

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala doctorală Biologie Integrativă

Teză de doctorat

Evaluarea potențialului antioxidant la extracte vegetale de

Plantago, Galium și Hypericum

- Rezumat -

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Marcel PÂRVU

Student-doctorand:

Anca-Daniela FARCAȘ

Cluj-Napoca,

2020

Cuprins

| | |
|--|----|
| Listă de abrevieri..... | 6 |
| Prefață..... | 10 |
| Scopul studiului..... | 11 |
| I. Date din literatură | |
| 1.1. Caracteristici biologice ale unor specii de <i>Plantago</i> | 13 |
| 1.1.1. Încadrare sistematică și speciație..... | 13 |
| 1.1.2. Morfologie și ultrastructură..... | 14 |
| 1.1.3. Compoziție chimică..... | 17 |
| 1.1.4. Efecte terapeutice | 21 |
| 1.2. Caracteristici biologice ale unor specii de <i>Galium</i> | 27 |
| 1.2.1. Încadrare sistematică și speciație..... | 27 |
| 1.2.2. Morfologie și ultrastructură..... | 27 |
| 1.2.3. Compoziție chimică..... | 31 |
| 1.2.4. Efecte terapeutice | 32 |
| 1.3. Caracteristici biologice ale unor specii de <i>Hypericum</i> | 35 |
| 1.3.1. Încadrare sistematică și speciație..... | 35 |
| 1.3.2. Morfologie și ultrastructură..... | 36 |
| 1.3.3. Compoziție chimică..... | 36 |
| 1.3.4. Efecte terapeutice | 38 |
| 1.4. Fiziologia și patologia stresului oxidativ | 41 |
| 1.4.1. Tipuri și forme | 41 |
| 1.4.2. Mecanisme celulare și moleculare ale stresului..... | 42 |
| 1.4.3. Stresul oxidativ și antioxidanții în toxicitatea ovariană..... | 45 |
| II. Contribuție personală | |
| 2.1 .Materiale și metode de cercetare | 48 |
| 2.1.1. Obținerea extractelor vegetale..... | 48 |
| 2.1.1.1. Extracte de <i>Plantago</i> | 48 |
| 2.1.1.2. Extract de <i>Galium verum</i> | 48 |
| 2.1.1.3. Extract de <i>Hypericum capitatum</i> | 48 |
| 2.1.2. Metode de determinare a compoziției chimice a extractelor..... | 49 |
| 2.1.2.1. Analiza HPTLC..... | 49 |
| 2.1.2.2. Analiza HPLC-DAD..... | 49 |
| 2.1.2.3. Analiza de rezonanță electroparamagnetică de spin (RES)..... | 50 |
| 2.1.3. Determinarea activității antioxidante la extracte vegetale..... | 51 |

| | |
|--|----|
| 2.1.3.1. Metoda DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)..... | 51 |
| 2.1.3.2. Metoda TEAC (trolox equivalents antioxidant capacity)..... | 51 |
| 2.1.3.3. Metoda FC (Folin- Ciocâlțeu)..... | 52 |
| 2.1.3.4. Metoda β -caroten..... | 52 |
| 2.1.4. Determinarea activității prooxidante a extractelor vegetale..... | 52 |
| 2.1.5. Evaluarea potențialului de regenerare <i>in vitro</i> la extractul de <i>Plantago</i> | 53 |
| 2.1.5.1. Mediul de cultură | 53 |
| 2.1.5.2. Măsurarea distanței de migrare celulară..... | 53 |
| 2.1.6. Evaluarea potențialului antioxidant și antiinflamator, la extracte vegetale, cu model experimental pe șobolan..... | 54 |
| 2.1.6.1. Modele biologice de stres la șobolan..... | 54 |
| 2.1.6.1.1. Model de inflamație sistemică de tip acut..... | 57 |
| 2.1.6.1.2. Model de stres neuropsihic | 57 |
| 2.1.6.1.3. Gonadotoxicitate indusă cu ciclofosamidă (CPA) | 58 |
| 2.1.6.2. Animale și etica cercetării..... | 58 |
| 2.1.6.3. Design experimental..... | 59 |
| 2.1.6.4. Markerii de stres oxidativ și inflamație..... | 62 |
| 2.1.6.5. Parametri hematologici..... | 64 |
| 2.1.6.6. Markerii hormonali..... | 64 |
| 2.1.6.7. Markerii hepatici și renali..... | 64 |
| 2.1.6.8. Markerii moleculari..... | 65 |
| 2.1.6.9. Analize histologice și ultrastructurale..... | 65 |
| 2.1.6.10. Docking molecular la flavonoide..... | 66 |
| 2.1.7. Analiză statistică..... | 66 |
| 2.1.8. Reactivi și standarde..... | 66 |
| 2.2. Rezultate și discuții | |
| 2.2.1. Caracteristici biologice ale unor extracte de <i>Plantago</i> | 67 |
| 2.2.1.1. Compoziție chimică | 67 |
| 2.2.1.2. Activitate antioxidantă | 70 |
| 2.2.1.3. Activitate prooxidantă | 70 |
| 2.2.1.4. Evaluarea potențialului regenerativ <i>in vitro</i> | 71 |
| 2.2.1.5. Activitate antioxidantă și antiinflamatoare <i>in vivo</i> | 72 |
| 2.2.1.6. Activitate estrogeno-mimetică a flavonoidelor..... | 78 |
| 2.2.1.7. Concluzii | 88 |
| 2.2.2. Caracteristici biologice ale extractului de <i>Galium verum</i> | 90 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.2.1. Compoziție chimică | 90 |
| 2.2.2.2. Activitate antioxidantă și prooxidantă..... | 94 |
| 2.2.2.3. Activitate antioxidantă <i>in vivo</i> | 96 |
| 2.2.2.4. Concluzii..... | 101 |
| 2.2.3. Caracteristici biologice ale extractului de <i>Hypericum capitatum</i>..... | 102 |
| 2.2.3.1. Compoziție chimică..... | 102 |
| 2.2.3.2. Activitate antioxidantă și prooxidantă..... | 105 |
| 2.2.3.3. Activitate antiinflamatoare și antioxidantă <i>in vivo</i> | 107 |
| 2.2.3.4. Concluzii | 112 |
| Concluzii generale..... | 114 |
| Referințe..... | 117 |
| Contribuții personale..... | 149 |
| Mulțumiri..... | 153 |

Listă de abrevieri

12-LOX–12-lipooxigenaza;

3NT – 3-nitrotirozina;

ABTS^{•+} – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic);

ADN – acid dezoxiribonucleic;

ALB – albumină;

ALT – alaninaminotransferaza;

ANOVA – analysis of variance/ analiza varianței;

AST – aspartataminotransferaza;

Casp3 – caspaza 3;

CAT – catalaza;

CD3 – Co-receptorul celulelor T; cluster de diferențiere 3;

CIF – crystallographic information file/ fișierul de date cristalografice;

CMF-BSS – soluție salină tamponată fără calciu și magneziu;

ConA – concavalina A;

COX-1– ciclooxigenaza 1;

COX-2– ciclooxigenaza 2;

CPA – ciclofosfamida;

Crea – creatinină;

CRP – proteina C reactivă;

CS – corticosteron;

CT – colesterol total;

CYP450s – citocromul 450 hepatic;

D3 – receptor al dopaminei;

D4 – receptor al dopaminei;

Dcf – diclofenac;

DMEM – mediul de cultură/ Dulbecco's modified eagle medium;

DMSO – dimetilsulfoxid;

DPPH – 2,2-difenil-1-picrihidrazil;

E.A.hy926 – linie celulară din cordonul ombilical uman;

E2 – estradiol;

EC50 – concentrația efectivă jumătate maximă;

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay/ testul imunosorbent legat de enzimă;

EP – epinefrină;

EtOH – etanol;

Fas-FasL – două molecule care aparțin familiei factorilor de necroză tumorală (TNF) și care au rol major în apoptoză.

FBS – ser fetal bovin;

FC – Folin-Ciocalteu;

FSH – hormon foliculo-stimulant;

GABA – acidul gamm-aminobutiric;

GAE – echivalenți acid galic;

GDF9 – factorul de creștere și dezvoltare 9;

GPX – glutation peroxidaza;

GR – glutation reductază;

GSH – glutation;

H₂O₂ – apă oxigenată;

HCT – hematocrit;

HGB – hemoglobină;

HHS – axa hipotalamo-hipofizo-suprarenaliană;

HIV-I – virusul imunodeficienței umane I;

HPLC-DAD – high performance liquid chromatography- diode array detector/ Cromatografie de înaltă performanță cuplată cu fotospectrofotometria cu șir de diode cu baleiaj complet;

HPLC-MS – high performance liquid chromatography- diode array detector/ Cromatografie de înaltă performanță cuplată spectrometria de masă;

IC50 – concentrația inhibitorie jumătate maximă;

IFN- γ – interferon gamma;

IL - 1 β – interleukina 1 β ;

IL- 6 – interleukina 6;

IL-4 – interleukina 4;

IOP – insuficiență ovariană primară;

JNK – kinaza Janus;

LC-MS/MS – cromatografie de lichide cuplată cu spectrometria de masă; două analizoare cuplate în unul singur;

LDL – Low density lipoproteins; Lipoproteine de densitate scăzută;

LOD – limită de detecție;

LOQ – limită de cuantificare;

LPS – lipopolizaharide;

LYM – limfocite;

MAO – monoamino oxidaza;

MAP-kinaze – kinaze activate cu mitogen;

MCF-7 – linie celulară de adenocarcinom mamar uman;

MCH – hemoglobina eritrocitară medie;

MCHC – concentrația medie a hemoglobinei;

MCV – media volumului globulelor;

MDA – malondialdehida;

metHB – methemoglobină;
MMP- 9 – metaloproteinaza matriceala 9;
MON – monocite;
MPO – mieloperoxidază;
MPV – media trombocitară;
MRC-5 – linie celulară de fibroblaști pulmonari;
NADP⁺ – nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (forma oxidată);
NADPH - nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (forma redusă);
NADPH oxidaza – nicotinamid adenin dinucleotid fosfat oxidaza
NaOH – hidroxid de sodiu;
NAPQI – N-acetil-p-benzoquinon imina;
NEU – neutrofile;
NO – oxid nitric;
NO_x – specii de oxidului nitric;
NRF2/Keap1 – factor nuclear asociat cu factorul eritroid 2/ Kelch-like ECH-associated protein 1
O₂^{•-} – radical superoxid;
OH[•] – radical hidroxil;
OMS – Organizația Mondială a Sănătății;
OSI – index de stres oxidativ;
oxiHB – hemoglobină oxigenată;
p38 – proteine din familia MAPK;
PCA – principal component analysis/ analiza componentului principal;
PCT – plachetocrit;
PDW – distribuția trombocitară;
PGD₂ – prostaglandina D2;
PGF_{2α} – prostaglandina F2-alfa;
PGI₂ – prostaciclina;
PHA – fitohaemagglutinină;
PLT – trombocite;
PMN – celule polimorfonucleare;
PPAR γ – receptor gamma activat de peroxizom;
PRO – progesteron;
RBC – red blood cells/ eritrocite;
RDW – distribuția eritrocitară;
RE – echivalenți rutin;
RES – rezonanță electroparamagnetică de spin;
SEM – microscopie electronică de tip scanning;
SERM – selectivi pentru receptorii estrogenului;

SOD (1,2,3) – superoxid dismutaza, care poate fi în variantele 1, 2 sau 3;
SRA – specii reactive de azot;
SRO – specii reactive de oxigen;
SSRI – inhibitori selectivi ai reabsorbției serotoninei
TAC – capacitate antioxidantă totală;
TE – echivalenți trolox;
TEAC – capacitatea antioxidantă exprimată în echivalenți trolox;
TEM – microscopie electronică de transmisie;
TLC – thin layer chromatography/ cromatografie în strat subțire;
TNF- α – factor de necroză tumorală alfa;
TOS – stres oxidativ total;
TXA – tromboxan;
Tyr – tirozină;
UACC-62 – linie celulară de melanom uman;
UV-VIS – spectroscopie ultraviolet-vizibil;
WBC – white blood cells/ leucocite;

Cuvinte cheie: extracte vegetale, *Plantago*, *Galium*, *Hypericum*, antioxidanți, inflamație, celule, stres oxidativ, flavonoide, mimetism, estrogen.

Scopul studiului

Teza de doctorat are ca scop obținerea unor extracte, bogate în compuși cu potențial antioxidant, din specii de *Plantago*, *Galium* și *Hypericum*, în vederea testării pe modele biologice *in vivo* de stres oxidativ.

Obiectivele lucrării privesc următoarele aspecte:

1. Evaluarea fitochimică, activității antioxidante și potențialului regenerativ *in vitro* al extractului de *Plantago sempervirens*.
2. Exploatarea potențialului adjuvant și anti-inflamator al extractului de *P. sempervirens* în condiții de inflamație sistemică de tip acut, la șobolanul de laborator.
3. Investigarea efectului estrogeno-mimetic al flavonoidelor din extracte de *Plantago* pe un model biologic de stres oxidativ *in vivo* asupra sistemului reproducător la femele.
4. Prepararea extractului de *Galium verum* și analiza chimică a acestuia în vederea evaluării *in vivo* pe un model de stres oxidativ indus prin stresul neuropsihic.
5. Verificarea eficienței rutinului în comparație cu extractul de *H. capitatum* bogat în rutin, într-un model *in vivo* de stres oxidativ asociat cu inflamația sistemică de tip acut.
6. Prepararea extractelor hidroalcoolice de *P. cornuti*, *P. lanceolata*, *P. major* și *P. media* și analiza comparativă a acestora, atât din punct de vedere al compoziției chimice, cât și al activității antioxidante.

I. Date din literatură

1.1. Caracteristici biologice ale unor specii de *Plantago*

1.1.1. Încadrare sistematică și speciație

Genul *Plantago* face parte din familia Plantaginaceae, ordinul Lamiales, subclasa Asteridae, clasa Magnoliposida (Dicotyledonatae), încregătura Tracheophyta, regnul Plantae¹. Ordinul Lamiales cuprinde plante erbacee, cu frunze simple, nestipelate, grupate în rozete bazale, foarte rar opuse. Florile sunt actinomorfe, pe tipul 4, gamosepale și gamopetale cu caliciul persistent, ovar superior, iar fructul capsulă (Ciocârlan, 2009). Genul *Plantago* cuprinde aproximativ 250 de specii, având o distribuție geografică răspândită, cu precădere în zonele temperate, dar și în zonele tropicale (Hassemer et al., 2018). Speciile din acest gen au fost intens studiate, de-a lungul timpului, atât din punct de vedere morfologic, anatomic, cât și fitochimic, terapeutic etc. (Hetland et al., 2000; Rahn, 1996; Taskova et al., 1999).

Pe plan internațional, au fost descoperite și descrise specii noi, cum ar fi *Plantago nebularis* și *Plantago zoellneriana* în America latină (Hassemer et al., 2018). În România, în anul 2003, a fost raportată, pentru prima dată, specia *Plantago sempervirens* Crantz, în flora spontană, în localitatea Pusta, comuna Șincai din județul Mureș (Pușcaș et al., 2003).

Dintre speciile de *Plantago*, în cadrul tezei de doctorat au fost cercetate *Plantago cornuti* Gouan, *Plantago major* L., *Plantago media* L., *Plantago lanceolata* L. și *Plantago sempervirens* Crantz.



Fig. 1. *P. major* L.
(imagine originală)



Fig. 2. *P. lanceolata* L.
(imagine originală)



Fig. 3. *P. media* L.
(imagine originală)



Fig. 4. *P. cornuti* Gouan
(imagine originală)



Fig. 5. *P. sempervirens* Crantz
(imagine originală)

1.1.3. Compoziție chimică

Genul *Plantago* este o sursă promițătoare de noi molecule bioactive, fiindcă doar o parte din speciile acestui gen au fost studiate, îndeaproape, cu privire la compoziția lor chimică (Gonçalves and Romano, 2016). Cele mai multe lucrări care descriu compoziția chimică la specii de *Plantago*, cuprind în special *P. major*, *P. lanceolata* și *P. media* (Beara et al., 2009; Janković et al., 2012; Lukova et al., 2017).

Fitochimia genului a fost investigată în principal prin metode cromatografice (HPLC),

¹ <https://eunis.eea.europa.eu/species/177829>

cromatografice cuplate (HPLC-MS, LC-MS/MS) pentru determinarea conținutului de flavonoide (Janković et al., 2012), dar și colorimetrice (pentru determinarea fenolilor totali, a iridoidelor totale sau a glicozidelor fenilpropanoidice totale) (Handjieva et al., 1993; Janković et al., 2012; Taskova et al., 1999). Speciile de *Plantago* conțin numeroși compuși cu proprietăți biologice precum: polizaharide, lipide, terpene, compuși benzoici (acid vanilic), taninuri, saponine, steroli, compuși fenolici, flavonoide (ex. luteolin, apigenin, rutin), glicozide iridoide (ex. aucubina, catalpol), acid cafeic (principalul derivat al acestuia este plantamajozida) (Samuelsen, 2000; Stanisavljevic et al., 2008).

Profilul fenolic la *P. major* pune în evidență câțiva compuși majoritari, anume acidul ferulic, acidul elagic, dar și luteolinul, care conform literaturii de specialitate este compusul majoritar din multe specii de *Plantago*, atât din frunze, flori, cât și din semințe (Kawashty et al., 1994; Samuelsen, 2000).

P. media aparține tot subgenului *Plantago*, astfel un profil fenolic similar cu cel al speciei *P. major* poate fi luat în considerare. Alți compuși identificați, în această specie, sunt: aucubina, melitozida, plantamajorozida, monomelitozida, 10-acetilmonomelitozida, acteoizida, izoacteoizida și acid clorogenic (Olennikov et al., 2011; Saadi et al., 1988).

P. cornuti este o altă specie care aparține subgenului *Plantago* și din care s-a izolat pentru prima dată un compus din clasa iridoidelor, anume 10-hidroxiiridoizida, a doua ca importanță din această clasă (Handjieva et al., 1993). În această specie au fost identificate și aucubina și catalpolul (Rønsted et al., 2000).

P. sempervirens aparține subgenului *Psyllium* și este mai puțin răspândită geografic, ceea ce poate constitui un motiv pentru care nu se cunoaște încă potențialul său medicinal. Studiile cromatografice, efectuate pe această specie, arată doar câteva elemente identificate din clasa iridoidelor, precum aucubina, plantarenalozida, carioptozida, gardozida și acidul 8-epiloganic (Venditti et al., 2011).

1.1.4. Efecte terapeutice

Activitate cicatrizantă

În timpul procesului de cicatrizare, în pielea mamiferelor sunt activate o serie de procese, care implică inflamație, generarea și remodelarea țesutului nou. Peste o leziune cutanată, procesul de re-epitelizare presupune migrarea keratinocitelor spre marginile leziunii, unde vor începe să prolifereze (Schäfer și Werner, 2007). Studii despre prolificitatea celulară stimulată de prezența extractelor de *P. major*, la anumite concentrații, au fost asociate cu efectul cicatrizant al acestei specii. Compușii responsabili pentru efectul cicatrizant încă nu se cunosc cu certitudine, însă aceștia pot fi asociați cu compușii responsabili pentru activitatea anti-inflamatoare și antioxidantă, cum ar fi plantamajozida (Mahmood și Phipps, 2006).

Activitate antibacteriană

In vitro, activitatea antibacteriană a extractelor de *Plantago* a fost investigată folosind principiul antibiogrammei, în care discurile sunt impregnate cu extract, iar apoi aplicate pe placa însămânțată cu tulpinile de interes. Extractele de *P. major* și *P. lanceolata* au fost testate experimental pe culturi de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, iar antibioticele de referință au fost penicilina și trimetoprim-sulfametoxazol. Astfel, extractul de *P. major* a fost eficient la toate cele trei tulpini, iar extractul de *P. lanceolata* a avut efect doar asupra *S. aureus* (Caceres et al., 1987; Mazzutti et al., 2017).

Activitate antioxidantă

Activitatea antioxidantă se manifestă într-o varietate amplă de acțiuni, printre care inhibiția enzimelor oxidante, chelatarea metalelor tranziționale, transferul de hidrogen sau electroni neîmperecheați radicalilor, detoxifierea enzimatică a speciilor reactive de oxigen etc. (Bahadori et al., 2020; Beara et al., 2012). Activitatea antioxidantă mai puternică este exprimată de *P. lanceolata*, urmată de *P. major*, apoi *P. arenaria* și *P. cornuti* (Nikolova et al., 2011). Compușii fenolici și flavonoidele prezente în extracte sunt responsabile în principal de această activitate; mai exact, grupările hidroxilice prezente în compușii fenolici acționează ca neutralizatori de radicali liberi (Beara et al., 2012).

Activitate antiinflamatoare

Extractele de *P. major* au dovedit că sporesc producerea factorului de necroză tumorală alfa (TNF- α) și de oxid nitric (NO), care protejează gazda împotriva unor infecții și a dezvoltării tumorilor (Nathan și Hibbs, 1991). Activitatea anti-inflamatoare poate fi evaluată prin mai multe metode, printre care și evaluarea enzimelor ciclooxigenaza-1 (COX-1) și lipooxigenaza-12 (12-LOX), care sunt implicate în metabolismul acidului arahidonic, iar acesta, de obicei derivă din fosfolipidele membranare sub acțiunea fosfolipazelor. Pentru a stabili activitatea anti-inflamatoare a extractelor, au fost cuantificați produși ai activității enzimatică a COX-1 și 12-LOX, folosind cromatografia lichidă cuplată cu spectrometria de masă. Atât extractul de *P. major*, cât și cel de *P. lanceolata*, au prezentat activitate anti-inflamatoare, inhibând enzimele COX-1 și 12-LOX. Raportarea a fost făcută față de doi compuși standard, care se cunosc a fi inhibitori ai acestor enzime (aspirina și quercetinul). Astfel, extractele studiate au prezentat activitate mai scăzută decât aspirina, însă mai crescută decât quercetinul (Beara et al., 2010).

Activitate citotoxică

Unele studii arată faptul că activitatea citotoxică este asociată cu scindarea ADN-ului, în care flavonoidele intervin prin activarea unui complex de clivare în care sunt implicate topoisomeraza I și II (Gálvez et al., 2003). Tratamentul cu extracte de *P. major*, *P. lanceolata* și *P. altissima* a demonstrat un efect inhibitor dozo-dependent (Mello et al., 2015). Testele

efectuate pe celule sănătoase au arătat un efect inhibitor mai slab decât în cazul celulelor tumorale, ceea ce sugerează faptul că aceste extracte sunt mai toxice pentru celulele tumorale decât pentru cele sănătoase (Beara et al., 2012).

