ca sursă valoroasă de compuși bioactivi naturali.

Elementele de originalitate ale tezei

Cercetarea de față oferă elemente inovative și reprezintă primul studiu în care se evaluează efectele biologice ale ciupercii *Craterellus cornucopioides* în patologia hepatică. Astfel, s-a demonstrat că aceste ciuperci posedă proprietăți antioxidante și hepatoprotectoare în injuria hepatică acută indusă *in vitro* și *in vivo*.

Aceste constatări ar putea încuraja utilizarea plantelor medicinale ca adjuvanți în tratamentul hepatopatiilor atât la oameni, cât și la animalele de companie.

Totodată, această lucrare evidențiază pentru prima dată efectul antiparazitar împotriva formelor larvare ale *Toxocara canis*, îndemnând folosirea compușilor fitochimici ca adjuvanți ai antiparazitarelor, contribuind la reducerea rezistenței antiparazitare.