Activitate imunomodulatoare

Prezența agenților imunopotențiatori în *P. major* ar putea explica activitatea profilactică împotriva dezvoltării unor boli, precum cancerul (Gomez-Flores et al., 2000). Compușii responsabili de activitatea imunomodulatoare sunt: aucubina, acidul clorogenic, acidul ferulic, acidul p-cumaric, acidul vanilic, baicaleinul și baicalinul. Acidul oleoic și acidul ursolic nu au stimulat prolificitatea limfocitară, însă au prezentat activitate puternică în stimularea secreției de IFN- γ (L. Chiang et al., 2003).

Activitate gastroprotectoare

În America latină și în Turcia, *P. major* este folosită pentru a preveni sau a combate afecțiuni digestive precum ulcerul gastric (Abud et al., 2017; Samuelsen, 2000). Efectele gastroprotectoare ale acestei specii sunt asociate cu o serie de principii active, cum ar fi polizaharidele, flavonoidele și alcaloizii. Aceste clase de compuși sunt cunoscute pentru proprietățile lor antioxidante, de neutralizare a radicalilor liberi și inhibare a lipoperoxidării lipidelor (Beara et al., 2012; Samuelsen, 2000). Astfel, aceste proprietăți pot fi asociate cu efectul gastroprotector, dat fiind că au fost raportate în literatură, efectele protective ale flavonoidelor asupra mucoasei gastrice, împotriva formării unor leziuni datorate factorilor necrotici (Mahmood și Phipps, 2006).

Activitate hepatoprotectoare

Revenind la secretele medicinei tradiționale, produsele naturale cu proprietăți antioxidante sunt intens apreciate pentru efectele protectoare asupra ficatului. *P. major*, cunoscută pentru numeroasele ei proprietăți și efecte benefice, a fost investigată și în condiții de toxicitate hepatică, demonstrând încă o dată că efectele protectoare sunt datorate unei palete largi de antioxidanți naturali. Experimentele desfășurate, pe biosisteme model, au arătat faptul că tratamentul cu extract de pătlagină, nu doar că previne depleția de GSH, ci chiar reduce stresul oxidativ. Enzimele specifice activității hepatice (alaninaminotrasferaza (ALT) și aspartataminotrasferaza (AST)) sunt semnificativ scăzute în condiții de tratament cu *Plantago* și pe fondul unor intoxicații cu medicamente.

1.2. Caracteristici biologice ale unor specii de *Galium*

1.2.1. Încadrare sistematică și speciație

Genul *Galium* face parte din familia Rubiaceae, ordinul Gentianales, subclasa Asteridae, clasa Magnoliopsida (Dicotyledonatae), încregătura Tracheophyta, regnul Plantae². Familia Rubiaceae este a patra cea mai mare familie ca dimensiune de angiosperme, cu aproximativ 660 genuri și 13526 specii (De Toni și Mariath, 2015; Șik et al., 2016). Genul *Galium* L. cuprinde peste 650 de specii, larg distribuite în zone tropicale și temperate, având specii anuale, dar și perene (Bradic et al., 2019; Frišćić et al., 2018).



Fig. 6. *Galium verum* L.
(imagine originală)

1.2.3. Compoziție chimică

O serie de compuși bioactivi au fost izolați din specii de *Galium*, care arată, încă o dată, asemănarea dintre *G. verum* și *G. mollugo*, însă există câteva diferențe care constituie importanți indicatori chemotaxonomici. Categoriile de compuși chimici identificați la *G. verum* sunt următoarele: iridoide glicozidice, compuși fenolici, antrachinone, triterpene, taninuri, saponine, uleiuri esențiale, pigmenți și vitamine (Bradic et al., 2016).

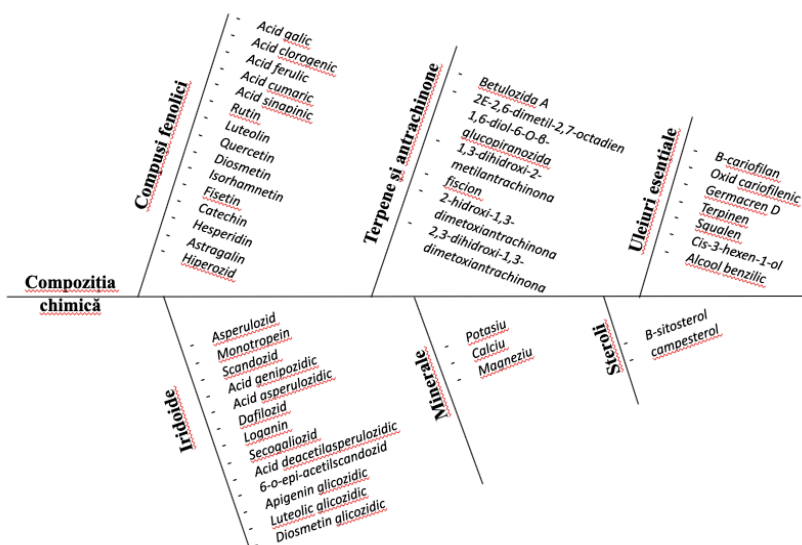


Fig. 9. Profilul chimic la *G. verum*, adaptare după (Bradic et al., 2016; Mocan et al., 2019).

Figura 9 ilustrează date din literatură, care au avut ca obiectiv fie identificarea, fie cuantificarea compușilor chimici din specia *G. verum*, care se încadrează în principalele clase de compuși prezenți în plante.

1.2.4. Efecte terapeutice

Activitate antioxidantă

Studii de specialitate recente dovedesc activitatea antioxidantă la extracte de *Galium*, obținute din diferite specii (*G. verum*, *G. mollugo*, *G. aparine*, *G. odoratum*) cu solvenți precum

² <http://eunis.eea.europa.eu/species/181730>

apă, alcool și metanol. Rezultatele obținute folosind metoda DPPH arată concentrația inhibitorie 50% (IC₅₀), care ordonează cele patru extracte de *Galium*, în funcție de potențialul antioxidant. Astfel *G. verum* se clasează pe primul loc (IC₅₀=105.43±0.15), apoi *G. mollugo* (IC₅₀=107.45±0.53), urmat de *G. aparine* (IC₅₀=116.43±0.46) și *G. odoratum* (IC₅₀=264.42±0.74) (Vlase et al., 2014).

Activitate antibacteriană și antifungică

Experimentele derulate cu bacterii gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) și gram-negative (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) arată o sensibilitate mai mare a bacteriilor gram-pozitive la acțiunea extractului de *G. verum* (Bradic et al., 2016).

Activitatea antifungică a extractelor de *Galium* este foarte scăzută. Studiile asupra coloniilor de *C. albicans* arată un *G. verum* ineficient, însă complexe formate din acesta, împreună cu *G. dasypodium*, *G. aparine* și *G. pseudomollugo* reprezintă un remediu antifungic foarte eficient (Vasilevna et al., 2016).

Activitate antiinflamatoare

Pe fondul unei inflamații de tip acut, indusă experimental la șobolanul de laborator, administrarea pe cale orală a infuziei de *G. verum* a redus cu aproximativ 37% edemul format de caragenan (Fig. 10). Medicamentele de sinteză folosite ca antiinflamator sau control pozitiv au redus edemul cu 47%, ceea ce arată o diferență foarte mică în comparație cu alternativa naturală (Mazko et al., 2017). Rezultatul statistic semnificativ, de reducere a inflamației, a fost înregistrat la numai două ore de la inducerea experimentală a inflamației, ceea ce dovedește efectul rapid al extractului de *G. verum*.

Activitate antitumorală

Experimente *in vitro* au arătat o sensibilitate crescută a liniilor celulare de carcinom laringeal, ceea ce arată potențialul curativ al extractului de *G. verum*, împotriva cancerelor de gât și laringe (Bradic et al., 2016). Extractul etanolic de sânziană a dovedit că inhibă dezvoltarea celulelor canceroase de sân prin activarea apoptozei. Flavonoidele din extractul de *G. verum*, în special diosmetina, este recunoscută a fi un inhibitor al tumorilor de cervix și timus, prin semnalizarea dependentă Fas-FasL, cu activarea caspazelor care induc apoptoza (Zhao et al., 2011).

1.3. Caracteristici biologice ale unor specii de *Hypericum*

1.3.1. Încadrare sistematică și speciație

Genul *Hypericum* aparține familiei Clusiaceae, ordinul Malpighiales, clasa Magnoliopsida, încregătura Tracheophyta, regnul Plantae³. În alte baze de date, genul *Hypericum*, face parte din familia Clusiaceae, ordinul Theales, sublasa Dilleniidae, clasa Magnoliopsida (Dicotyledonatae), încregătura Magnoliophyta, regnul Plantae⁴.



Fig. 11. *Hypericum capitatum* Choisy

(<https://www.turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/view-photo/3599/15974.html>)

1.3.2. Morfologie și ultrastructură

H. capitatum este o specie originară din Lebanon, Siria și Turcia. Este o specie perenă, care poate ajunge la o înălțime de până la 50 cm (Fig. 11). *H. capitatum* este caracterizat de prezența micilor canalelor secretorii translucide, specifice genului, atât pe tulpină cât și pe frunze și care conțin biomarkeri vegetali (Esra și Afife, 2013). Florile sunt colorate, dar variază de la portocaliu închis la roșu intens (Robson, 1987).

1.3.3. Compoziție chimică

Cele mai recente date, despre compoziția chimică a speciilor de *Hypericum*, indică un conținut bogat în metaboliți secundari bioactivi, precum uleiuri esențiale, naftodiantrone, flavonoide și altele (Avato, 2005; Cirak et al., 2016). Una din particularitățile speciilor de *Hypericum* este prezența glandelor specializate, care au o compoziție aparte, având hidrocarburi, monoterpene și seschiterpene, cunoscute pentru activitatea antibacteriană (Boga et al., 2016; Crockett și Robson, 2011; Ero și Mat, 2013).

Din punct de vedere farmacologic, naftodiantronele reprezintă una dintre cele mai interesante categorii de compuși chimici la genul *Hypericum*, datorită efectelor terapeutice pe care aceste structuri le determină. Cele mai importante naftodiantrone sunt hipericina și pseudohipericina, care sunt localizate în frunze și flori (Boga et al., 2016; Nahrstedt și Butterweck, 1997). Flavonoidele și compușii fenolici reprezintă categorii de compuși chimici prezenți în concentrații ridicate, la speciile din genul *Hypericum*, care sunt responsabili în principal, de activitatea antioxidantă (Nahrstedt și Butterweck, 1997).

1.3.4. Efecte terapeutice

Activitate antibacteriană, antifungică și antivirală

Mai mulți autori au studiat efectul antibacterian al extractelor de *Hypericum*, precum *H.*

³ <https://eunis.eea.europa.eu/species/173352>

⁴ <https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=HYPER>

heterophyllum, *H. hyssopifolium*, *H. scabrum* (Boga et al., 2016; Unal et al., 2008). Aceste specii au dovedit a avea remarcabile efecte antibacteriene asupra coloniilor de bacterii gram-pozitive și mai puțin asupra celor gram-negative, iar efecte antifungice absente. Astfel, substanțele chimice responsabile de această activitate se consideră a fi flavonoidele, compușii fenolici, naftodiantronele și uleiurile esențiale (Radulović et al., 2007). Mai mult decât atât, a fost dovedită activitatea antiretrovirală a speciei față de virusul HIV-I, dovedind inhibiția absorbției virusului (Sokmen et al., 1999).

Activitate antioxidantă și antiinflamatoare

Speciile de *Hypericum* sunt cunoscute pentru efectele antioxidante, antiinflamatorii și antidepresive, însă mecanismele care stau la baza acestor efecte nu sunt pe deplin cunoscute (Du et al., 2014; Miller, 1998; Sánchez-Reus et al., 2007). Ceea ce a fost identificat, până în prezent, este activitatea antioxidantă puternică a extractului de *H. perforatum*, activitate care se bazează pe mecanismul de acțiune al flavonoidelor similar cu cel al reductonilor. Aceștia sunt structuri chimice care reacționează cu anumiți precursori ai peroxizilor, în acest fel împiedicând formarea peroxizilor.

Activitate de protecție a ADN

Activitatea de protejare a ADN-ului a fost demonstrată folosind un ADN plasmidial, oxidat cu radicali -OH obținuți din fotoliza apei oxigenate și în prezența extractului metanolic de *H. capitatum* var. *capitatum*. Adăugarea extractului în mixtura de reacție a inhibat formarea de ADN plasmidial circular și linear deschis, într-un mod dozo-dependent (Boga et al., 2016).

Activitate antidepresivă

Farmacoterapia tulburărilor depresive constă în medicamente antidepresive, precum inhibitori ai enzimei monoamino oxidaza (MAO) și inhibitori selectivi ai reabsorbției serotoninei (SSRI). Deși aceste substanțe sunt foarte eficiente, pentru tratarea tulburărilor depresive, frecvent au fost raportate efecte adverse precum tahicardie, hipotensiune arterială, senzația de gură uscată, toxicitate hepatică. *H. perforatum* a fost introdus, în terapia depresiei, încă din anii 1980, fiind recomandat pentru depresiile ușoare și moderate (Wurglics și Schubert-Zsilavec, 2006).

1.4. Fiziologia și patologia stresului oxidativ

„Nu este stresul cel care ne omoară, ci este reacția noastră la stres” Hans Selye

Expunerea zilnică la diferiți stresori, precum malnutriție, sedentarism, medicamente și droguri, poluare, radiații UV, micro-organisme, virusuri, poate conduce la dezvoltarea unor patologii asociate stresului, precum depresie, anxietate, disfuncții gastrointestinale, boli cardiovasculare etc. Toate aceste condiții deteriorează homeostazia celulară producând modificări biochimice, chiar și leziuni care se întâlnesc sub denumirea de stres oxidativ (Ochi et al., 2008; Sies et al., 2017).

1.4.1. Tipuri și forme

Tabelul 9. Clasificarea stresului oxidativ în funcție de intensitate, forme, terminologie și tipuri de răspunsuri asociate

| Criteria de clasificare | Tipuri de stres oxidativ |
|------------------------------|--|
| Intensitate | <i>Bazal</i> <i>Scăzut</i> <i>Intermediar</i> <i>Crescut/Intens</i> |
| Forme specifice | <i>Fiziologic (eustres)</i> <i>Nutrițional, postprandial</i> <i>Glico-oxidativ</i> <i>Proteotoxic, asociat cu reticulul endoplasmatic (RE-stres) și/sau cu legăturile disulfidice</i> <i>Fotooxidativ (UV-A, UV-B, vizibil, infraroșu)</i> <i>Stres indus de radiații</i> <i>Nitrozativ</i> <i>Stres indus de nano-particule</i> <i>Stres de mediu (SO₂, NO₂, O₃)</i> |
| Terminologie asociată | <i>Oxidant/pro-oxidant</i> <i>Redox, stres electrofilic</i> <i>Stres reducător, hipoxic</i> <i>Stres de energie</i> |
| Răspunsuri asociate | <i>Șoc termic</i> <i>Proteine despachetate</i> <i>Proliferare celulară</i> <i>Autofagie, apoptoză, necroză</i> |

(Lushchak, 2014; Sies, 2015; Sies et al., 2017)

1.4.2. Mecanisme celulare și moleculare ale stresului

Stresul oxidativ apare, în celule, în momentul în care balanța oxidanți/antioxidanți se află într-un dezechilibru, marcat de creșterea concentrației unor produși cunoscuți după denumirea populară de „radicali liberi”. Astfel, stresul oxidativ este o consecință a excesului de specii reactive, precum acești radicali liberi, care nu au putut fi neutralizate de sistemele defensive ale celulei (Ahmadinejad et al., 2017; Crockett și Robson, 2011; Pan et al., 2019).

Datele din literatură arată faptul că cea mai mare cantitate de specii reactive provine din lanțul transportor de electroni, unde la nivelul coenzimei Q există posibilitatea ca o cantitate mare de electroni să fie eliberați, care apoi interacționează cu oxigenul molecular cu formarea de anion superoxid

Polifenolii, deși se regăsesc într-o gamă destul de variată, sunt considerați a fi un grup de antioxidanți foarte puternici, uneori chiar mai puternici decât acidul ascorbic (Prior și Cao, 2000). Printre mecanismele în care aceștia se angajează, se numără: directa purificare a radicalilor liberi, activarea enzimelor antioxidante (Tabelul 10), chelatarea metalelor, reducerea radicalilor α -tocoferil, inhibiția oxidazelor (Tabelul 10), atenuarea stresului nitro-oxidativ, creșterea concentrației de acid uric (Hirano et al., 2001; Lotito și Frei, 2006; Procházková et al., 2011a). O etapă limitantă a activității antioxidante a polifenolilor este absorbția în micromediul de reacție celular, care are loc cu o degradare microbială în prealabil, în intestinul subțire.

Astfel, după acel soi de degradare, compușii fenolici fie se absorb individual, fie în structuri condensate, denumite agliconi. Fenomenul de absorbție poate fi prin două mecanisme:

- a) prin intermediul cărașului dependent de sodiu al glucozei (Wurglics și Schubert-Zsilavec, 2006);
- b) difuzia pasivă a moleculei sau agliconului în fluxul sangvin, precedată de deglicozilarea structurilor fenolice (ex: rutin) cu ajutorul enzimei floridzin-hidrolaza în apropierea membranei enterocitelor (Wurglics și Schubert-Zsilavec, 2006).

Cu toate acestea, antioxidanții exogeni au o natură duală, în sensul în care, pe lângă efectele pozitive, pot avea și un impact negativ asupra micromediului celular.

1.4.3. Stresul oxidativ și antioxidanții în toxicitatea ovariană

Speciile reactive de oxigen (SRO) afectează mai multe procese fiziologice, începând de la maturarea oocitului, fertilizare, dezvoltare embrionară și sarcină. Fiind implicate în funcția ovariană, aceste specii contribuie semnificativ în dezvoltarea unor boli, care afectează fertilitatea (e.g. malformații, dezvoltarea anormală a embrionului, a pubertății, a comportamentului sexual, etc.).

Flavonoidele din plante, pe lângă efectul antioxidant oferit de structura lor chimică, activează căi de semnalizare celulară, prin care stimulează lupta internă a celulei în fața radicalilor instabili. Astfel, prin activarea căii de semnalizare a factorilor de transcriere NRF2 (factor nuclear asociat cu factorul eritroid 2) și PPAR γ (gamma receptor activat de peroxizom), activează enzimele antioxidante și blochează producerea de SRO, inflamația și apoptoza (Aladaileh et al., 2019; Sun et al., 2012). Efectele secundare ale tratamentelor cu CPA sunt reprezentate de producția de specii reactive ($\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2\bullet^-$, H_2O_2) în ovar și foliculi, în special în timpul ovulației (Iorio et al., 2014). Acești radicali se cunosc a fi dăunători atât foliculilor, cât și oocitelor, fiind asociați cu modificări ale proteinelor, ale unor fragmente esențiale menținerii integrității organitelor, citoscheletului, astfel pot afecta activitatea, organizarea și distribuția organitelor celulare (Devine et al., 2012; Goud et al., 2008). Astfel, în condiții patologice, nivelurile ridicate de SRO/SRA și stresul oxidativ asociat accelerează îmbătrânirea oocitelor și cauzează deteriorarea calitativă a oocitului. Nivelul crescut de radicali liberi declanșează lipoperoxidare în celulele luteale, ceea ce poate conduce la regresia corpului galben. Intensificarea sintezei de molecule instabile este asociată cu reducerea activității enzimelor antioxidante, ceea ce contribuie la apoptoza mediată *via* stres oxidativ. În condiții patologice, speciile reactive pot contribui la faza luteală defectuoasă, care poate fi o cauză a infertilității și avort spontan (Devine et al., 2012; Zuo et al., 2016).

II. Contribuție personală

2.1. Materiale și metode de cercetare

2.1.1. Obținerea extractelor vegetale

2.1.1.1. Extracte de *Plantago*

Speciile de *Plantago sempervirens*, *P. cornuti*, *P. lanceolata*, *P. major* și *P. media* au fost colectate din Grădina Botanică “Alexandru Borza”, Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca, în Septembrie 2015. Extractele hidroalcoolice au fost obținute din frunze prin repercolare la rece, folosind alcool alimentar 96% (Prodvinalco)(Pârvu et al., 2009).

2.1.1.2. Extract de *Galium verum*

Părțile aeriene ale speciei *Galium verum* L. au fost culese în perioada înfloririi, din localitatea Mihai Viteazu, județul Cluj. Plantele au fost uscate și măcinate fin, din care 150 g de pudră a fost macerată cu 450 mL soluție hidroalcoolică (70% etanol), timp de 7 zile, la temperatura camerei, iar extractul obținut fost filtrat pentru analize ulterioare (Farcaș et al., 2018; Veličković et al., 2007).

2.1.1.3. Extract de *Hypericum capitatum*

Plante de *Hypericum capitatum* au fost colectate, în anul 2015, din zona Kilis, Turcia, în diferite stadii ale dezvoltării: înainte de înflorire, în timpul înfloririi și după înflorire. Pentru analizele chimice comparative, a fost preparat și un extract de *H. perforatum*, cea mai reprezentativă specie a genului *Hypericum* (Aidi Wannes et al., 2010; Farcaș et al., 2019).

2.1.2. Metode de determinare a compoziției chimice a extractelor

2.1.2.1. Analiza HPTLC

O separare cromatografică preliminară și calitativă a fost efectuată cu ajutorul plăcilor pentru cromatografie în strat subțire HPTLC (Cimpoiu et al., 2010; Hosu et al., 2016).

2.1.2.2. Analiza HPLC-DAD

Pentru a efectua o separare cantitativă, a compușilor de interes, a fost utilizată cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu detector de rețea de diode (HPLC-DAD) (Farcaș et al., 2019).

2.1.2.3. Analiza de rezonanță electroparamagnetică de spin (RES)

Reactivitatea antioxidantă a fost evaluată și prin profilul radicalilor semiquinonici generați printr-un tratament alcalin al extractelor și monitorizați prin rezonanță electromagnetică de spin (RES) (Moș et al., 2009, 2015).

2.1.3. Determinarea activității antioxidante la extracte vegetale

2.1.3.1. Metoda DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Metoda DPPH de evaluare a activității antioxidante a extractelor vegetale este o metodă de neutralizare a radicalului DPPH, un radical stabil, care poate fi monitorizat spectrofotometrico

perioadă determinată. Calcularea concentrației de DPPH, rămasă la un moment dat, oferă informații cu privire la gradul de neutralizare a radicalului, ceea ce poate fi tradus în activitatea antioxidantă a extractului testat (Moț et al., 2011).

2.1.3.2. Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Metoda TEAC se bazează pe abilitatea antioxidanților prezenți în probe de a neutraliza radicalul ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolină-6-acidsulfonic) (Moț et al., 2009).

2.1.3.3. Metoda Folin-Ciocalteu

Metoda Folin-Ciocalteu (FC) este utilizată pentru cuantificarea antioxidanților hidrofiliți și se bazează pe reducerea reactivului FC de către compușii cu potențial antioxidant (Moț et al., 2009).

2.1.3.4. Metoda β -caroten

β -carotenul este un compus natural, galben-portocaliu, întâlnit, în abundență, în produsele vegetale. Datorită structurii chimice, acesta realizează activități antioxidante în interacțiune cu membrane biologice (Nimse și Pal, 2015). Evaluarea capacității antioxidante a extractelor vegetale, prin metoda β -caroten, presupune inhibiția testului de neutralizare indus de β -caroten (Moț et al., 2016).

2.1.4. Determinarea activității prooxidante a extractelor vegetale

Activitatea prooxidantă a fost determinată spectrofotometric, folosind o metodă care implică radicali liberi generați de o enzimă (lacază) și oxidarea hemoglobinei (Moț et al., 2014).

2.1.5. Evaluarea potențialului de regenerare *in vitro* la extracte de *Plantago*

Testarea potențialului de regenerare, al celulelor în cultură, poate fi realizată prin lezarea culturilor celulare pe mediu de cultură solid. Capacitatea celulelor de a recoloniza spațiul vacant indică modificări ale dinamicii celulare (Jin et al., 2017).

2.1.6. Evaluarea potențialului antioxidant și antiinflamator, la extracte vegetale, cu model experimental pe șobolan

2.1.6.1. Modele biologice de stres la șobolan

2.1.6.1.1. Model de inflamație sistemică de tip acut

Pentru a investiga potențialul antioxidant, dar și antiinflamator, la extracte de *Plantago sempervirens* și *Hypericum capitatum*, a fost adoptat un model de inflamație sistemică de tip acut, indus cu ulei de terbenină, la șobolanul de laborator. Uleiul de terebentină funcționează ca stimul non-antigenic și afectează fagocitoza ca parte a răspunsului celular de fază acută, asociat inflamației. Leziunile oxidative asociate cu răspunsul inflamator au fost cuantificate prin prisma parametrilor de stres oxidativ și nitro-oxidativ, precum stres oxidativ total (TOS), MDA (malondialdehida), OSI (indicele de stres oxidativ) și NO (oxidul nitric). Activitatea antioxidantă este determinată prin evaluarea nivelului de glutatation (GSH), activităților enzimatiche precum

superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT) și prin capacitatea antioxidantă totală (TAC). Totodată, folosind acest model, poate fi evaluat răspunsul inflamator, prin markeri specifici ai inflamației, precum proteinele de fază acută (proteina C reactivă - CRP), cuantificarea celulelor polimorfonucleare (PMN), oxidul nitric (NO), gradul de nitrare al tirozinei (3NT) (Andreicuț et al., 2018; Farcaș et al., 2019; Farcaș et al., 2019; Pârvu et al., 2014; Tiperciuc et al., 2013).

2.1.6.1.2. Model de stres neuropsihic

Modelul stresului neuropsihic a fost utilizat, pentru a evalua *in vivo* efectele antioxidante ale extractului de *G. verum*. Stresul neuropsihic a fost indus, la șobolanii de laborator prin imobilizare, timp de 3 ore pe zi, pe parcursul a 6 zile. Acest model generează stres oxidativ *in vivo* printr-un alt mecanism, spre deosebire de uleiul de terebentină. Imobilizarea pe parcursul a 3 ore pe zi reprezintă un stimul care induce numeroase schimbări celulare și care activează cascadele de stres oxidativ cu producerea unei stări neobișnuite pentru organism (Liu et al., 2014; Rahal et al., 2014). Axa hipotalamo-hipofizo-suprarenaliană (HHS) este o componentă esențială pentru reacțiile de răspuns la stres. În cazul stresului de imobilizare, activitatea axei HHS crește și se reflectă în tabloul biochimic sangvin, prin prisma concentrațiilor de hormoni ai stresului, precum corticosteron (CS) și epinefrina (EP) (Naila Sheikh et al., 2007). Odată cu modificările hormonale, cascadele biochimice sunt activate, iar ca urmare, sistemele antioxidante enzimatică sunt alterate direct proporțional cu nivelul stresului oxidativ (Selman et al., 2000). Astfel, pentru evaluarea activității antioxidante a extractului de *Galium*, un set de markeri specifici ai stresului au fost investigați din serul animalelor stresate, nestresate, dar expuse tratamentului cu extract. Parametri precum MDA, CS, EP, SOD, CAT, colesterolul total (CT), aspartataminotransferaza (AST), alaninaminotransferaza (ALT), creatinină (Crea) și proteine totale (PT) au fost evaluate din ser. Interpretarea rezultatelor și analizele statistice contribuie la demonstrarea efectului antioxidant (Amin et al., 2017; Samarghandian et al., 2016; Thakare et al., 2016).

2.1.6.1.3. Gonadotoxicitate indusă cu ciclofosamidă (CPA)

Modelul cu CPA, la șobolanul de laborator, a fost indus pe fondul unui tratament profilaxic cu extract de *P. lanceolata*. Pentru a induce o depleție foliculară de aproximativ 50%, doza de CPA a fost stabilită la 150 mg CPA/kg greutate corporală, administrată o singură dată, prin injecție intramusculară, după modelul propus de (Horicks et al., 2015). Stresul oxidativ generat este asociat și cu un răspuns inflamator, care se reflectă inclusiv în glandele sexuale. Astfel, pentru evaluarea stresului oxidativ și răspunsului inflamator, parametri precum TOS, MDA, OSI, NO, 3NT au fost evaluați din serul animalelor, dar și din țesutul ovarian. Pe lângă acești parametri, au fost determinați indicatori ai sistemelor antioxidante enzimatică (SOD, CAT, GPX- glutation peroxidaza) și non-enzimatică (GSH). Pentru un tablou biochimic-endocrin

complet, hormonii sexuali precum, hormonul foliculo-stimulant (FSH), estrogen (E2), progesteron (PRO) au fost determinați din serul sangvin la toate animalele din experiment.

2.1.6.2. Animale și etica cercetării

Toate experimentele au fost organizate în acord cu Legea 43/2014 de protecție a animalelor folosite în scop științific și a directivei europene 63/2010. Experimentele au obținut avizul de la Direcția Sanitar Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor din Cluj-Napoca (nr.22/13.12.2016).

2.1.6.3. Design experimental

A. Inflamație sistemică de tip acut și tratament cu *P. sempervirens*

Tabelul 11. Loturi experimentale și tratament cu *P. sempervirens*

| Loturi/n=6 | C | EtOH | I | P25 | P50 | P100 | I+P25 | I+P50 | I+P100 |
|----------------------------------|--|---------------|--|----------------|----------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Tratament | H ₂ O | Etanol 30% | (0.6 mL/ kg corp ulei de terbentină) | Extract 25% | Extract 50% | Extract 100% | I+ Extract 25% | I+ Extract 50% | I+ Extract 100% |
| Animale | șobolani din rasa Wistar, femele, 160±20 g | | | | | | | | |
| Durată experiment | 8 zile | | | | | | | | |
| Administrare agent inflamator | 0.6 mL ulei de terebentină în penultima zi (ziua 7) de experiment | | | | | | | | |
| Administrare tratament | Etanol 30% și extractele au fost administrate intragastric, 1 mL, zilnic | | | | | | | | |
| Condiții | Apă și mâncare <i>ad libitum</i> | | | | | | | | |

B. Gonadotoxicitate asociată cu răspuns inflamator și tratament cu luteolin și *P. lanceolata*

Tabelul 12. Loturi experimentale și tratamentul corespunzător

| Loturi/n=6 | C | CPA | CPA+E | CPA+L1 | CPA+L2 | CPA+L3 |
|-----------------------------|--|--|--|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Tratament | DMSO 3% | 150 mg/kg corp, i.m., în ziua 15 | CPA+ extract de <i>P. lanceolata</i> (0.4 mg luteolin în extract/ kg corp) | CPA+ 0.4 mg luteolin/ kg corp | CPA+ 5 mg luteolin/ kg corp | CPA+ 10 mg luteolin/ kg corp |
| Animale | șobolani din rasa Wistar, femele, 160±20 g | | | | | |
| Durata experiment | 21 zile | | | | | |
| Administrare agent toxic | CPA, 150 mg/ kg greutate corporală, administrat intramuscular în ziua 15 | | | | | |
| Administrare tratament | DMSO 3%, extractul și soluțiile de luteolin au fost administrate intragastric, o dată la două zile | | | | | |
| Condiții | Apă și mâncare <i>ad libitum</i> | | | | | |

C. Inflamație sistemică de tip acut și tratament cu H. capitatum

Tabelul 13. Loturi experimentale și tratament cu *H. capitatum*

| Loturi/n=5 | C | I | I+Def | I+R | I+D1 | I+D2 | I+D3 |
|-------------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Tratament | DMSO 4.7% | (0.6 mL/ kg corp ulei de terbențină) | I+ Diclofenac (10 mg/kg corp) | I+ 25 mg rutin/kg corp | I+ Extract cu 12.5 mg rutin în extract | I+ Extract cu 25 mg rutin în extract | I+ Extract cu 50 mg rutin în extract |
| Animale | șobolani din rasa Wistar, femele, 160±20 g | | | | | | |
| Durată experiment | 8 zile | | | | | | |
| Administrare agent inflamator | 0.6 mL ulei de terebentină în ziua 7 de experiment | | | | | | |
| Administrare tratament | DMSO 4.7%, diclofenacul (10 mg/kg corp), rutinul (25 mg/kg corp) și extractele (D1, D2, D3) au fost administrate intragastric, 1 mL, zilnic | | | | | | |
| Condiții | Apă și mâncare <i>ad libitum</i> | | | | | | |

D. Stres neuropsihic indus prin imobilizare și tratament cu G. verum

Tabelul 14. Loturi experimentale și tratament cu *G. verum*

| Loturi/n=6 | C | S | SG1 | SG2 |
|------------------------|---|----------------------------------|---|---|
| Tratament | Dietă normală | Imobilizare 3 h/zi, la întuneric | 25 mg extract/ kg corp+ imobilizare 3 h/zi la întuneric | 50 mg extract/kg corp imobilizare 3 h/zi la întuneric |
| Animale | șobolani din rasa Wistar, femele, 160±20 g | | | |
| Durată experiment | 7 zile | | | |
| Stresor | imobilizare, în containere speciale, 3 ore/zi, timp de 7 zile | | | |
| Administrare tratament | extractele (G1 și G2) au fost administrate intragastric, 1 mL, înainte de perioada de stres, zilnic | | | |
| Condiții | apă și mâncare <i>ad libitum</i> | | | |

2.1.6.4. Markerii de stres oxidativ și inflamație

Stresul oxidativ și nitro-oxidativ a fost investigat prin prisma mai multor parametri care cuantifică, pe de o parte, radicalii liberi generați în fluxul sangvin (TOS, OSI, MDA, NO, 3NT), iar pe de altă parte, sistemele antioxidante endogene, enzimatic (CAT, SOD, GPX) și non-enzimatic (GSH), care contribuie la îndepărtarea speciilor oxidative, după cum urmează:

- a. Stresul oxidativ total (TOS) (Erel, 2005);
- b. Capacitatea antioxidantă totală (TAC) (Erel, 2004);
- c. Indicele de stres oxidativ (OSI) reprezintă raportul TOS/TAC (Harma et al., 2003; Miranda et al., 2001);
- d. Oxidul nitric (NO) (Miranda et al., 2001).
- e. Malondialdehida (MDA) (Mitev et al., 2010);
- f. Grupările tiolice (SH) reprezintă, în ansamblu, sistemul antioxidant neenzimatic al celulelor (GSH) (Mitev et al., 2010);

g. Catalaza (CAT) este o enzimă care aparține sistemului antioxidant enzimatic propriu celulei și care poate fi determinată utilizând o metodă cinetică (Aebi, 1984);

h. Superoxid dismutaza (SOD) este o enzimă antioxidantă care protejează celulele vii împotriva radicalilor liberi de superoxid (Sun et al., 1988);

i. Glutation peroxidaza (GPX) este o oxidoreductază, care catalizează reacția dintre glutatation și apa oxigenată;

j. Proteina C reactivă (CRP) este una dintre cele mai importante proteine de fază acută, fiind implicată în inflamație, traume, infarct miocardic și alte patologii (Eckschlager et al., 2019);

k. Albumina (ALB) este o proteină globulară, majoritară în serul uman, cu rol în menținerea presiunii osmotice, antioxidantă și de sprijin în transportul unor medicamente sau alte substanțe (Ueno et al., 2016);

l). Proteinele totale (PT) (Zheng et al., 2017);

2.1.6.5. Parametri hematologici

Hemoleucograma completă se realizează, prin citometrie în flux, folosind un analizor automat de hematologie (Abacus Junior Vet, Diatron, Messtechnik, Budapesta, Ungaria).

2.1.6.6. Markerii hormonal

Principalii markeri ai dezvoltării foliculare sunt hormonii FSH și E₂. FSH contribuie la stimularea și creșterea folculilor la mamiferele post-pubertale, iar E₂ are rolul de a forma bucla de feedback a axei hipofizo-ovariene cu inhibarea concentrației de FSH (Kaygusuzoglu et al., 2018).

2.1.6.7. Markerii hepatici și renali

Enzimele hepatice precum alaninaminotransferaza (ALT), aspartataminotransferaza (AST), reprezintă markeri ai integrității membranelor celulare hepatice (Yang et al., 2010).

Colesterolul total (CT) este un parametru cheie al metabolismului lipidic, iar determinarea nivelului seric al acestuia se realizează prin metode colorimetrice enzimatică (Anwar și Meki, 2003). Creatinina (Crea) este un marker specific funcției renale, care poate fi evaluat folosind metoda Jaffe sau metodă enzimatică (Schmidt et al., 2015).

2.1.6.8. Markerii moleculari

Factorul 9 de creștere și dezvoltare (GDF9) este un membru al superfamiliei TGF- β și este responsabil pentru creșterea și dezvoltarea celulelor granuloase în timpul dezvoltării foliculare (Gürgen et al., 2013). Receptorii pentru estrogen (ER) au o mulțime de roluri fiziologice, datorită vulnerabilității pentru o mulțime de liganzi (Imamov et al., 2005). Atât ER, cât și GDF9, au fost determinați prin metoda ELISA, cu ajutorul kiturilor standard. Caspaza 3 (Casp3) este un indicator al apoptozei (El-Readi et al., 2013).

2.1.6.9. Analize histologice și ultrastructurale

Pentru analiza histologică, țesutul ovarian a fost prelucrat conform protocolului descris (Toma et al., 2017). Analiza ultrastructurală a celulelor granuloase și tecale din ovar a fost realizată cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie (TEM) conform protocolului descris de (Craciun și Barbu-Tudoran, 2013).

2.1.6.10. Docking molecular la flavonoide

Simulările ligand-receptor au fost efectuate folosind docking-ul molecular, o metodă computațională care, pe baza unor funcții de scalare, poate prezice orientarea unei molecule față de alta, precum și stabilitatea complexelor moleculari în cazul în care aceștia se formează. Aceste date pot fi utilizate pentru a prezice puterea de asociere sau afinitatea de legare a acestor molecule (Ferreira et al., 2015).

2.1.7. Analiza statistică

Toate datele experimentale sunt exprimate ca medie \pm SEM. Distribuția normală a datelor a fost verificată cu testul Shapiro-Wilk. Testul statistic pentru investigarea semnificației statistice a fost ANOVA one-way, urmată de comparația multiplă a lui Bonferroni. Semnificația statistică a fost stabilită la un $p < 0.05$ (intervalul de încredere de 95%). Valorile statistice au fost obținute atât cu programul Microsoft Excel, cât și cu programul GraphPad Prism (5.0). Analiza multivariată a datelor a fost realizată cu testul PCA (Analiza componentului principal), cu ajutorul programului statistic Statistica 12 (Statsoft, USA) (Farcaș et al., 2019).

2.2. Rezultate și discuții

2.2.1. Caracteristici biologice ale unor extracte de *Plantago*

2.2.1.1. Compoziție chimică

Profilul chimic al speciilor arată, pe de o parte, specia *P. lanceolata* cu un conținut polifenolic abundent cantitativ, iar pe de altă parte, *P. sempervirens*, o specie bogată în numeroase flavonoide și acizi fenolici, cu conținut peste limita de cuantificare (LOQ) (Tabelul 15, Figura 20).

Tabelul 15. Conținutul în compuși polifenolici al unor extracte de *Plantago* (ug/g plant material)(Farcaș et al., 2019).

| Compuși polifenolici | <i>P. cornuti</i> (ug/mL) | <i>P. lanceolata</i> (ug/mL) | <i>P. major</i> (ug/mL) | <i>P. media</i> (ug/mL) | <i>P. sempervirens</i> (ug/mL) |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Acid gentisic | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <0.2 |
| Acid cafeic | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <0.2 |
| Acid clorogenic | <0.2 | 8.253 | <0.2 | 1.836 | <0.2 |
| Acid <i>p</i> -coumaric | <0.2 | <0.2 | <0.2 | 0.501 | 0.682 |
| Acid ferulic | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <0.2 | 0.456 |
| Rutin | <0.2 | 8.253 | <0.2 | <0.2 | 2.787 |
| Luteolin | 6.487 | 23.214 | 1.021 | 0.951 | 1.021 |
| Apigenin | 0.383 | 0.677 | 1.755 | 0.285 | 2.344 |
| Quercitrin | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <0.2 | NF |

Notă: Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD (n = 3).

Mai mult decât atât, odată stabilit profilul fenolic, au putut fi simulate spectrele RES pentru fiecare extract, în funcție de amprenta compușilor principali identificați (apigenin, rutin, luteolin, acid clorogenic, quercetin, kaempferol) (Figura 21). Spectrele RES au fost efectuate pentru fiecare extract, folosind diluții diferite (10x, 50x, 100x și 250x).

2.2.1.2. Activitate antioxidantă

Tabelul 16. Activitate antioxidantă la extractele de *Plantago* studiate (Farcaș et al., 2019).

| Metoda \ Extracte | <i>P. cornuti</i> | <i>P. lanceolata</i> | <i>P. major</i> | <i>P. media</i> | <i>P. sempervirens</i> |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| DPPH (mg QE/g plantă) | 0.95 \pm 0.15 | 1.25 \pm 0.15 | 0.90 \pm 0.15 | 2.20 \pm 0.15 | 6.03 \pm 0.48*** |
| TEAC (μ g TE/g plantă) | 132.40 \pm 9.42 | 194.20 \pm 1.41 | 188.70 \pm 16.77 | 272.10 \pm 9.18 | 459.50 \pm 35.78*** |
| FC (mg GAE/g plantă) | 21.39 \pm 1.10 | 32.15 \pm 0.65 | 30.66 \pm 1.67 | 40.65 \pm 1.85## | 59.14 \pm 4.34*** |

***Semnificativ la $p < 0.001$ în comparație cu *P. cornuti*, *P. lanceolata*, *P. major* și *P. media*

Semnificativ la $p < 0.01$ în comparație cu *P. cornuti*

Notă: Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD (n = 3)

Analiza comparativă a celor cinci extracte arată faptul că extractul hidroalcoolic de *P. sempervirens* este, de departe, de 3-5x mai antioxidant decât omologii săi (*P. cornuti*, *P. major*, *P. media* și *P. lanceolata*) (Tabelul 16). Activitatea antioxidantă rezultă din reacțiile împotriva radicalilor DPPH și ABTS, dar și prin reducerea reactivului Folin-Ciocalteu. Aceste rezultate sunt asociate, în principal, cu concentrațiile în rutin și apigenin, dar și cu întreg spectrul de compuși identificați peste LOQ, prin metoda cromatografică. *P. sempervirens* este o specie descrisă vag în literatură, cu mici excepții, care includ și rezultatele prezente în această teză de doctorat (Farcaș et al., 2019; Venditti et al., 2011).

2.2.1.3. Activitate prooxidantă

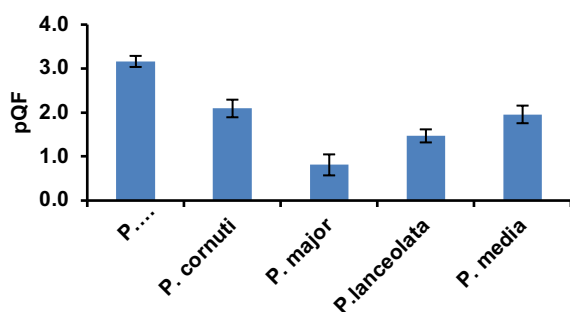


Figura 22. Activitatea prooxidantă a extractelor de *Plantago* exprimată ca factor prooxidant de quercetin (pQF) (Farcaș et al., 2019).

În Figura 22 se observă rezultatele activității prooxidante pentru fiecare extract de *Plantago*, însă, deși există diferențe între extracte, rezultatele nu sunt statistic semnificative. Există studii care arată posibilitatea luteolinului, rutinului și quercetinului de a genera radicali

Se cunoaște faptul că unii compuși polifenolici precum quercetinul sau rutinul au posibilitatea de a genera radicali, care au proprietăți prooxidante (Moț et al., 2014).

liberi, care prezintă proprietăți prooxidante (Balđim et al., 2017; Cherrak et al., 2016; Eghbaliferiz și Iranshahi, 2016; Farcaș et al., 2018; Moț et al., 2014).

2.2.1.4. Evaluarea potențialului regenerativ *in vitro*

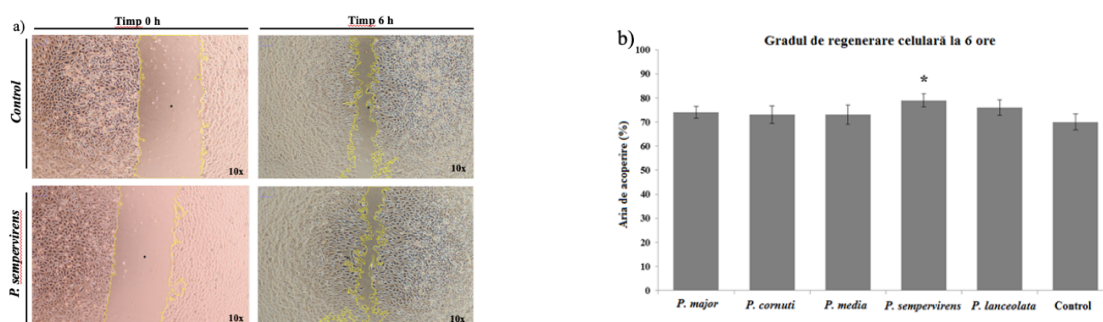


Figura 23. Gradul de regenerare celulară după expunerea la extracte de *Plantago* (b); Aria de acoperire a leziunii înainte și după expunerea celulelor la extract de *P. sempervirens*, (6 ore) (Farcaș et al., 2019).

Rezultatele obținute în urma testelor *in vitro* pentru regenerare celulară (Figura 23 a,b) prezintă extractul de *P. sempervirens* ca potențial stimulent al procesului de regenerare celulară, statistic semnificativ mai eficient în comparație cu omologii săi (Figura 23, b). Expunerea celulelor EA.hy926 la *P. sempervirens* a indus o migrare celulară constantă chiar și după 6 ore (Figura 23, a). În acest punct, analizele statistice arată procesul regenerativ crescut cu 20% la celulele cu *P. sempervirens* în mediul de cultură, spre deosebire de grupul control.

Așadar, rezultatele obținute în această teză de doctorat demonstrează faptul că, extractul de *P. sempervirens* poate modula procesul de migrare celulară mult mai eficient decât extractele omoloage. Un conținut bogat în flavonoide și fenilpropanoide, responsabile de neutralizare a radicalilor, poate contribui la procesul de migrare celulară (Zubair et al., 2012a).

2.2.1.5. Activitate antioxidantă și antiinflamatoare *in vivo*

Inflamația este asociată cu o mulțime de boli cronice, iar răspunsul inflamator este strâns legat de stresul oxidativ și nitro-oxidativ (Akchurin și Kaskel, 2015; Verdile et al., 2015). Pentru a evalua potențialul antioxidant al extractului de *P. sempervirens*, a fost adoptat un model *in vivo* de inflamație cu ajutorul uleiului de terebentină.

Inflamația indusă experimental (Figura 24, ABCD, grupul I) se remarcă dintre toate celelalte grupuri experimentale, din pricina faptului că valorile parametrilor de stres oxidativ sunt semnificativ modificate, după cum urmează: TOS ($p < 0.001$); OSI ($p < 0.001$) și MDA ($p < 0.01$) semnificativ crescute față de control (C). După cum se observă în Figura 24, cea mai mică doză (IP25) de *P. sempervirens* a avut cel mai bun efect inhibitor asupra concentrațiilor TOS ($p < 0.05$). O consecință a stresului oxidativ crescut este formarea de lipoperoxizi, un proces care afectează puternic membranele celulare (Chen et al., 2013). Așa cum se observă în Figura 24, nivelul MDA a fost puternic crescut ca urmare a proceselor inflamatorii.

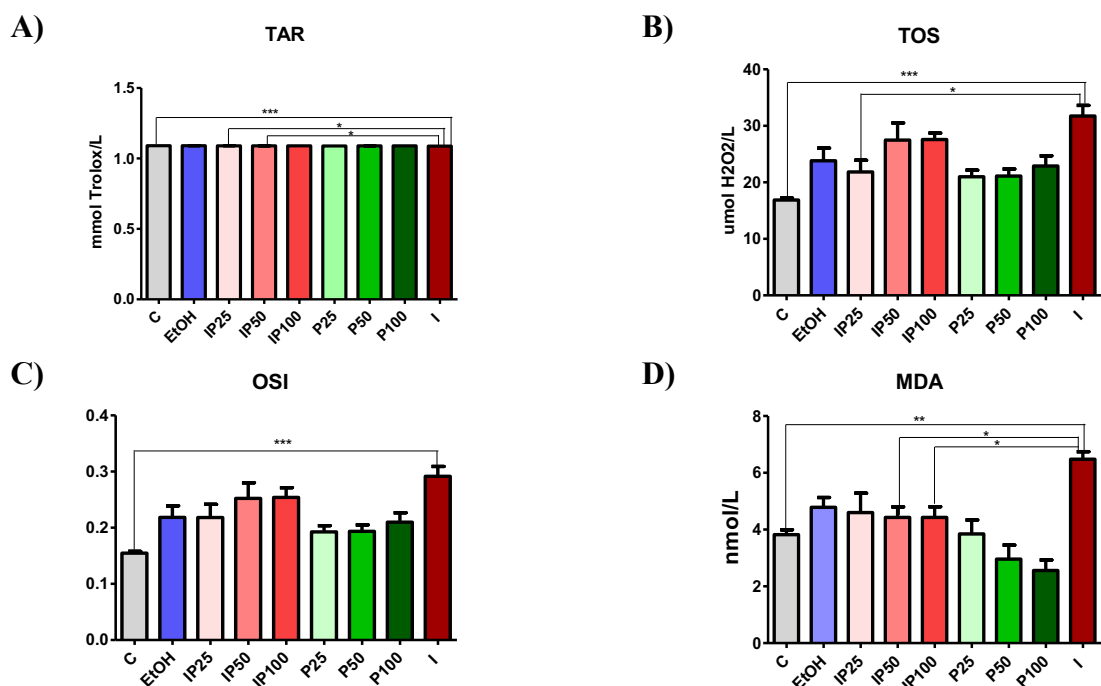
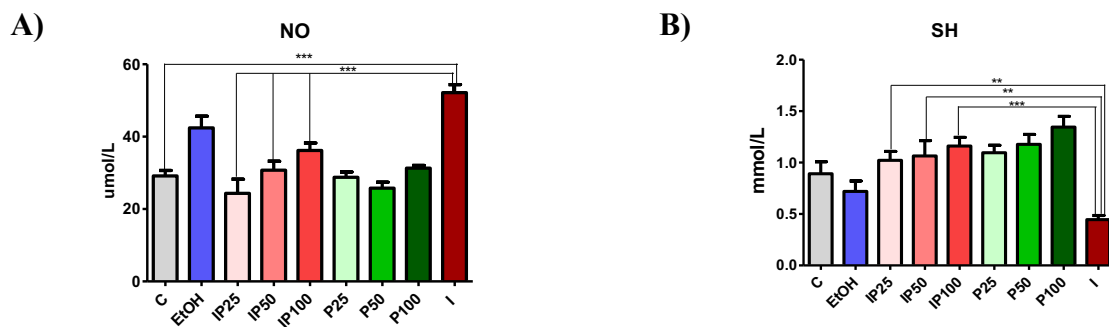


Figura 24. Efectele extractului de *P. sempervirens* asupra răspunsului antioxidant total (TAR) (A), stresului oxidativ total (TOS) (B), indicelui de stres oxidativ (OSI) (C) și asupra malondialdehidei (MDA) (D) în ser la șobolan. Datele reprezintă media \pm SEM. A fost aplicat testul ANOVA One-way urmat de testul pentru comparație multiplă a lui Bonferroni; * Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.001$ (Farcaș et al., 2019).

Toate cele trei diluții de *P. sempervirens* au redus semnificativ producția *in vivo* de NO, ceea ce ar putea reduce și mai mult inflamația. Rezultatele noastre, legate de nivelurile de NO, au fost în concordanță cu concentrațiile TOS, OSI și MDA. Cele trei doze de extract au sporit semnificativ concentrațiile de SH într-un mod dozo-dependent. Mai mult, reacțiile oxidativ-inflamatorii sunt corelate cu activitatea enzimelor antioxidante (Lee et al., 2012). SOD și CAT au prezentat o scădere a activității în inflamație, dar extractul de *P. sempervirens* și-a dovedit încă o dată potențialul benefic prin susținerea utilității sale în creșterea activității acestor două enzime.



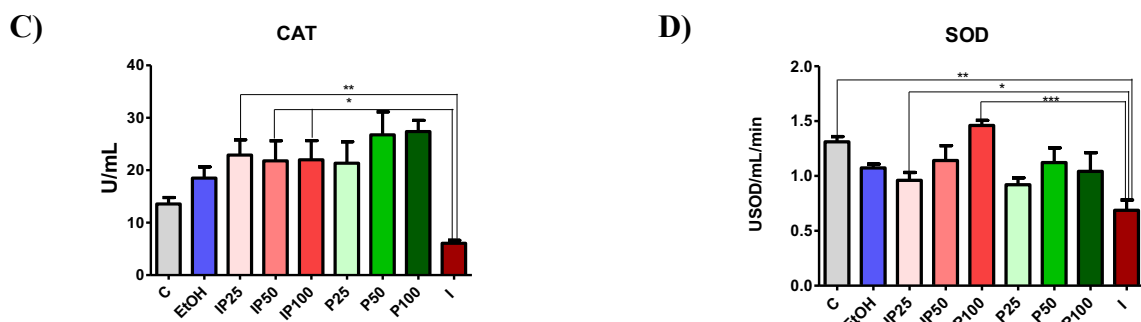


Figura 25. Efectele extractului de *P. sempervirens* asupra oxidului nitric (NO) (A), concentrației de tioli (SH) (B), activității catalazei (CAT) (C) și activității superoxid dismutazei (SOD) (D) în ser la șobolan. Datele reprezintă media \pm SEM. A fost aplicat testul ANOVA One-way urmat de testul pentru comparație multiplă a lui Bonferroni. * Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.00$ (Farcaș et al., 2019).

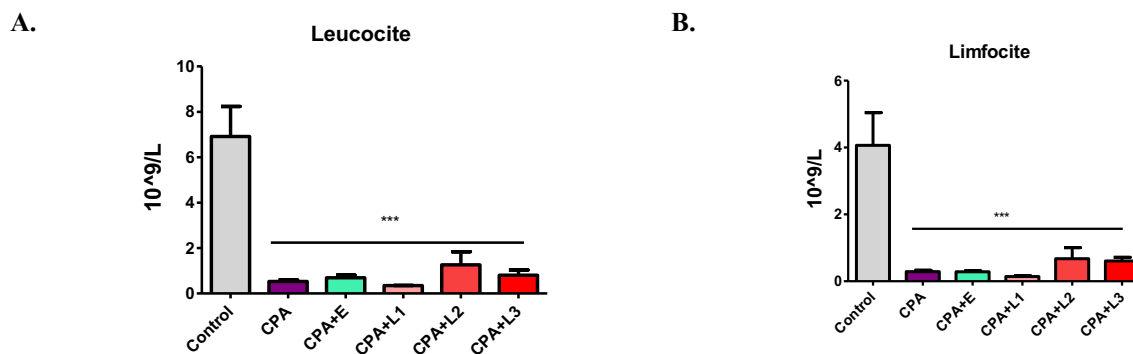
Biomarkeri ai inflamației, cum ar fi TP, Alb, Glob, Alb/Glob și CRP, sunt prezentați în Tabelul 17. Efectul inflamator al uleiului de terebentină este asociat cu creșterea stresului oxidativ, așa cum se arată în secțiunile anterioare, dar și odată cu creșterea biomarkerilor timpurii ai metabolismului proteic al inflamației (Tabelul 17). Tratamentul cu *P. sempervirens* a determinat scăderea concentrațiilor proteice aproape de nivelul control sau chiar sub acest prag (CRP la IP100, $p < 0.05$), (ALB la IP100, $p < 0.05$), (TP la IP50, $p < 0.05$, iar la IP100, $p < 0.05$).

Tabelul 17. Concentrația proteinei C reactive (CRP), albuminei (ALB) și a proteinelor totale (PT) la control și animalele experimentale. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SEM (Farcaș et al., 2019).

| Param. | Control | EtOH | I | P25 | P50 | P100 | IP25 | IP50 | IP100 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CRP (mg/dL) | 47.6 \pm 6.3 | 50.3 \pm 5.3 | 184.3 \pm 28.4* | 110 \pm 25.2 | 79.6 \pm 25.1 | 162.7 \pm 29.3 | 72.3 \pm 27.5 | 64.3 \pm 11.5 | 40 \pm 4.3# |
| ALB (g/dL) | 1.59 \pm 0.3 | 1.79 \pm 0.1 | 2.50 \pm 0.6** | 1.31 \pm 0.9 | 1.70 \pm 0.5 | 2.01 \pm 0.8 | 1.67 \pm 0.3 | 1.46 \pm 0.4 | 1.16 \pm 0.0# |
| TP (g/dL) | 6.5 \pm 0.6 | 9.6 \pm 0.6 | 11.3 \pm 1.0** | 3.0 \pm 0.5 | 4.3 \pm 1.0 | 5.6 \pm 1.1 | 8.5 \pm 0.4 | 7.0 \pm 0.9# | 6.8 \pm 0.6# |
| Glob (g/dL) | 4.75 \pm 0.6 | 7.58 \pm 0.7 | 8.86 \pm 0.9* | 1.69 \pm 0.52 | 2.6 \pm 0.9 | 3.67 \pm 0.9 | 6.82 \pm 0.4 | 5.55 \pm 0.9 | 5.22 \pm 0.4 |
| ALB/Glob | 0.36 \pm 0.05 | 0.31 \pm 0.08 | 0.29 \pm 0.02 | 0.44 \pm 1.08 | -0.10 \pm 1.03 | -0.07 \pm 0.50 | 0.25 \pm 0.04 | 0.34 \pm 0.10 | 0.22 \pm 0.06 |

* Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.001$ (comparat cu Control); #Semnificativ la $p < 0.05$; ##Semnificativ la $p < 0.01$; ### Semnificativ la $p < 0.001$ (comparat cu I); Param = parametri.

2.2.1.6. Activitate estrogeno-mimetică a flavonoidelor



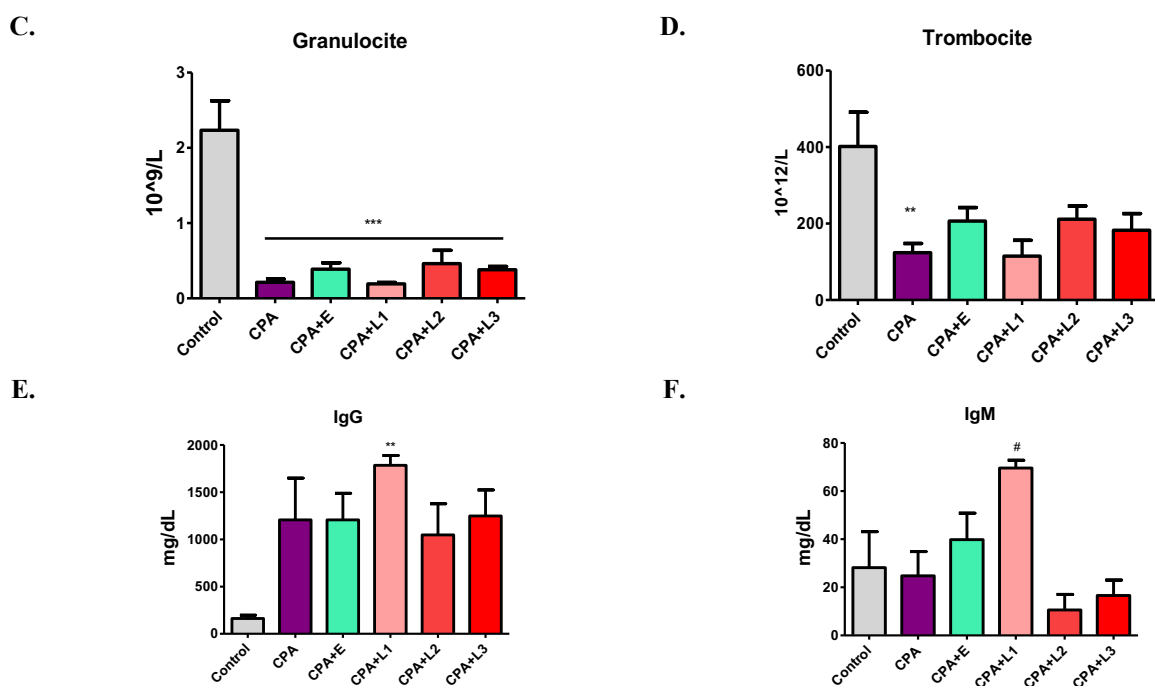


Figura 27. Efectele luteolinului și extractului de *P. lanceolata* asupra răspunsului imun la șobolan expus la ciclofosfamidă; Număr de leucocite (A); Număr de limfocite (B); Număr de granulocite (C); Număr de trombocite (D); concentrația IgG (E); concentrația IgM (F); Datele reprezintă media \pm SEM. A fost aplicat testul ANOVA One-way urmat de testul pentru comparație multiplă a lui Bonferroni; * Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.001$.

Modificările hematologice, din Figura 27 (A, B, C, D), ne arată o imunosupresie masivă, care implică scăderea semnificativă a leucocitelor ($p < 0.001$), limfocitelor ($p < 0.001$), granulocitelor ($p < 0.001$) și a trombocitelor ($p < 0.01$), ceea ce demonstrează activitatea imunosupresoare a ciclofosfamidei. Extractul și cele trei doze de luteolin nu contracarează acest efect, cel puțin nu la nivel celular. Concentrația imunoglobulinelor (IgG și IgM) (Figura 27, E și F) prezintă modificări, însă fără semnificație statistică. Extractul și cele trei doze de luteolin nu induc modificări semnificative ale acestor parametri, cu excepția L1 care pare să stimuleze semnificativ producția de anticorpi, spre deosebire de dozele mai concentrate (Figura 27, E și F).

Stresul oxidativ determinat din ser (Figura 28, ABCD) variază direct proportional cu parametri de stres oxidativ din ovare (Figura 29, ABCD). CPA induce o creștere semnificativă a valorilor MDA, din ser ($p < 0.05$) (Figura 28, A) și din țesut ($p < 0.001$) (Figura 29, A). Activitățile enzimatiche și valorile GSH sunt scăzute considerabil ($p < 0.05$; $p < 0.01$), iar extractul de *P. lanceolata* și cele trei doze de luteolin (L1, L2 și L3) contribuie semnificativ la restabilirea echilibrului homeostazic, la valori apropiate de lotul control. Proteina C reactivă (CRP), deși prezintă modificări vizibile grafic, acestea nu sunt statistic semnificative. Depleția masivă de GSH poate fi atribuită conjugării directe a acroleinei, metabolit secundar al CPA, reducând astfel nivelul de glutatation și generând stres oxidativ (Nafees et al., 2015). Luteolinul, ca tratament individual, dar și luteolinul din extract, previne depleția de glutatation, iar astfel, sistemele

antioxidante sunt stimulate să neutralizeze radicalii liberi produși de acțiunea CPA. Colesterolul și proteinele totale determinate din țesutul ovarian prezintă variații între loturile experimentale, însă fără semnificație statistică (Figura 29, E, F).

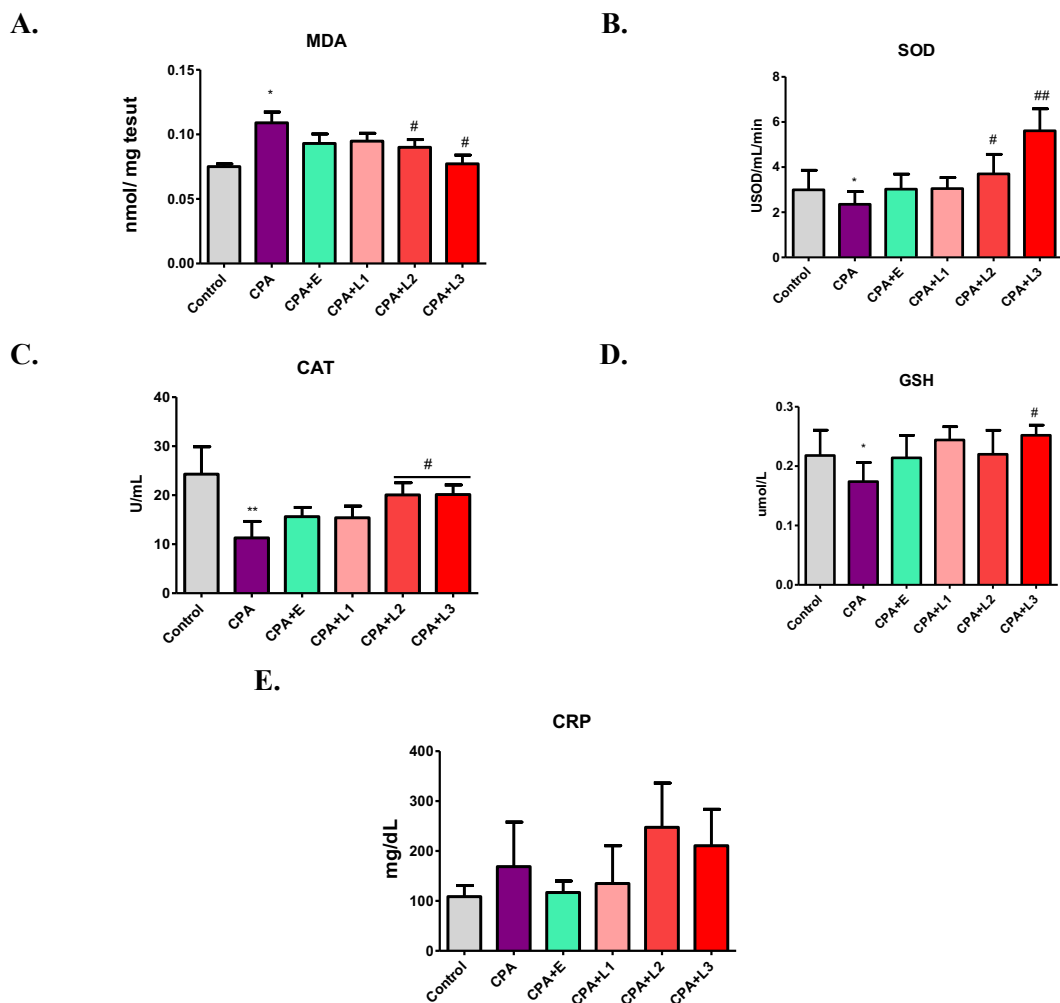
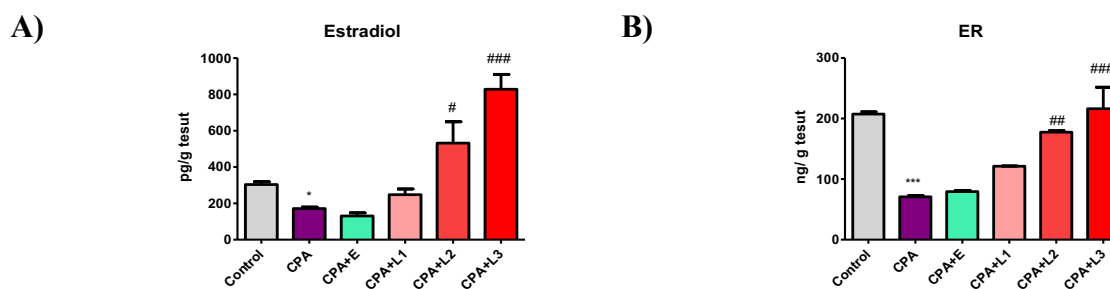


Figura 28. Efectele luteolinului și extractului de *P. lanceolata* asupra stresului oxidativ din serul de la șobolan expus la ciclofosamidă; concentrația de malondialdehidă (MDA) (A); activitatea superoxid dismutazei (SOD) (B); activitatea catalazei (CAT) (C); concentrația glutationului (D); concentrația proteinei C reactive (CRP) (E). Datele reprezintă media ± SEM. A fost aplicat testul ANOVA One-way urmat de testul pentru comparație multiplă a lui Bonferroni; * Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.00$.



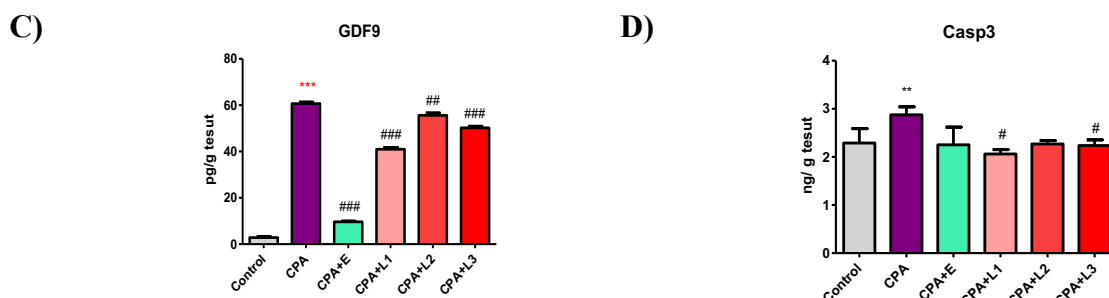


Figura 31. Efectele luteolinului și extractului de *P. lanceolata* asupra funcției de reproducere în țesutul ovarian la șobolan expus la ciclofosamidă; concentrația estradiolului (A); expresia receptorului pentru estrogen (ER) (B); factorul 9 de creștere și dezvoltare (GDF9) (C); caspaza 3 (Casp3) (D); Datele reprezintă media ± SEM. A fost aplicat testul ANOVA One-way urmat de testul pentru comparație multiplă a lui Bonferroni; * Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.001$.

Acești hormoni au capacitatea de a menține focarele de celule germinale, datorită receptorilor pentru estrogen (ER1 și ER2). În Figura 31 sunt reprezentate concentrația estradiolului (A) și expresia receptorului acestuia (ER) (B), ambele fiind puternic afectate de CPA. Un marker cheie al reglării foliculogenezei și al ovulației este factorul de creștere și diferențiere 9 (GDF9). De obicei, expresia acestui factor este asociată cu o dezvoltare normală a oocitelor și apoi a celulelor cumulus, care înconjoară oocitul spre formarea primului folicul, numit și primordial (Sánchez și Smits, 2012) (Figura 32). În figura 31 (C), se observă o creștere aberantă ($p < 0.001$) a acestui indicator de dezvoltare în cazul lotului expus ciclofosamidei, iar extractul și cele 3 doze de luteolin prezintă modificări semnificativ mai mici ($p < 0.001$), în comparație cu lotul CPA. Un potențial mecanism terapeutic al luteolinului, dar și al extractului, s-ar putea sprijini pe efectul anti-apoptotic. În figura 31 (D) se observă o creștere a caspazei 3, indicator al apoptozei în urma administrării ciclofosamidei, însă extractul, dar mai ales luteolinul, prezintă un efect anti-apoptotic.

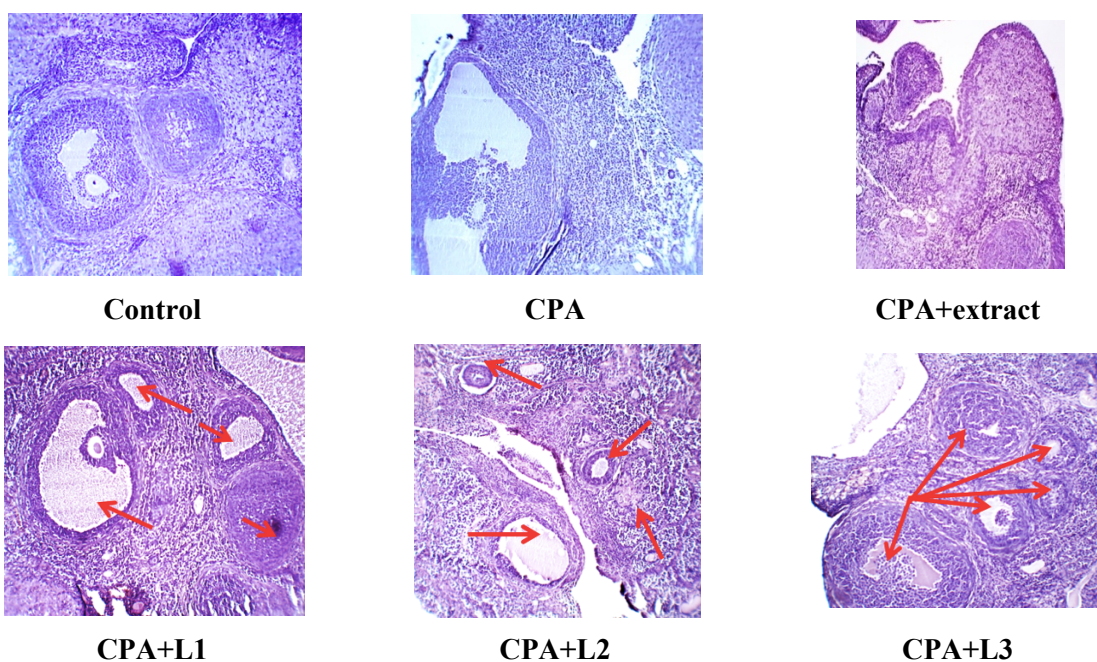


Figura 33. Microfotografii reprezentative ale dinamicii foliculare la șobolan (*Control*, *CPA*, *CPA+ extract*, *CPA+L1*, *CPA+L2*, *CPA+L3*), colorație cu hematoxină-eozină, la microscop optic, magnificație x200.

Analiza histologică (Figura 33) prezintă dinamica foliculară la toate loturile experimentale (*Control*, *CPA*, *CPA+extract*, *CPA+L1*, *CPA+L2*, *CPA+L3*). În imaginile corespunzătoare lotului *CPA*, se poate observa un singur folicul antral, care în interiorul său a acumulat o cantitate considerabilă de lipide (Figura 33, *CPA*). Cea mai spectaculoasă evoluție foliculară se observă în imaginile corespunzătoare lotului *CPA+L3*, în care o serie de foliculi primordiali, primari, secundari, dar și antrali pot fi ușor identificați (Figura 33, *CPA+L3*). Imaginile din figura 33 demonstrează efectul dozo-dependent al luteolinului, care, atât prin mecanisme de reducere a stresului oxidativ, cât și prin calitatea de modulator selectiv al receptorului pentru estrogen, stimulează foliculogeneza ovariană.

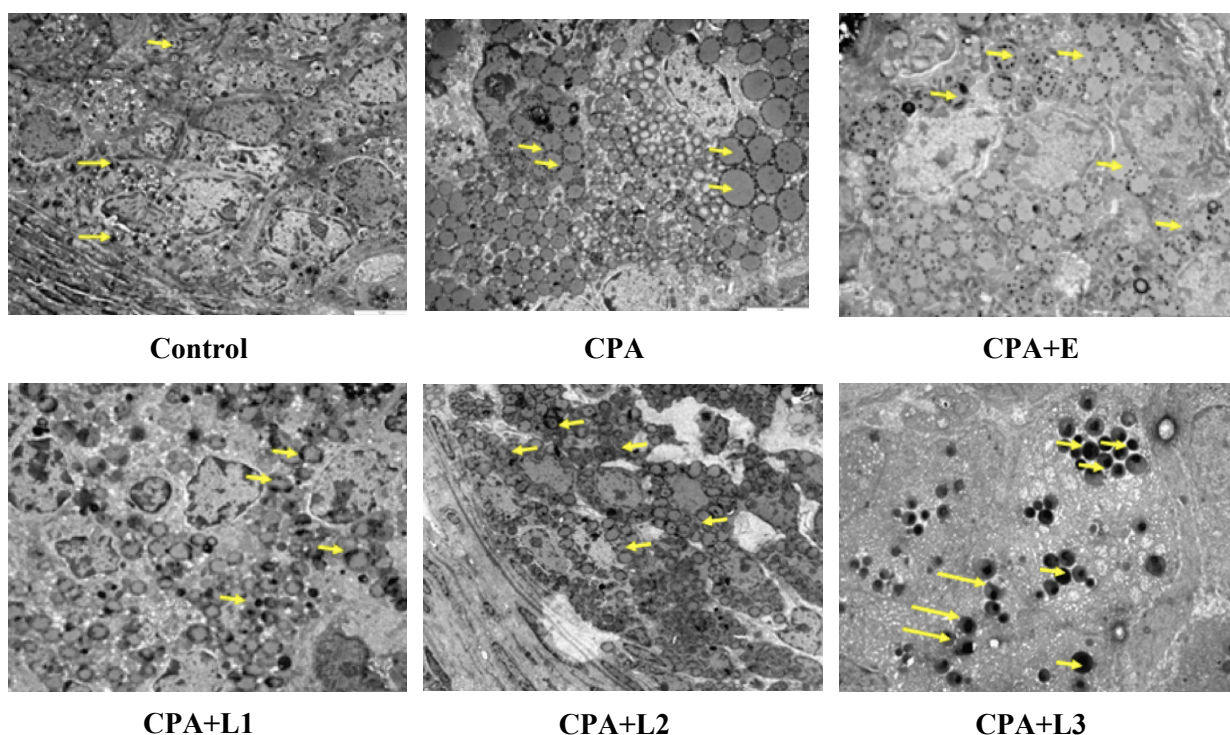


Figura 34. Detalii ultrastructurale ale celulelor granuloase și celulelor theca din ovare la șobolan (*Control*, *CPA*, *CPA+ extract*, *CPA+L1*, *CPA+L2*, *CPA+L3*), la TEM, magnificație x3000.

Evaluarea prin microscopie electronică prin transmisie (TEM) a celulelor granuloase, a celulelor cumulus și a celulelor theca arată câteva detalii surprinzătoare ale unor corpusculi electron-denși, care pot fi asociați cu granule secretoare de hormoni (Figura 34).

2.2.1.7. Concluzii

Extractele de *Plantago* cercetate (*P. cornuti*, *P. major*, *P. media*, *P. lanceolata* și *P. sempervirens*) au fost analizate prin metode moderne (HPLC) și se deosebesc fitochimic în ceea ce privește cantitatea de compuși fenolici, în special apigenin, luteolin, rutin și acid clorogenic;

Profilul chimic al speciilor arată, pe de o parte, specia *P. lanceolata* cu un conținut polifenolic abundent în luteolin, iar pe de altă parte, specia *P. sempervirens*, o specie bogată în

numeroși compuși (flavonoide și acizi fenolici), cu conținut peste limita de cuantificare (Tabelul 15, Figura 20) (Farcaș et al, 2019);

Activitatea antioxidantă *in vitro* a fost investigată prin metode diferite (DPPH, TEAC, FC), care, desemnează *P. sempervirens* ca fiind cel mai puternic antioxidant dintre toate cele cinci extracte investigate (Tabelul 16) (Farcaș et al, 2019);

Extractul de *P. sempervirens* a indus o migrare celulară constantă a celulelor endoteliale, chiar și după 6 ore, ceea ce demonstrează un efect proliferativ semnificativ mai mare, în comparație cu extractele omoloage (Figura 23, a și b) (Farcaș et al, 2019);

Activitatea antioxidantă *in vivo* a fost evaluată pe un model de inflamație sistemică de tip acut, la șobolan de laborator, folosind ulei de terebentină. Tratamentul preventiv cu extract de *P. sempervirens*, în trei doze diferite, a redus stresul oxidativ indus de inflamație, prin diminuarea valorilor de stres nitro-oxidativ (MDA, TOS, OSI, NO) (Fig. 24 și Fig. 25) și prin stimularea antioxidantilor neenzimatici și enzimatici endogeni (SOD, CAT, GSH, TAR) (Fig. 25) într-un mod dependent de doză (Farcaș et al, 2019);

Activitatea estrogenică a luteolinului a fost demonstrată prin creșterea indicatorilor esențiali ai foliculogenezei precum: concentrația estrogenului, GDF9, dinamica foliculară (Fig. 33), expresia receptorului pentru estrogen, dar și prin efectul anti-apoptotic (Fig. 31).

2.2.2. Caracteristici biologice ale extractului de *Galium verum*

2.2.2.1. Compoziție chimică

Analiza fitochimică a extractului de *G. verum* dezvăluie un set de compuși fenolici, printre care se remarcă, într-o proporție mare, acidul clorogenic și rutinul (Tabelul 21).

Tabelul 21. Timpul de eluție, parametri analitici și concentrațiile compușilor determinați în probele de extract de *Galium verum* (Farcaș et al., 2018).

| Nr | Compuși | t _{eluție} (min) | R ² | LOD (μg/mL) | LOQ (μg/mL) | extract nehidrolizat (μg/mL) | SD (μg/mL) | extract hidrolizat (μg/mL) | SD (μg/mL) |
|----|------------------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| 1 | ac. clorogenic | 6.32 | 0.997 | 4.3 | 13.0 | 1748 | 42 | 568 | 59 |
| 2 | ac. <i>p</i> -coumaric | 8.43 | 0.998 | 1.4 | 4.1 | 82 | 1 | 80 | 3 |
| 3 | ac. ferulic | 9.28 | 0.999 | 1.5 | 4.7 | 24 | 0.1 | 39 | 7 |
| 4 | rutin | 12.28 | 0.999 | 1.9 | 5.8 | 1604 | 10 | 91 | 0.1 |
| 5 | isoquercitrin | 12.94 | 0.999 | 2.1 | 6.3 | 308 | 8 | 168 | 10 |
| 6 | quercetină | 19.27 | 0.999 | 6.0 | 18.1 | 36 | 1 | 659 | 139 |

LOD – limita de detecție, *LOQ* – limita de cuantificare, *R*² – coeficient de determinare pentru curbele de calibrare, *SD* reprezintă deviația standard (*n*=4).

Pe lângă conținutul bogat în acid clorogenic și rutin, extractul de *G. verum* conține cantități importante de acid *p*-coumaric, acid clorogenic, isoquercitrin și quercetină. Date din literatură arată un profil similar de compuși fenolici identificat la specia *G. verum* (Chen et al., 2017; Kuhtinskaja și Vaher, 2018). Extractul hidrolizat conține o cantitate mult mai mare de quercetină care provine de la glicozide pe bază de quercetină, cum ar fi rutin și isoquercitrin.

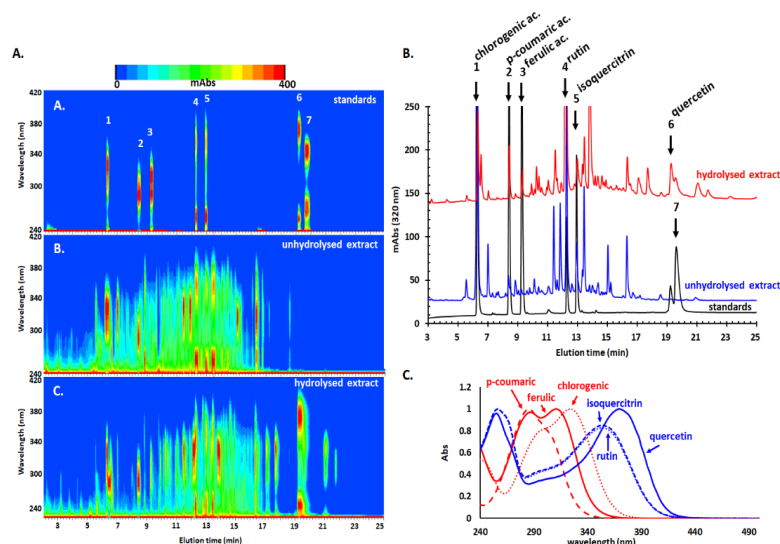


Figura 35. Analiza HPLC-UV-vis a extractului de *G. verum* hidrolizat și nehidrolizat (A) Grafic de tip heatmap a profilului cromatografic în funcție de timpul de eluție; **(B)** Cromatogramele celor două extracte (hidrolizat și nehidrolizat) și a standardelor monitorizate la 320 nm; **(C)** Spectrul UV-vis de absorbție moleculară la șase standarde folosite (Farcaș et al., 2018).

Pe de o parte, după hidrolizare, extractul de *G. verum* prezintă, în primul rând, o cantitate mult mai mare de quercetină (de la 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ în extractul nehidrolizat, la 659 $\mu\text{g}/\text{mL}$ în extractul hidrolizat; Tabelul 21). Pe de altă parte, hidrolizarea extractului dezvăluie o serie de compuși chimici noi, precum cei prezentați în tabelul 22, pozițiile 9 și H14, care reprezintă structuri chimice similare acizilor fenolici (9) și flavonoidelor (14).

2.2.2.2. Activitate antioxidantă și prooxidantă

În comparație cu alte extracte vegetale analizate, în prezenta lucrare de doctorat, *G. verum* pare să aibă o activitate semnificativ mai mare prin testul cu DPPH (4,6 mg echivalenți de quercetină/g de material vegetal), comparativ cu metoda TEAC (0,082 mg echivalenți quercetină/g plantă). Aceasta înseamnă că majoritatea constituenților chimici acționează mai bine într-un mediu mai hidrofob sau asociat cu compartimentele celulelor hidrofobe, cum ar fi membranele (Benedec et al., 2014b).

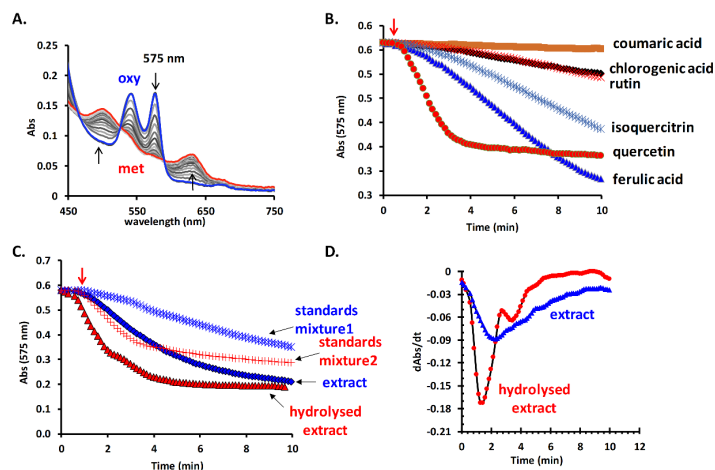


Figura 37. Evaluarea activității prooxidante a extractului de *G. verum*. oxyHb (25 μM) este rapid oxidată la forma metHb în prezența extractului și lacazei (100 nM) **(A)**; Comparația dintre reactivitatea prooxidantă și compușii identificați în extract, la

aceeași concentrație (5 μ M) (B); amestecul compușilor în proporții identice, cu cele din extract, înainte de hidrolizare (Mixtura 1) și după amestec (Mixtura 2) (C); Comparația profilului cinetic al oxidării oxihb în prezența celor două extracte și a lacazei (D) (Farcaș et al., 2018).

Experimente anterioare au arătat faptul că există o relație directă între conținutul fenolic total al extractelor de plante și intensitatea semnalului detectat folosind metoda RES, pentru probe tratate în mediu alcalin (Moț et al., 2009).

2.2.2.3. Activitate antioxidantă *in vivo*

Expunerea la stres de imobilizare, combinat cu stresul de întuneric, a dus la creșterea corticosteronului plasmatic (RS; $p < 0,05$). Loturile tratate cu *G. verum* (SG1 și SG2) au prezentat o scădere dependentă de doză a nivelului corticosteronului (Figura 39A). Pe de altă parte, nivelurile plasmatiche ale epinefrinei, în condiții de stres, s-au modificat similar cu corticosteronul, mai exact, o creștere semnificativă ($p < 0,05$) în comparație cu grupul control. Mai mult, s-au constatat diferențe între cele două doze distincte de extract (SG1 și SG2), așa cum se vede în figura 39 (AB), în care doza mai concentrată (SG2), spre deosebire de SG1, a redus în mod remarcabil și statistic semnificativ nivelurile hormonale. Acest indicator (colesterolul) se modifică dozo-dependent, scade la o concentrație mai mare de extract (SG2), ceea ce poate determina inhibiția căii de sinteză a corticosteronului (Abobaker et al., 2019; Teixeira et al., 2017).

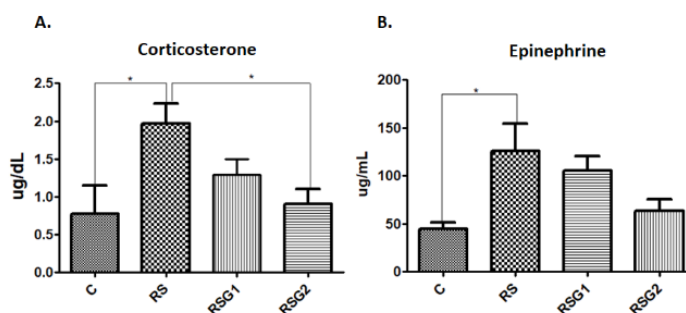


Figura 39. Determinarea concentrației hormonilor de stres (corticosteron și epinefrină) la control și loturile experimentale tratate cu *G. verum*; Histogramele reprezintă media \pm SEM, n=6, (A) C= 0.434 μ g/dL; S= 1.96 μ g/dL; SG1= 1.29 μ g/dL; SG2= 0.90 μ g/dL; (B) C= 44.4 μ g/mL; S= 125.7 μ g/mL; SG1= 106 μ g/mL; SG2= 63.7 μ g/mL; * Semnificativ la $p < 0,05$; (testul t test pentru concentrațiile de corticosteron și testul ANOVA urmat de testul post-hoc a lui Bonferroni pentru concentrațiile de epinefrină; GraphPad software, San Diego, CA)(Farcaș et al., 2018).

Efectele stresului repetat asupra activităților enzimelor antioxidante (CAT, SOD) alături de TBARS (MDA), markeri ai stresului oxidativ, sunt descrise în tabelul 23. Activitățile CAT și SOD au fost semnificativ ($p < 0,05$) scăzute în stresul de imobilizare, spre deosebire de valorile obținute la grupul control. În plus, nivelul TBARS a crescut semnificativ ($p < 0,05$) doar în stres, comparativ cu valorile de control. Tratamentul cu extract de *G. verum* a determinat o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a activităților enzimatiche, în comparație cu lotul expus doar la stres (S).

Tabelul 23. Parametri de stres oxidativ la control și loturile experimentale tratate cu *G. verum*. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SEM (Farcaș et al., 2018).

| Parametri | Control | S | SG1 | SG2 |
|-------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| CAT(U/mL) | 56.36±4.10 | 41.51±5.99* | 56.95±3.14# | 61.01±1.21# |
| SOD (USOD/mL/min) | 0.80±0.00 | 0.68±0.01* | 0.82±0.01 | 0.85±0.00# |
| TBARS (nmol/mL) | 4.43±0.47 | 8.06±1.26* | 4.74±0.67 | 3.73±0.69# |

* Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.001$ (în comparație cu Control); # Semnificativ la $p < 0.05$; ## Semnificativ la $p < 0.01$; ### Semnificativ la $p < 0.001$ (în comparație cu RS).

Modificări similare au fost observate în nivelurile circulante ale markerilor biochimici ai grupurilor control și cele cu tratament (Tabelul 24). Nivelurile de colesterol ($p < 0,05$) și creatinina ($p < 0,001$) au fost semnificativ crescute doar în timpul stresului, comparativ cu valorile de control, în timp ce expunerea la *G. verum* a redus nivelul colesterolului. Cea mai spectaculoasă scădere a fost observată în grupul SG2 ($p < 0,01$) în comparație cu lotul S. Activitatea TP și ALT nu a suferit modificări, după expunerea la stres, dar există o tendință de creștere a activității AST. Activitatea AST a urmat aceeași tendință precum nivelul colesterolului. Astfel, cea mai mică activitate a fost înregistrată în grupul SG2, diferit semnificativ ($p < 0,05$) față de grupul S. În comparație cu controlul, activitatea ALT a fost redusă semnificativ ($p < 0,01$) în ambele grupuri tratate cu extract (SG1 și SG2), dar rezultatele sunt semnificative doar între SG1 și S ($p < 0,05$).

Tabelul 24. Biochimie serică la control și loturile experimentale tratate cu *G. verum*. Valorile sunt exprimate ca medie ± SEM (Farcaș et al., 2018).

| Parametri | Control | S | SG1 | SG2 |
|--------------|-------------|--------------|---------------|---------------|
| TP (g/dL) | 12.96±2.48 | 11.44±6.61 | 11.22±1.37 | 8.60±2.06**,# |
| Chol (mg/dL) | 83.50±12.59 | 135.0±9.80* | 118.0±14.39 | 74.29±3.79## |
| AST (U/L) | 221.0±10.88 | 243.0±8.00 | 235.2±13.68 | 166.7±10.93# |
| ALT (U/L) | 86.0±0.00 | 90.0±1.95 | 54.0±5.37**,# | 59.8±3.73** |
| Crea (mg/dL) | 0.80±0.00 | 1.17±0.02*** | 1.20±0.05*** | 1.26±0.04*** |

* Semnificativ la $p < 0.05$; ** Semnificativ la $p < 0.01$; *** Semnificativ la $p < 0.001$ (în comparație cu Control);

Semnificativ la $p < 0.05$; ## Semnificativ la $p < 0.01$; ### Semnificativ la $p < 0.001$ (în comparație cu RS).

În experimentele noastre, a fost utilizat un model de stres de imobilizare, asociat cu expunerea la întuneric, pentru a perturba echilibrul homeostazic și pentru a investiga și valida efectele protectoare și adaptogene ale extractului de *G. verum*. Animalele expuse stresului au prezentat nivelurile de corticosteron și epinefrină semnificativ crescute, ca dovadă a unei glande suprarenale hiperactive. Astfel, cercetările noastre, prin prisma markerilor de stres oxidativ (TBARS, SOD, CAT), parametrilor hepatici (ALT și AST, concentrația totală a proteinelor, colesterolul), parametrilor renali (creatinina), în condiții de stres oxidativ, prezintă rezultate similare cu cele raportate în literatură. Ambele doze de extract de *G. verum*, utilizate în experimentele noastre, au îmbunătățit rezultatul clinic investigat, în special doza mai concentrată (SG2). Cercetările noastre arată faptul că extractul conține polifenoli, cu precădere acid clorogenic și rutin, responsabili, probabil, pentru rezultatul îmbunătățit al parametrilor clinici. După expunerea la stres, o activitate ridicată a transaminazelor hepatice reprezintă un marker al

deteriorărilor hepatice (Bao et al., 2008). ALT și AST rămân cei mai importanți indicatori pentru evaluarea celulelor hepatice, care, în experimentul nostru, au fost puternic influențate de extractul de *G. verum*. Tratamentul s-a dovedit a fi extrem de eficient prin reducerea nivelurilor acestor enzime, atingând valori chiar mai mici decât valorile de control. În plus, scăderea enzimelor hepatice apare rar și nu este pe deplin înțeleasă (Lum, 1995), dar scăderea acestor enzime, după numai 7 zile de tratament cu *G. verum*, arată o potențială regenerare rapidă a hepatocitelor. De asemenea, SG2 a scăzut semnificativ nivelul colesterolului seric, efect care poate fi legat de efectele hipocolesterolemizante ale acidului clorogenic. De asemenea, există studii care arată eficiența acidului clorogenic în stimularea β -oxidării acizilor grași și inhibiția activităților HMG-CoA reductazei în ficat (Cho et al., 2010).

2.2.2.4. Concluzii

Pe baza datelor din literatură și a rezultatelor cercetării efectuate, pe extractul de *Galium verum*, pot fi formulate mai multe concluzii:

Compoziția chimică a extractelor de *G. verum* este reprezentată de compușii: acid clorogenic (predominant cantitativ), rutin, acid *p*-coumaric, acid ferulic, isoquercitrin și quercetină, identificați în cantități diferite (Tabelul 21); Extractul de *G. verum* hidrolizat conține o cantitate mult mai mare de quercetină care provine de la glicozide pe bază de quercetină, cum ar fi rutin și isoquercitrin (Tabelul 21);

Evaluarea activității antioxidante *in vitro* a extractului de *G. verum* a fost realizată prin metode diferite (DPPH și TEAC), care au arătat o activitate semnificativ mai mare prin metoda cu DPPH, comparativ cu metoda TEAC (pag 94);

Extractul de *G. verum* diminuează leziunile oxidative induse de stresul neuropsihic având un efect modulator asupra axei hipotalamo-hipofizo-adrenocorticală, prin reducerea nivelurilor plasmatică de corticosteron, epinefrină și parametrilor de stres oxidativ (Fig. 39, Tabelul 23);

Profilul biochimic a fost semnificativ îmbunătățit, după tratamentul cu extract, în condiții de stres (Tabelul 24);

2.2.3. Caracteristici biologice ale extractului de *Hypericum capitatum*

2.2.3.1. Compoziție chimică

Analiza cromatografică de înaltă performanță în strat subțire (HPTLC) a fost efectuată, pentru o evaluare preliminară a profilului chimic general al fiecărui extract de investigat. Compușii au fost identificați, în primul rând, cu ajutorul factorului de retenție (Rf) și apoi prin culoarea emisă în fluorescență.

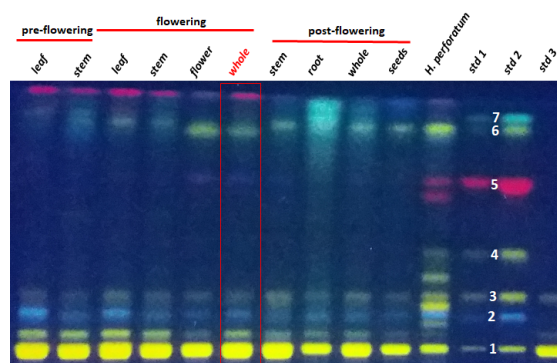


Figura 40. Analiza HPTLC indică principalii metaboliți secundari pe care îi conțin extractele de *Hypericum capitatatum* și de *H. perforatum* (fiecare bandă conține 8 μ L of 10 mg/mL); Standarde: Standardul 1 și 2 (std 1 – 2 μ L și std 2 – 10 μ L of 100 μ g/mL soluție stoc ce conține un amestec de: rutin (1), acid clorogenic (2), isoquercitrin (3), hiperozidă (4), hipericină (5), quercetin (6) și kaempferol (7)). Std3 – standard de rutin – 2 μ L from 3.5 mg/mL (Farcaș et al., 2019).

În tabelul 25 se observă faptul că cel mai concentrat extract, din punct de vedere al rutinului, este cel preparat din tulpina aflată în perioada de înflorire (**Tulpină (F)**).

Tabelul 25. Timpul de eluție (minute), concentrația identificată (μ g/mg, masă uscată) pentru standardele testate din probele de *H. capitatatum*, pregătite în diferite etape: prefloral (PreF), în timpul înfloririi (F) și postfloral (PostF). Celelalte standarde (2, 3, 8, 10, Figura 40) sunt toate sub limita de detecție (Farcaș et al., 2019).

| Nr. standard | 1 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 11 | 12 |
|---------------------------------|------------|-------|---------------|------------|-----------|------------|-------------|------------|
| Compuși | clorogenic | rutin | isoquercitrin | quercitrin | quercetin | kaempferol | hiperforină | hipericină |
| <i>t_{elutie}</i> (min) | 2.89 | 7.86 | 8.04 | 8.54 | 10.22 | 11.25 | 16.89 | 17.11 |
| Frunză (PreF) | 42.1 | 638 | 8.4 | 1.4 | <LOD | 0.5 | <LOD | <LOD |
| Tulpină (PreF) | 3.3 | 521 | 5.8 | 3.3 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| Frunză (F) | 22.2 | 707 | 9.8 | 8.6 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| Tulpină (F) | 25.8 | 527 | 6.9 | 11 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| Floare (F) | 6.5 | 332 | 2.4 | 47 | 16 | <LOD | <LOD | <LOQ |
| Herba (F) | 5 | 517 | 4.8 | 7.6 | 1.1 | <LOD | <LOD | <LOQ |
| Tulpină (PostF) | 3.9 | 609 | 7.6 | 9.0 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOQ |
| Rădăcină (PostF) | 10.1 | 163 | 5.5 | 5.6 | <LOD | 2.8 | <LOD | <LOD |
| Herba (PostF) | 3.4 | 363 | 5.2 | 5.0 | <LOD | 0.4 | <LOD | <LOD |
| Semințe (PostF) | 4.4 | 159 | 4.0 | 1.3 | 0.8 | 0.5 | <LOD | <LOD |
| <i>H. perforatum</i> | 36.8 | 49 | 23 | 4.2 | 6.1 | 0.9 | 0.9 | 0.31 |

Pe lângă rutin, au fost identificați și acid clorogenic, isoquercitrin și kaempferol, dar în concentrații mult mai mici în comparație cu rutinul. Isoquercitrin se regăsește în concentrație mare în extractele preparate din frunze din perioada preflorală (**Frunză (PreF)**), iar quercetina în extractele preparate din flori (**Floare (F)**).

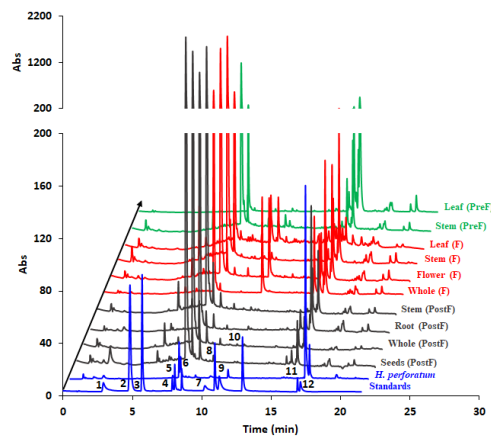


Figura 41. Profilurile HPLC ale extractelor de *Hypericum capitatum* studiate. Standarde: 1 – acid clorogenic, 2 – acid *p*-coumaric, 3 – acid cafeic, 4 – rutin, 5- isoquercitrin, 6 – quercitrin, 7 – quercetin, 8 – apigenin, 9 – kaempferol, 10 – crizina, 11 – hiperforină, 12 – hipericină. Cel mai înalt vârf cromatografic aparține rutinului, care reprezintă mai mult de 70% din suprafața de vârf, la toate probele (Farcaș et al., 2019).

Literatura de specialitate atestă faptul că familia Hypericaceae conține flavonol glicozide de quercetină în părțile aeriene, în special rutin, iar *H. capitatum* pare să prezinte o cantitate mult mai ridicată de rutin decât binecunoscutul *H. perforatum*. Concentrațiile metaboliților secundari ai plantelor se modifică în funcție de perioadele de dezvoltare, iar rutinul se formează în concentrații mai mari în stadiul de înflorire sau în etapa postflorală (Avato, 2005).

Cercetările noastre, cu privire la extractul de *H. capitatum*, indică faptul că doar isoquercitrin a fost prezentă în cantitate detectabilă și la o concentrație mult mai mică comparativ cu cea determinată pentru rutin. Literatura evidențiază, când vine vorba de speciile de *Hypericum*, existența unei corelații pozitive între concentrația de rutin și altitudinea mediului, în timp ce există o dependență negativă dacă sunt luate în considerare nivelurile de isoquercitrin (Umekl et al., 1999).

Un aspect cu adevărat remarcabil, care pare să diferențieze *H. capitatum* de alte specii, este nivelul scăzut de naftodiantrone, hipericină și pseudohipericină, detectabile doar în urme, în perioada de înflorire. Naftodiantronele sunt considerate indicatori specifici ai acestei familii și sunt considerate a fi responsabile pentru efectele terapeutice ale familiei Hypericaceae (Crockett și Robson, 2011).

2.2.3.2. Activitate antioxidantă și prooxidantă

Activitatea antioxidantă a fiecărui extract de *H. capitatum* a fost analizată prin intermediul a trei metode foarte bine cunoscute (DPPH, TEAC, β -caroten) și, desigur, prin concentrația totală a fenolilor. Extractul din toată planta, în stadiul postfloral, prezintă cea mai mică activitate antioxidantă determinată. De remarcat este și faptul că, de departe, activitățile antioxidante ale extractelor preparate din flori în stadiul de înflorire și din frunze în stadiul prefloral au fost cele mai mari din toate probele analizate.

Tabelul 26. Evaluarea activității antioxidante *in vitro* a extractelor de *Hypericum capitatum*, prin trei metode diferite (DPPH, TEAC, β -caroten) și metoda pentru conținutul total de polifenoli (TPC). Rezultatele sunt exprimate ca echivalenți de rutin (RE), echivalenți trolox (TE) și echivalenți de acid galic (GE) în extract uscat (Farcaș et al., 2019).

| No. | DPPH (mg RE/g) | TEAC (mg TE/g) | β -car. (mg RE/g) | TPC (mg GE/g) |
|------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|------------------|
| Frunză (PreF) | 107.6 \pm 7.3 | 1253 \pm 6 | 70.9 \pm 3.9 | 38.4 \pm 0.3 |
| Tulpină (PreF) | 57.5 \pm 2.5 | 809 \pm 27 | 44.9 \pm 0.2 | 22.9 \pm 0.9 |
| Frunză (F) | 31.0 \pm 4.2 | 442 \pm 2 | 48.9 \pm 0.3 | 14.1 \pm 0.1 |
| Tulpină (F) | 21.3 \pm 0.6 | 29 \pm 1 | 56.3 \pm 0.5 | 8.5 \pm 0.1 |
| Flore (F) | 90.5 \pm 8.8 | 1260 \pm 33 | 46.1 \pm 0.1 | 37.8 \pm 0.5 |
| Herba (F) | 36.4 \pm 0.9 | 527 \pm 9 | 56.5 \pm 0.1 | 15.7 \pm 0.1 |
| Tulpină (PostF) | 33.9 \pm 1.6 | 401 \pm 3 | 56.4 \pm 0.7 | 12.3 \pm 0.2 |
| Rădăcină (PostF) | 22.4 \pm 1.4 | 295 \pm 3 | 76.5 \pm 1.1 | 8.6 \pm 0.1 |
| Herba (PostF) | 15.5 \pm 2.5 | 207 \pm 5 | 58.4 \pm 0.5 | 6.3 \pm 0.1 |
| Semințe (PostF) | 31.5 \pm 0.7 | 430 \pm 9 | 67.1 \pm 7.1 | 15.1 \pm 0.4 |

2.2.3.3. Activitate antiinflamatoare și antioxidantă *in vivo*

În cercetarea prezentă, stresul oxidativ a fost evaluat folosind teste TOS, TAC și OSI. Concentrația de TOS a fost semnificativ crescută ($p < 0.01$) în grupul I. Tratamentul preventiv cu diclofenac, rutin și extract de *H. capitatum* a redus TOS, la valori aproape normale. În grupele I + D2 ($p < 0.05$) și I + D3 ($p < 0.01$), *H. capitatum* a avut un efect inhibitor mai eficient asupra TOS decât rutinul, ceea ce indică acțiunea flavonoidelor din extract.

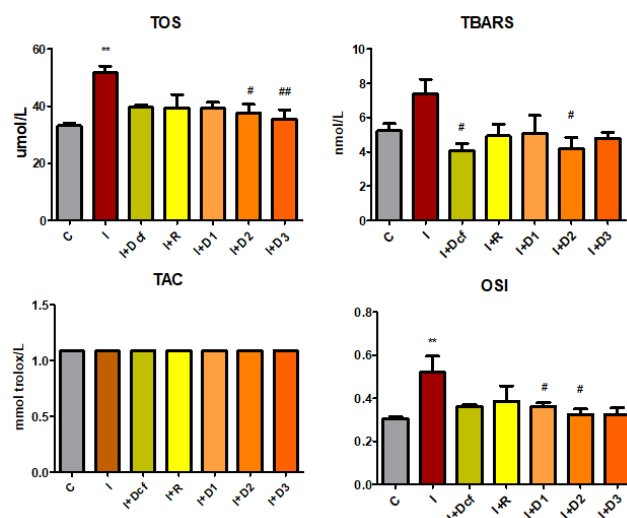


Figura 43. Efectele antioxidante *in vivo* ale extractului de *H. capitatum* (herba) asupra TOS, TBARS, TAC și OSI din ser de la șobolan. Datele reprezintă media \pm SEM; ANOVA One-way urmată de testul post-hoc a lui Bonferroni; * Semnificativ la $p < 0.05$; **Semnificativ la $p < 0.01$; ***Semnificativ la $p < 0.00$ – în comparație cu grupul C; # Semnificativ la $p < 0.05$; ## Semnificativ la $p < 0.01$; Semnificativ la $p < 0.00$ – în comparație cu grupul I; [C- Control; I- Inflamație; Dcf- Diclofenac; I+R- Inflamație +Rutin ; I+D1 – Inflamație + Doza 1 de extract de *H. capitatum*; I+D2 - Inflamație + Doza 2 de extract de *H. capitatum*; I+D3 - Inflamație + Doza3 de extract de *H. capitatum*](Farcaș et al., 2019).

Sinteza de NO a fost determinată, prin măsurarea concentrațiilor serice de NOx și 3-NT. După cum se vede în figura 44, inflamația a condus spre creșterea NOx, în comparație cu grupul Control ($p < 0,5$). Toate tratamentele testate au avut un efect inhibitor asupra NOx ($p < 0.05$), în

comparație cu grupul I. Cele trei doze de extract de *H. capitatum* au redus concentrația de NOx aproape la nivelul de control și similar cu diclofenacul. Tratamentele cu extract de *H. capitatum* au avut efect inhibitor invers proporțional cu doza administrată asupra valorilor 3-NT, D1 având cel mai puternic efect inhibitor și D3 cel mai scăzut.

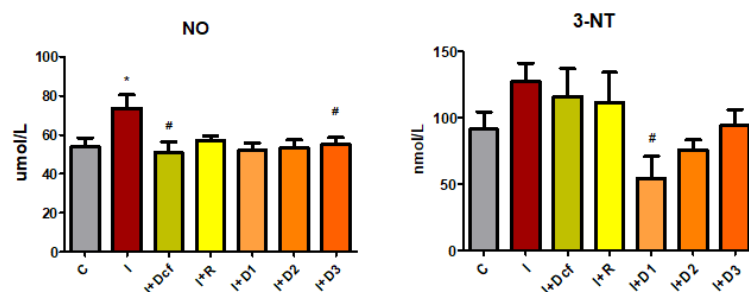


Figura 44. Efectele antiinflamatoare *in vivo* ale extractului de *H. capitatum* asupra valorilor NO și 3-NT din ser de la șobolan. Datele reprezintă media \pm SEM; ANOVA One-way urmată de testul post-hoc a lui Bonferroni; * Semnificativ la $p < 0.05$; **Semnificativ la $p < 0.01$; ***Semnificativ la $p < 0.00$ – în comparație cu grupul C; # Semnificativ la $p < 0.05$; ## Semnificativ la $p < 0.01$; Semnificativ la $p < 0.00$ – în comparație cu grupul I; [C- Control; I- Inflamație; Dcf- Diclofenac; I+R- Inflamație +Rutin ; I+D1 – Inflamație + Doza 1 de extract de *H. capitatum*; I+D2 - Inflamație + Doza 2 de extract de *H. capitatum*; I+D3 - Inflamație + Doza3 de extract de *H. capitatum*](Farcaș et al., 2019).

După cum se observă în figura 45, aproape toate tratamentele experimentale contribuie la reducerea activității SOD, cu excepția D3, concentrația cea mai mare de extract, care a reușit să stimuleze activitatea enzimatică peste nivelul de control ($p < 0,05$).

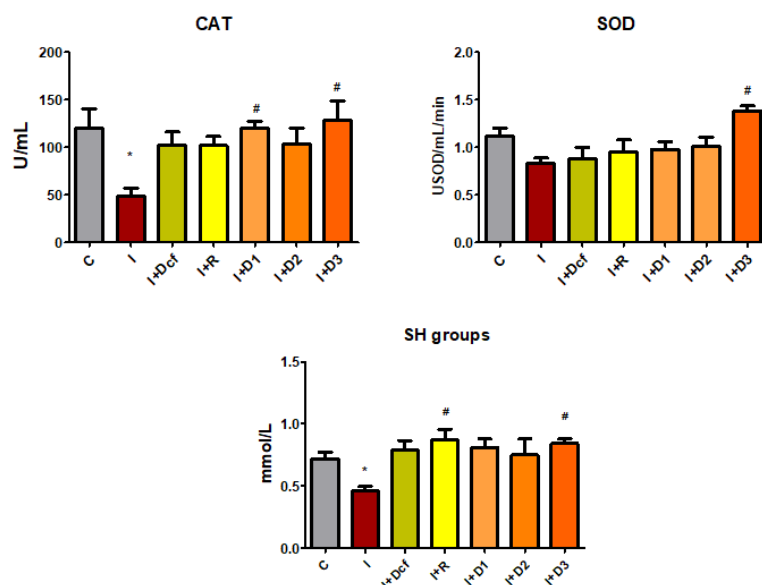


Figura 45. Efectele extractului de *H. capitatum* asupra activităților CAT și SOD, precum și asupra concentrației de SH din ser de la șobolan. Datele reprezintă media \pm SEM; ANOVA One-way urmată de testul post-hoc a lui Bonferroni; * Semnificativ la $p < 0.05$; **Semnificativ la $p < 0.01$; ***Semnificativ la $p < 0.00$ – în comparație cu grupul C; # Semnificativ la $p < 0.05$; ## Semnificativ la $p < 0.01$; Semnificativ la $p < 0.00$ – în comparație cu grupul I; [C- Control; I- Inflamație; Dcf- Diclofenac; I+R- Inflamație +Rutin ; I+D1 – Inflamație + Doza 1 de extract de

H. capitatum; I+D2 - Inflamație + Doza 2 de extract de *H. capitatum*; I+D3 - Inflamație + Doza3 de extract de *H. capitatum*)(Farcaș et al., 2019).

Managementul stresului oxidativ intracelular se bazează pe menținerea unui echilibru în activitățile SOD și CAT. Structurile tiolice, precum glutathionul, sunt implicate în reactivitatea plasmatică a antioxidanților, precum și în semnalizare, apărare și cataliză (Gilmore et al., 2008).

Figura 45 dezvăluie valorile SH în toate grupurile experimentale.

2.2.3.4. Concluzii

Compoziția chimică a extractelor de *H. capitatum* este reprezentată de compușii rutin (predominant cantitativ), acid clorogenic, isoquercitrin, quercetină, kaempferol, hipericină și hiperforină, identificați în cantități diferite (Tabelul 25 și Figura 41), în funcție de organul vegetal din care a fost obținut (extractul);

Evaluarea activității antioxidante *in vitro* a celor 10 tipuri de extracte de *H. capitatum* a fost realizată prin trei metode diferite (DPPH, TEAC și β -caroten), iar prin metoda Folin-Ciocalteu s-a determinat conținutul total de polifenoli (TPC) (Tabelul 26 și Fig. 42);

Activitatea antioxidantă *in vivo* a fost determinată pe un model de inflamație sistemică de tip acut, la șobolanul de laborator, folosind ulei de terebentină, ca agent inflamator. Tratamentul preventiv cu extract de *H. capitatum* a redus stresul oxidativ indus de inflamație, prin scăderea parametrilor de stres nitro-oxidativ (TBARS, TOS, OSI, NO, 3-NT) (Fig. 43 și Fig. 44) și prin stimularea antioxidanților neenzimatici și enzimatici endogeni (SOD, CAT, SH) (Fig. 45), într-un mod dependent de doză;

Concluzii generale

Cercetarea compoziției chimice a extractelor vegetale - obținute din frunze de *Plantago cornuti*, *P. lanceolata*, *P. major*, *P. media* și *P. sempervirens*, din herba de *Galium verum* și din diferite organe ale plantei (rădăcină, tulpină, frunză, floare, semințe, herba) *Hypericum capitatum* și din diferite fenofaze (prefloral, floral, postfloral) ale acestora - s-a realizat comparativ, prin utilizarea unor metode cromatografice (HPTLC, HPLC-DAD), metode de evaluare a activității antioxidante (DPPH, TEAC, FC, β -caroten, RES) și prooxidante (lacază și oxidarea hemoglobinei), metode de evaluare a regenerării celulare (*in vitro*) (măsurarea distanței de migrare celulară);

Compoziția chimică a extractelor de *Plantago* este reprezentată de compușii: acid gentisic, acid cafeic, acid *p*-coumaric, acid clorogenic, acid ferulic, rutin, apigenin, luteolin (predominant cantitativ), quercitrin, identificați în cantități diferite, în funcție de specie;

Compoziția chimică a extractelor de *G. verum* este reprezentată de compușii: acid clorogenic (predominant cantitativ), rutin, acid *p*-coumaric, acid ferulic, isoquercitrin și quercetină, identificați în cantități diferite;

Extractele de *H. capitatum* analizate prezintă cantități foarte mici de hipericină (urme), iar acest fapt se întâmplă doar în perioada de înflorire. Cea mai mare cantitate de rutin a fost determinată în extracte de *H. capitatum* obținute din frunză (din perioada florală și respectiv preflorală), tulpină (din perioada postflorală și respectiv preflorală) și herba;

Evaluarea activității antioxidante *in vitro* a extractului de *G. verum* a fost realizată prin metode diferite (DPPH și TEAC), care au arătat o activitate semnificativ mai mare prin testul cu DPPH, comparativ cu metoda TEAC. Reactivitatea prooxidantă a extractului de *G. verum* este mult mai mare la extractul hidrolizat, în comparație cu extractul nehidrolizat, datorită conținutului bogat în quercetină, care prezintă cea mai mare reactivitate prooxidantă;

Extractele de *H. capitatum*, preparate din flori în stadiul de înflorire și din frunze aflate în stadiul prefloral, au prezentat cea mai mare activitate antioxidantă, în comparație cu toate probele analizate, iar extractul preparat din toată planta, în stadiul postfloral, prezintă cea mai mică activitate antioxidantă;

In vivo, pe un model biologic de inflamație sistemică de tip acut, *P. sempervirens* determină reducerea markerilor de stres oxidativ, a neutrofiliei și a proteinelor de fază acută, alături de creșterea activităților enzimelor antioxidante;

Extractul cel mai bogat în luteolin a fost cel de *P. lanceolata* și acesta a fost studiat pe un model de gonadotoxicitate indusă cu CPA. Efectul *in vivo* al extractului de *P. lanceolata* și al luteolinului, ca tratament individual, a fost demonstrată prin creșterea indicatorilor specifici foliculogenezei (concentrația estrogenului, GDF9, dinamică foliculară, expresia ER, prin efectul anti-apoptotic și prin prezența unor structuri electron-dense, în celulele granuloase/cumulus/theca din ovare, care pot fi asociate cu granule secretoare de hormoni);

Tratamentul cu extract de *P. lanceolata*, într-un model de gonadotoxicitate indusă cu ciclofosamidă, dovedește efectul estrogeno-mimetic al flavonoidelor, stimularea foliculogenezei și reducerea stresului oxidativ;

Extractul de *G. verum*, diminuează *in vivo* leziunile oxidative induse de stresul neuropsihic (stres de imobilizare combinat cu stresul de lumină/întuneric) printr-un efect modulator asupra axei HHA. Atât studii din literatură, cât și experimentele din această lucrare de doctorat, arată faptul că pe fondul unor patologii cronice, administrarea extractului de *G. verum*, bogat în quercetină, produce o creștere a vulnerabilității renale;

Tratamentul *in vivo* cu extract de *H. capitatum* contribuie, într-un mod dependent de doză, la reducerea stresului nitro-oxidativ asociat cu o inflamație sistemică de tip acut. Aceste rezultate încurajează studiile viitoare pentru a dezvolta alternative derivate din plante, pentru medicamente antiinflamatoare convenționale, cum ar fi diclofenac;

Rezultatele cercetărilor, descrise în această teză de doctorat, au fost valorificate în reviste de specialitate, cu factor de impact (FI), precum PlosOne, Oxidative Medicine and Cellular Longevity și BMC Complementary and Alternative Medicine. Pe lângă cele 3 articole științifice, din domeniul tezei de doctorat, publicate în calitate de prim autor, menționăm: 2 articole științifice, cu FI, publicate în calitate de autor principal; 3 articole științifice, cu FI, publicate în calitate de contributor; articole științifice, în reviste indexate BDI, ca autor principal și/sau contributor; membru în echipa de cercetare la 5 proiecte; participări la peste 10 conferințe naționale și internaționale.

Referințe

- Abdala, S., Dévora, S., Martín-Herrera, D., Pérez-Paz, P., 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sambucus palmensis* link, an endemic Canary Island species. *J. Ethnopharmacol.* 155, 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.002>
- Abobaker, H., Hu, Y., Omer, N.A., Hou, Z., Idriss, A.A., Zhao, R., 2019. Maternal betaine suppresses adrenal expression of cholesterol trafficking genes and decreases plasma corticosterone concentration in offspring pullets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0396-8>
- Abud, M.A., Nardello, A.L., Torti, J.F., 2017. Hypoglycemic effect due to insulin stimulation with *Plantago major* in wistar rats. *Med. Aromat. Plants (Los Angeles)* 6, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Adom, M.B., Taher, M., Mutalabisin, M.F., Amri, M.S., Abdul Kudos, M.B., Wan Sulaiman, M.W.A., Sengupta, P., Susanti, D., 2017. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomed. Pharmacother.* 96, 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.152>
- Aebi, H., 1984. Oxygen radicals in biological systems. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahmadinejad, F., Møller, S.G., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhorji, G., Jami, M.S., 2017. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants* 6, 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox6030051>
- Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Ben Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002>
- Akchurin, O.M., Kaskel, F., 2015. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 39, 84–92. <https://doi.org/10.1159/000368940>
- Al-Jumaily, E.F., Abdul-Ratha, H.A., Raheema, R.H., 2012. Extraction and purification of tannins from *Plantago lanceolata* L. and assessment their antibacterial activity on pathogenesis of enteropathogenic *E.coli* *in vitro* and *in vivo*. *DAMA Int.* 1, 17–21.
- Aladaileh, S.H., Abukhalil, M.H., Saghir, S.A.M., Hanieh, H., Alfwuaires, M.A., Almairan, A.A., Bin-Jumah, M., Mahmoud, A.M., 2019. Galangin activates Nrf2 signaling and attenuates oxidative damage, inflammation, and apoptosis in a rat model of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. *Biomolecules* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom9080346>
- Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant

- activity. Saudi Pharm. J. 21, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Aleixandre, A., Miguel, M., 2016. Dietary fiber and blood pressure control. Food Funct. 7, 1864–1871. <https://doi.org/10.1039/c5fo00950b>
- Alqahtani, S., Mahmoud, A.M., 2016. Gamma-glutamylcysteine ethyl ester protects against cyclophosphamide-induced liver injury and hematologic alterations via upregulation of PPAR γ and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/4016209>
- Amin, S.N., El-Aidi, A.A., Zickri, M.B., Rashed, L.A., Hassan, S.S., 2017. Hepatoprotective effect of blocking N-methyl-D-aspartate receptors in male albino rats exposed to acute and repeated restraint stress. Can. J. Physiol. Pharmacol. 95, 721–731. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0556>
- Andreicuț, A.-D., Pârvu, A.E., Moț, A.C., Pârvu, M., Fischer Fodor, E., Cătoi, A.F., Feldrihan, V., Cecan, M., Irimie, A., 2018. Phytochemical analysis of anti-inflammatory and antioxidant effects of *Mahonia aquifolium* flower and fruit extracts. Oxid. Med. Cell. Longev. 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/2879793>
- Andrzejewska-Golec, E., 1992. A taxonomic study of *Plantago* subgenus *Psyllium* (Miller) Harms. Bot. J. Linn. Soc. 108, 49–53.
- Anwar, M.M., Meki, A.R.M.A., 2003. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: Effects of garlic oil and melatonin. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 135, 539–547. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00114-4)
- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 12, 1496–1547. <https://doi.org/10.3390/12071496>
- Araniciu, C., Pârvu, A., Palage, M., Oniga, S., Benedec, D., Oniga, I., Oniga, O., 2014. The effect of some 4,2 and 5,2 bisthiazole derivatives on nitro-oxidative stress and phagocytosis in acute experimental inflammation. Molecules 19, 9240–9256. <https://doi.org/10.3390/molecules19079240>
- Armata, A., Colceru-Mihul, S., Bubueanu, C., Draghici, E., Pirvu, L., 2010. Evaluation of antioxidant and free scavenging potential of some Lamiaceae species growing in Romania. Rom. Biotechnol. Lett. 15, 5274–5280.
- Astuti, P., Beurskens, D.M.A., Vajen, T., Nicolaes, G.A.F., Zhang, M., Haenen, G.R.M.M., 2019. Protection against neutrophil extracellular trap (NET) toxicity by antioxidant monoHER. Makara J. Heal. Res. 23, 108–115. <https://doi.org/10.7454/msk.v23i2.10453>
- Avato, P., 2005. A survey on the *Hypericum* genus: Secondary metabolites and bioactivity. Stud. Nat. Prod. Chem. 30, 603–634. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80043-2](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80043-2)
- Ayuso-Mateos, J., Dowrick, C., Vazquez-Barquero, J., Dowrick, C., Lehtinen, V., Dalgard, O.S., Casey, P., Wilkinson, C., Lasa, L., Page, H., Dunn, G., Wilkinson, G., GROUP, O., 2001. Depressive disorders in Europe: morbidity figures from the ODIN study. Br. J. Psychiatry 179 308–316.
- Babacan, E.Y., Aytaç, Z., Pinar, M., 2017. *Hypericum ekerii* (Hypericaceae), a new species from Turkey. Pakistan J. Bot. 49, 1763–1768.
- Badarinath, A. V., Mallikarjuna Rao, K., Madhu Sudhana Chetty, C., Ramkanth, S., Rajan, T.V.S., Gnanaprakash, K., 2010. A review on *In-vitro* antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. Int. J. PharmTech Res. 2, 1276–1285.
- Bahadori, M.B., Sarikurkcu, C., Kocak, M.S., Calapoglu, M., Uren, M.C., Ceylan, O., 2020. *Plantago lanceolata* as a source of health-beneficial phytochemicals: Phenolics profile and antioxidant capacity. Food Biosci. 100536. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100536>

- Bajer, T., Janda, V., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., Ventura, K., 2016. Chemical composition of essential oils from *Plantago lanceolata* L. leaves extracted by hydrodistillation. *J. Food Sci. Technol.* 53, 1576–1584. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2083-x>
- Balдим, J.L., Alcantara, B.G.V. De, Domingos, O.D.S., Soares, M.G., Caldas, I.S., Novaes, R.D., Oliveira, T.B., Lago, J.H.G., Chagas-Paula, D.A., 2017. The correlation between chemical structures and antioxidant, prooxidant, and antitrypanosomatid properties of flavonoids. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/3789856>
- Bao, L., Yao, X.-S., He, R.-R., Kurihara, H., 2008. Protective effects of Guangdong Liangcha grandes on restraint stress-induced liver damage in mice. *China J. Chinese Mater. medica* 33, 664–669.
- Barthlott, W., 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nord. J. Bot.* 1, 345–355. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1981.tb00704.x>
- Beara, I.N., Lesjak, M.M., Jovin, E.D., Balog, K.J., Anačkov, G.T., Orčić, D.Z., Mimica-Dukić, N.M., 2009. Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf902205m>
- Beara, I.N., Lesjak, M.M., Orcic, D.Z., Simin, N.D., Cetojevic-Simin, D.D., Bozin, B.N., Mimica-Dukic, N.M., 2012. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT - Food Sci. Technol.* 47, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.001>
- Beara, I.N., Orcic, D.Z., Lesjak, M.M., Mimica-Dukic, N.M., Pekovic, B.A., Popovic, M.R., 2010. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago* L.) species. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.014>
- Belhaj, D., Athmouni, K., Ahmed, M.B., Aoiadni, N., El Feki, A., Zhou, J.L., Ayadi, H., 2018. Polysaccharides from *Phormidium versicolor* (NCC466) protecting HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and rat liver tissues from cadmium toxicity: Evidence from *in vitro* and *in vivo* tests. *Int. J. Biol. Macromol.* 113, 813–820. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.152>
- Benedec, D., Oniga, I., Muresan, B., Mot, A.C., Damian, G., Nistor, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Hanganu, D., Duma, M., Vlase, L., 2014a. Contrast between water- and ethanol-based antioxidant assays: Aspen (*Populus tremula*) and black poplar (*Populus nigra*) extracts as a case study. *J. Food Qual.* 37, 259–267. <https://doi.org/10.1111/jfq.12090>
- Benedec, D., Oniga, I., Muresan, B., Mot, A.C., Damian, G., Nistor, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Hanganu, D., Duma, M., Vlase, L., 2014b. Contrast between water- and ethanol-based antioxidant assays: Aspen (*Populus tremula*) and black poplar (*Populus nigra*) extracts as a case study. *J. Food Qual.* 37, 259–267. <https://doi.org/10.1111/jfq.12090>
- Bingol, U., Cosge, B., Gurbuz, B., 2011. *Hypericum* Species in the flora of Turkey. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5, 86–90.
- Boga, M., Ertas, A., Eroglu-Ozkan, E., Kizil, M., Ceken, B., Topcu, G., 2016. Phytochemical analysis, antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase and DNA protective effects of *Hypericum capitatum* var. *capitatum* extracts. *South African J. Bot.* 104, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.02.204>
- Bora-Tătar, G., Dayangaç-Erden, D., Demir, A.S., Dalkara, S., Yelekçi, K., Erdem-Yurter, H., 2009. Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 5219–5228. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.042>
- Bradic, J., Jeremic, N., Petkovic, A., Jeremic, J., Zivkovic, V., Srejevic, I., Sretenovic, J., Matic, S., Jakovljevic, V.,

- Tomovic, M., 2018. Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. Arch. Physiol. Biochem. 0, 1–8. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1551904>
- Bradic, J., Petkovic, A., Tomovic, M., 2016. Phytochemical and pharmacological properties of some species of the genus *Galium* L. (*Galium verum* and *molugo*). Serbian J. Exp. Clin. Res. 82, 1471–1478. <https://doi.org/10.1515/SJECR>
- Bradic, J., Zivkovic, V., Srejovic, I., Jakovljevic, V., Petkovic, A., Turnic, T.N., Jeremic, J., Jeremic, N., Mitrovic, S., Sobot, T., Ponorac, N., Ravic, M., Tomovic, M., 2019. Protective effects of *Galium verum* L. extract against cardiac ischemia/reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4235405>
- Brandes, R.P., Weissmann, N., Schröder, K., 2014. Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. J. Mol. Cell. Cardiol. 73, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.02.006>
- Brown, N.M., Setchell, K.D.R., 2001. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: Implications for pathways influenced by hormones. Lab. Investig. 81, 735–747. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780282>
- Butterweck, V., Böckers, T., Korte, B., Wittkowski, W., Winterhoff, H., 2002. Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. Brain Res. 930, 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03394-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03394-7)
- Butterweck, V., Liefländer-Wulf, U., Winterhoff, H., Nahrstedt, A., 2003. Plasma levels of hypericin in presence of procyanidin B2 and hyperoside: A pharmacokinetic study in rats. Planta Med. 69, 189–192. <https://doi.org/10.1055/s-2003-38495>
- Caceres, A., Giron, L.M., Alvarado, S.R., Torres, M.F., 1987. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J. Ethnopharmacol. 20, 223–237. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cannon, J.R., Tapias, V.M., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., Greenamyre, J.T., 2010. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. Neurobiol. Disord. 34, 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.01.016.A>
- Carbone, K., Giannini, B., Picchi, V., Lo Scalzo, R., Cecchini, F., 2011. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. Food Chem. 127, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.030>
- Carrasco, G.A., Van de Kar, L.D., 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur. J. Pharmacol. 463, 235–272. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01285-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01285-8)
- Chatterjee, S.S., Bhattacharya, S.K., Wonnemann, M., Singer, A., Müller, W.E., 1998. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. Life Sci. 63, 499–510. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00299-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00299-9)
- Chen, C.Y., Peng, W.H., Tsai, K.D., Hsu, S.L., 2007. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. Life Sci. 81, 1602–1614. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.028>
- Chen, J., Zhao, C.C., Shao, J.H., Fan, J. Di, Huang, X.H., 2017. A new insecticidal lignan glucoside from *Galium verum*. Chem. Nat. Compd. 53, 626–628. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2075-3>
- Chen, W., Sudji, I.R., Wang, E., Joubert, E., Van Wyk, B.-E., Wink, M., 2013. Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. Phytomedicine 20, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.10.006>

- Cherrak, S.A., Mokhtari-Soulimane, N., Berroukeche, F., Bensenane, B., Cherbonnel, A., Merzouk, H., Elhabiri, M., 2016. *In vitro* antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PLoS One* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165575>
- Chiang, L., Chiang, W., Chang, M., Lin, C., 2003. *In vitro* cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica* 31, 225–234.
- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C., 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med.* 69, 600–604. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41113>
- Cho, A.S., Jeon, S.M., Kim, M.J., Yeo, J., Seo, K. Il, Choi, M.S., Lee, M.K., 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.* 48, 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>
- Cho, C.W., Han, C. ji, Rhee, Y.K., Lee, Y.C., Shin, K.S., Shin, J.S., Lee, K.T., Hong, H. Do, 2015. Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.010>
- Cicero, A.F., Derosa, G., Manca, M., Bove, M., Borghi, C., Gaddi, A. V, 2007. Different effect of psyllium and guar dietary supplementation on blood pressure control in hypertensive overweight patients: a six-month, randomized clinical trial. *Clin Exp Hypertens* 29, 383–394. <https://doi.org/10.1080/10641960701578378>
- Cimpoi, C., Hosu, A., Seserman, L., Sandru, M., Miclaus, V., 2010. Simultaneous determination of methylxanthines in different types of tea by a newly developed and validated TLC method. *J. Sep. Sci.* 33, 3794–3799. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000554>
- Ciocârlan, V., Flora ilustrată a României, Editura Ceres, București, 2009, 680-712.
- Cirak, C., Radusiene, J., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Yayla, F., Seyis, F., Camas, N., 2016. Secondary metabolites of *Hypericum* species from the Drosanthe and Olympia sections. *South African J. Bot.* 104, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.022>
- Cosco, D., Failla, P., Costa, N., Pullano, S., Fiorillo, A., Mollace, V., Fresta, M., Paolino, D., 2016. Rutin-loaded chitosan microspheres: Characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity. *Carbohydr. Polym.* 152, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.039>
- Crăciun, C., Barbu-Tudoran, L., 2013. Identification of new structural elements within “porosomes” of the exocrine pancreas: A detailed study using high-resolution electron microscopy. *Micron* 44, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.05.011>
- Cristea, V., Plante vasculare: diversitate, sistematică, ecologie și importanță, Editura Presa universitară clujeană, Cluj-Napoca, 2014, 115-123.
- Crockett, S.L., Robson, N.K., 2011. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1126/science.1182395.Evolution>
- Crow, J.P., Sampson, J.B., Zhuang, Y., Thompson, J.A., Beckman, J.S., 2002. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J. Neurochem.* 69, 1936–1944. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69051936.x>
- Cruz, M.H.C., Leal, C.L. V, Cruz, J.F., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2014. Theriogenology essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 82, 925–932. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.011>
- De Brito, T.V., Prudêncio, R.D.S., Sales, A.B., Vieira Júnior, F.D.C., Candeira, S.J.N., Franco, Á.X., Aragão, K.S.,

- Ribeiro, R.D.A., Ponte De Souza, M.H.L., Chaves, L.D.S., Freitas, A.L.P., Medeiros, J.V.R., Dos Reis Barbosa, A.L., 2013. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 724–733. <https://doi.org/10.1111/jphp.12024>
- de Souza, C.D., Barreto, R.W., Soares, D.J., 2008. First report of downy mildew on *Plantago major* caused by *Peronospora alta* in Brazil. *Australas. Plant Dis.* 3, 78–80.
- De Toni, K.L.G., Mariath, J.E.A., 2015. New combinations for two species of *Galium* (Rubiaceae) from southern Brazil. *Phytotaxa* 218, 295–298. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.218.3.8>
- Demirezer, L.O., Gürbüz, F., Güvenalp, Z., Ströch, K., Zeeck, A., 2006. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. *Turkish J. Chem.* 30, 525–534.
- Devine, P.J., Perreault, S.D., Luderer, U., 2012. Minireview Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity 1 86, 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095224>
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H., 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532–538. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90467-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90467-0)
- Domitrovic, R., Cvijanovi, O., Susnic, V., Katalinic, N., 2014. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury 324, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.07.004>
- Du, B., Tang, X., Liu, F., Zhang, C., Zhao, G., Ren, F., Leng, X., 2014. Antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extracts of *Hemerocallis citrina* and its potential active components. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 326. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-326> [doi]
- Eckschlager, C., Schwenoha, K., Roth, C., Bogner, B., Oostingh, G.J., 2019. Comparative analysis of high CRP-levels in human blood using point-of-care and laboratory-based methods. *Pract. Lab. Med.* 17, e00137. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2019.e00137>
- Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M., 2016. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phyther. Res.* 1391, 1379–1391. <https://doi.org/10.1002/ptr.5643>
- Ehrendorfer, F., Barfuss, M.H.J., Manen, J.F., Schneeweiss, G.M., 2018. Phylogeny, character evolution and spatiotemporal diversification of the species-rich and world-wide distributed tribe Rubieae (Rubiaceae). *PLoS One* 13, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207615>
- El-Readi, M.Z., Eid, S., Ashour, M.L., Tahrani, A., Wink, M., 2013. Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and *Chelidonium majus* alkaloids. *Phytomedicine* 20, 282–294. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.11.005>
- Eldesoky, A.H., Abdel-Rahman, R.F., Ahmed, O.K., Soliman, G.A., Saeedan, A.S., Elzorba, H.Y., Elansary, A.A., Hattori, M., 2018. Antioxidant and hepatoprotective potential of *Plantago major* growing in Egypt and its major phenylethanoid glycoside, acteoside. *J. Food Biochem.* 42, 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12567>
- Embuscado, M.E., 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. *J. Funct. Foods* 18, 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.005>
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* 38, 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem* 37, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014>
- Ero, E., Mat, A., 2013. An overview on *Hypericum* species of Turkey 5, 38–46. <https://doi.org/10.5897/JPP2013.0260>

- Esra, E.O. zkan, Afife, M., 2013. An overview on *Hypericum* species of Turkey. J. Pharmacogn. Phyther. 5, 38–46. <https://doi.org/10.5897/JPP2013.0260>
- Familiari, G., Caggiati, A., Nottola, S.A., Ermini, M., Benedetto, M.R. Di, Motta, P.M., 1993. Infertility: Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for hodgkin's disease. Hum. Reprod. 8, 2080–2087. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137985>
- Fan, M., Zhang, G., Hu, X., Xu, X., Gong, D., 2017. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. Food Res. Int. 100, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.010>
- Farcaș, A.D., Moț, A.C., Pârvu, A.E., Toma, V.A., Popa, M.A., Mihai, M.C., Sevastre, B., Roman, I., Vlase, L., Pârvu, M., 2019. *In vivo* pharmacological and anti-inflammatory evaluation of xerophyte *Plantago sempervirens* Crantz. Oxid. Med. Cell. Longev. 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/5049643>
- Farcaș, A.D., Moț, A.C., Zăgorean-Tuza, C., Țicoalea, M., Sevastre, B., Kulak, M., Silaghi-Dumitrescu, R., Pârvu, A., 2019. Remarkable rutin-rich *Hypericum capitatum* extract exhibits anti-inflammatory effects on turpentine oil-induced inflammation in rats. BMC Complement. Altern. Med. 19, 289. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2680-8>
- Farcaș, A.D., Moț, A.C., Zăgorean-Tuza, C., Toma, V., Cimpoiu, C., Hosu, A., Pârvu, M., Roman, I., Silaghi-Dumitrescu, R., 2018. Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/prooxidant effect of *Galium verum* extract during acute restraint and dark stress in female rats. PLoS One 13, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200022>
- Fayera, S., Babu G, N., Dekebo, A., Bogale, Y., 2018. Phytochemical investigation and antimicrobial study of leaf extract of *Plantago lanceolata*. Nat. Prod. Chem. Res. 06. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000311>
- Feliú-Hemmelmann, K., Monsalve, F., Rivera, C., 2013. *Melissa officinalis* and *Passiflora caerulea* infusion as physiological stress decreaser. Int. J. Clin. Exp. Med. 6, 444–451.
- Feng, Y., Yu, Y., Wang, S., Ren, J., Camer, D., 2016. Chlorogenic acid protects d-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice 0209. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1093510>
- Ferreira, L.G., Dos Santos, R.N., Oliva, G., Andricopulo, A.D., 2015. Molecular docking and structure-based drug design strategies. Molecules 20, 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Flohe, L., Gonzler, W., 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105, 114–120.
- Florea, A.M., Iordache, T.V., Branger, C., Brisset, H., Zaharia, A., Radu, A.L., Hubca, G., Sârbu, A., 2018. One-step preparation of molecularly imprinted hollow beads for pseudohypericin separation from *Hypericum perforatum* L. extracts. Eur. Polym. J. 100, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.01.015>
- Florentino, I.F., Silva, D.P.B., Silva, D.M., Cardoso, C.S., Moreira, A.L.E., Borges, C.L., Soares, C.M. d. A., Galdino, P.M., Lião, L.M., Ghedini, P.C., Menegatti, R., Costa, E.A., 2017. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. Nitric Oxide - Biol. Chem. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.04.006>
- Freitas, A.E., Bettio, L.E.B., Neis, V.B., Santos, D.B., Ribeiro, C.M., Rosa, P.B., Farina, M., Rodrigues, A.L.S., 2014. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry 50, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.12.012>
- Friščić, M., Baglama, M.Š., Milović, M., Pilepić, K.H., Maleš, Ž., 2018. Content of bioactive constituents and antioxidant potential of *Galium* L. Species. Croat. Chem. Acta 91, 411–417. <https://doi.org/10.5562/cca3379>

- Fu, Y., Zhao, Z., Wu, Y., Wu, K., Xu, X., Liu, Y., Tong, C., 2012. Therapeutic mechanisms of Tongmai Dasheng Tablet on tripterygium glycosides induced rat model for premature ovarian failure. *J. Ethnopharmacol.* 139, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.08.077>
- Gallego-Villar, L., Perez, B., Ugarte, M., Desviat, L.R., Richard, E., 2014. Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452, 457–461. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.091>
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J., Ayuso, M.J., 2005. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1927–1933. <https://doi.org/10.1021/jf048076s>
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Cortés, F., Ayuso, M.J., 2003. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 88, 125–130. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00192-2)
- Ganesan, B., Anandan, R., Lakshmanan, P.T., 2011. Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in Wistar albino rats. *Cell Stress Chaperones* 16, 641–652. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0276-4>
- Gao, Z.-H., Kong, L.-M., Zou, X.-S., Shi, Y.-M., Shang, S.-Z., Luo, H.-R., Liang, C.-Q., Li, X.-N., Li, Y., Du, X., Xiao, W.-L., Sun, H.-D., 2012. Four new indole alkaloids from *Plantago asiatica*. *Nat. Products Bioprospect.* 2, 249–254. <https://doi.org/10.1007/s13659-012-0082-4>
- Gautam, R., Singh, M., Gautam, S., Rawat, J.K., Saraf, S.A., Kaithwas, G., 2016. Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1069-1>
- Gilmore, J.L., Yi, X., Quan, L., Kabanov, A. V., 2008. Novel nanomaterials for clinical neuroscience. *J. NeuroImmune Pharmacol.* 3, 83–94. <https://doi.org/10.1007/s11481-007-9099-6>
- Girish, C., Chandra, B., Jayanthi, S., Rao, K.R., 2009. Hepatoprotective activity of picroliv , curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 23, 735–745. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00722.x>
- Gomez-Flores, R., Calderon, C.L., Scheibel, L.W., Tamez-Guerra, P., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R., Weber, R.J., 2000. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phyther. Res.* 14, 617–622. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200012\)14:8<617::AID-PTR674>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200012)14:8<617::AID-PTR674>3.0.CO;2-N) [pii]
- Gonçalves, S., Romano, A., 2016. The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Ind. Crops Prod.* 83, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.038>
- Gong, S., Miao, Y.L., Jiao, G.Z., Sun, M.J., Li, H., Lin, J., Luo, M.J., Tan, J.H., 2015. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117503>
- Goryacha, O. V., Ilyina, T. V., Kovalyova, A.M., Koshovyi, O.M., Krivoruchko, O. V., Vladimirova, M., Komisarenko, A.M., Goryacha, O. V., 2017. A hepatoprotective activity of *Galium verum* L. extracts against carbon tetrachloride-induced injury in rats. *Der Pharma Chem.* 9, 80–83.
- Goud, A.P., Goud, P.T., Diamond, M.P., Gonik, B., Abu-soud, H.M., 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging : Role of superoxide, hydrogen peroxide , and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1295–1304. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.014>
- Goudarzi, M., Khodayar, M.J., Hosseini Tabatabaei, S.M.T., Ghaznavi, H., Fatemi, I., Mehrzadi, S., 2017. Pretreatment with melatonin protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 31, 625–635. <https://doi.org/10.1111/fcp.12303>
- Greenacre, S., Ischiropoulos, H., 2001. Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein

- function and signal transduction. *Free Radic. Res.* 34, 541–581. <https://doi.org/10.1080/10715760100300471>
- Grundmann, O., Lv, Y., Kelber, O., Butterweck, V., 2010. Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the interrelationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neuropharmacology* 58, 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.12.014>
- Guérin, P., El Mouatassim, S., Ménéz, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7, 175–189. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
- Gunes, S., Hekim, G.N.T., Arslan, M.A., Asci, R., 2016. Effects of aging on the male reproductive system. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33, 441–454. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0663-y>
- Gupta, M.K., Uhm, S.J., Lee, H.T., 2010. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 93, 2602–2607. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.043>
- Gupta, R.C., Singh, V., Bala, S., Malik, R.A., Sharma, V., Kaur, K., 2017. Cytomorphological variations and new reports of B-chromosomes in the genus *Plantago* (Plantaginaceae) from the Northwest Himalaya. *Flora* 234, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.06.009>
- Gürgen, S.G., Erdoğan, D., Elmas, C., Kaplanoglu, G.T., Özer, C., 2013. Chemoprotective effect of ascorbic acid, alpha-tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovarium. *Nutrition* 29, 777–784. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.004>
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Haddadian, Kazhal, Haddadian, Katayoon, Zahmatkash, M., 2014. A review of *Plantago* plant. *Indian J. Tradit. Knowl.* 13, 681–685.
- Haghi, G., Hatami, A., 2010. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10812–10816. <https://doi.org/10.1021/jf102175x>
- Hammes, S.R., Davis, P.J., 2015. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 581–593. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.001>
- Handjieva, N., Taskova, R., Popov, S., 1993. 10-Hydroxymajorside, an iridoid glucoside from *Plantago cornuti* Gouan L. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 48c, 827–828.
- Harma, M., Harma, M., Erel, O., 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 563–567.
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J.F., Flamm, G.W., Williams, G.M., Lines, T.C., 2007. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2179–2205. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.015>
- Hassemer, G., Shipunov, A.B., Rønsted, N., Meudt, H.M., 2018. Taxonomic and geographic novelties in the genus *Plantago* (Plantaginaceae) in Chile, including the description of a new species. *Phytotaxa* 340, 137–156. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.340.2.3>
- Hetland, G., Samuelsen, A.B., Lévik, M., Paulsen, B.S., Aaberge, I.S., Groeng, E., 2000. Protective effect of *Plantago major* L. pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Scand. J. Immunol.* 52, 348–355.
- Himmelstein-Braw, R., Peters, H., Faber, M., 1978. Morphological study of the ovaries of leukaemic children. *Br. J.*

- Cancer 38, 82–87.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K., 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 47, 357–362. <https://doi.org/10.3177/jnsv.47.357>
- Ho, E., Karimi Galougahi, K., Liu, C.C., Bhindi, R., Figtree, G.A., 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 1, 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>
- Hoghoughi, T., Jafari, A., Mahmoodzadeh, H., 2016. Palynological and seed micromorphological studies on *Plantago* L. species in NE Iran. *J. Biodivers. Environ. Sci.* 8, 133–138.
- Horicks, F., Van Den Steen, G., Houben, S., Englert, Y., Demeestere, I., 2015. Folliculogenesis is not fully inhibited during GnRH analogues treatment in mice challenging their efficiency to preserve the ovarian reserve during chemotherapy in this model. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137164>
- Hosny, A., Waly, N., 2001. Plantaginaceae in the flora of Egypt 1. Systematic revision of the indigenous taxa. *Taekholmia* 21, 239–255. <https://doi.org/10.21608/taec.2001.12467>
- Hosu, A., Cimpoiu, C., David, L., Moldovan, B., 2016. Study of the antioxidant property variation of cornelian cherry fruits during storage using HPTLC and spectrophotometric assays. *J. Anal. Methods Chem.* <https://doi.org/10.1155/2016/2345375>
- Hsueh, A.J.W., Kawamura, K., Cheng, Y., Fauser, B.C.J.M., 2015. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr. Rev.* 36, 1–24. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>
- Hu, J.L., Nie, S.P., Min, F.F., Xie, M.Y., 2012. Polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L. increases short-chain fatty acid production and fecal moisture along with lowering pH in mouse colon. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11525–11532. <https://doi.org/10.1021/jf302169u>
- Huang, A.C., Osbourn, A., 2019. Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection. *Pest Manag. Sci.* 75, 2368–2377. <https://doi.org/10.1002/ps.5410>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., Rahu, N., 2016. Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Iamonico, D., Hassemer, G., Rønsted, N., Di Pietro, R., 2017. The intricate nomenclatural questions around *Plantago holosteam* (Plantaginaceae). *Phytotaxa* 306, 75–84. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.306.1.6>
- Ilina, T., Kashpur, N., Granica, S., Bazylo, A., 2019. Phytochemical profiles and in vitro immunomodulatory activity of ethanolic extracts from *Galium aparine* L. *Plants* 8, 1–13.
- Imamov, O., Shim, G.-J., Warner, M., Gustafsson, J.-Å., 2005. Estrogen Receptor beta in Health and Disease 1. *Biol. Reprod.* 73, 866–871. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043497>
- Iorio, R., Castellucci, A., Ventriglia, G., Teoli, F., Cellini, V., Macchiarelli, G., Cecconi, S., 2014. Ovarian toxicity: From environmental exposure to chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5388–5397. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205145319>
- Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K., 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem.* 114, 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.073>
- Iwanabe, Y., Masaki, C., Tamura, A., Tsuka, S., Mukaibo, T., Kondo, Y., Hosokawa, R., 2016. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on wound healing using scratch assay in epithelial cells. *J. Prosthodont. Res.* 60, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jprior.2016.03.002>

- Jançe, Admir, Kapidani, G., Jançe, Anila, Pupuleku, B., Kallajxhiu, N., Dauti, A., 2016. Palynomorphs dispersal of *Plantago* type, in Elbasani town – Albania. Acad. J. Interdiscip. Stud. 5, 20–23. <https://doi.org/10.5901/ajis.2016.v5n3s1p20>
- Janković, T., Zdunić, G., Beara, I., Balog, K., Pljevljakušić, D., Stešević, D., Šavikin, K., 2012. Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. Biochem. Syst. Ecol. 42, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.02.013>
- Jeanmonod, D.J., Rebecca, Suzuki, K. et al., 2018. Regulatory mechanisms controlling inflammation and synthesis of acute phase proteins. Intech open 2, 64. <https://doi.org/10.5772/32009>
- Ji, L.L., Leichtweis, S., 1997. Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. Age (Omaha). 20, 91–106. <https://doi.org/10.1007/s11357-997-0009-x>
- Jin, W., Shah, E.T., Penington, C.J., McCue, S.W., Maini, P.K., Simpson, M.J., 2017. Logistic proliferation of cells in scratch assays is delayed. Bull. Math. Biol. 79, 1028–1050. <https://doi.org/10.1007/s11538-017-0267-4>
- Jun, S.P., Ho, S.R., Duck, H.K., Ih, S.C., 2006. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 54, 2951–2956. <https://doi.org/10.1021/jf052900a>
- Kabbaj, M., Devine, D.P., Savage, V.R., Akil, H., 2000. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. J. Neurosci. 20, 6983–6988. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2018-98.2000> [pii]
- Kara, M., Uslu, S., Demirci, F., Temel, H.E., Baydemir, C., 2015. Supplemental carvacrol can reduce the severity of inflammation by influencing the production of mediators of inflammation. Inflammation 38, 1020–1027. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0066-0>
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S., 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Anal. Methods 2, 41–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
- Kawashty, S.A., Gamal-el-din, E., Abdalla, M.F., Saleh, N.A.M., 1994. Flavonoids of *Plantago* species in Egypt. Biochem. Syst. Ecol. 22, 729–733. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0305-1978(94)90058-2)
- Kaygusuzoglu, E., Caglayan, C., Kandemir, F.M., Yildirim, S., Kucukler, S., Kilinc, M.A., Saglam, Y.S., 2018. Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. Biomed. Pharmacother. 102, 517–530. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.119>
- Khalik, K.A., El-Ghani, M.A., El Kordy, A., 2008. Fruit and seed morphology in *Galium* L. (Rubiaceae) and its importance for taxonomic identification. Acta Bot. Croat. 67, 1–20.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules 18, 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kimura, Y., Sumiyoshi, M., 2004. Effects of various *Eleutherococcus senticosus cortex* on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice 95, 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.027>
- Kitamura, Y., Nishikawa, A., Nakamura, H., Furukawa, F., Imazawa, T., Umemura, T., Uchida, K., Hirose, M., 2005. Effects of N-acetylcysteine, quercetin, and phytic acid on spontaneous hepatic and renal lesions in LEC rats. Toxicol. Pathol. 33, 584–592. <https://doi.org/10.1080/01926230500246675>
- Kobeasy, I., M. Abdel-Fatah, O., El-salam, S.M.A., Mohamed, Z.E.-O.M., 2011. Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. Int. J. Biodivers. Conserv. 3, 83–91.
- Koriem, K.M.M., Soliman, R.E., 2014. Chlorogenic and caftaric acids in liver toxicity and oxidative stress Induced by methamphetamine. J. Toxicol. 2014, 1–10.

- Kuhtinskaja, M., Vaher, M., 2018. Extraction and analysis of bioactive compounds from *Dipsacus fullonum* and *Galium verum* for Lyme borreliosis treatment. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 11, 10–12. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.11.002121>
- Kujawski, R., Dziekan, K., Wolski, H., Barlik, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., 2015. The influence of certain plant substances and their chemopreventive activity in ovarian cancer. *Polish Gynaecol.* 86, 468–472. <https://doi.org/10.17772/gp/2406>
- Kurutas, E.B., 2016. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr. J.* 15, 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>
- Laakmann, G., Schule, C., Baghai, T., Kieser, M., 1998. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 31, 54–59.
- Lakić, N.S., Mimica-Dukić, N.M., Isak, J.M., Božin, B.N., 2010. Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Cent. Eur. J. Biol.* 5, 331–337. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0022-4>
- Lambrinidis, G., Halabalaki, M., Katsanou, E.S., Skaltsounis, A.L., Alexis, M.N., Mikros, E., 2006. The estrogen receptor and polyphenols: Molecular simulation studies of their interactions, a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 159–174. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0065-y>
- Layali, I., Ali Ebrahimzadeh, M., Joulaei, M., 2016. Antioxidant properties of *Galium verum*. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* 6, 31–37.
- Lee, W., Ku, S.K., Bae, J.S., 2012. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3048–3055. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.013>
- Leopold, J.A., 2015. Antioxidants and coronary artery disease: From pathophysiology to preventive therapy. *Coron. Artery Dis.* 26, 176–183. <https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000187>
- Liang, N., Kitts, D.D., 2015. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients* 8. <https://doi.org/10.3390/nu8010016>
- Linehan, E., Fitzgerald, D., 2015. Ageing and the immune system: focus on macrophages. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 5, 14–24. <https://doi.org/10.1556/eujmi-d-14-00035>
- Liu, D., Xie, K., Yang, X., Gu, J., Ge, L., Wang, X., Wang, Z., 2014. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav. Brain Res.* 264, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.039>
- Lotito, S.B., Frei, B., 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1727–1746. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033>
- Lu, S., Wu, J.W., Liu, H., Zhao, J., Liu, K., Chuang, C., Lin, H., Tsai, W., Ho, Y., 2011. The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: A combination of pharmacophore modeling, virtual screening and molecular docking studies. *J. Biomed. Sci.* 18, 1–13.
- Luderer, U., 2014. Ovarian toxicity from reactive oxygen species, 1st ed, *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00004-3>
- Lukova, P., Dimitrova-dyulgerova, I., Karcheva-bahchevanska, D., Mladenov, R., Iliev, I., Nikolova, M., 2017. Comparative morphological and qualitative phytochemical analysis of *Plantago media* L. leaves with *P. major* L. and *P. lanceolata* L. leaves. *Int. J. Med. Res. Pharm. Sci.* 4, 20–26.
- Lum, G., 1995. Low activities of aspartate and alanine aminotransferase. *Lab. Med.* 26, 4–7.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>

- MacIver, N.J., Michalek, R.D., Rathmell, J.C., 2013. Metabolic regulation of T lymphocytes, Annual Review of Immunology. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>
- Mahmood, A., Phipps, M., 2006. Wound healing activities of *Plantago major* leaf extract in rats.pdf. Int. J. Trop. Med. 1, 33–35.
- Manach, C., Morand, C., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C., 1997. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. FEBS Lett. 409, 12–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00467-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00467-5)
- Mark-Kappeler, C.J., Hoyer, P.B., Devine, P.J., 2011. Xenobiotic effects on ovarian preantral follicles. Biol. Reprod. 85, 871–883. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091173>
- Marshall, M.M., Batten, L.C., Remington, D.L., Lacey, E.P., 2019. Natural selection contributes to geographic patterns of thermal plasticity in *Plantago lanceolata*. Ecol. Evol. 9, 2945–2963. <https://doi.org/10.1002/ece3.4977>
- Mazko, O.N., Makarova, O.G., Kiryakova, V.O., Pashkov, A.P., 2017. Anti-inflammatory activity of *Galium verum* herb infusion. Bull. Med. Sci. 2, 11–13. [https://doi.org/10.31684/2541-8475.2017.2\(6\).11-13](https://doi.org/10.31684/2541-8475.2017.2(6).11-13)
- Mazzutti, S., Riehl, C.A.S., Ibañez, E., Ferreira, S.R.S., 2017. Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. J. Supercrit. Fluids 119, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.09.018>
- McGill, M.R., Du, K., Weemhoff, J.L., Jaeschke, H., 2015. Critical review of resveratrol in xenobiotic-induced hepatotoxicity. Food Chem. Toxicol. 86, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.003>
- Meirow, D., Nugent, D., 2001. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum. Reprod. Update 7, 535–543. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.6.535>
- Mello, J. C., Gonzalez, M.V.D., Moraes, V.W.R., Prieto, T., Nascimentoand, O.R., Rodrigues, T., 2015. Protective effect of *Plantago major* extract against t-BOOH-induced mitochondrial oxidative damage and cytotoxicity. Molecules 20, 17747–17759. <https://doi.org/10.3390/molecules201017747>
- Melov, S., 2002. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, 1395–1400. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00086-9)
- Miller, A.L., 1998. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): Clinical effects on depression and other conditions. Altern. Med. Rev. 3, 18–26.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. NITRIC OXIDE Biol. Chem. 5, 62–71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
- Mitev, D., Gradeva, H., Stoyanova, Z., Petrova, N., Karova, N., Dimov, D., Iliev, V., Koychev, A., Prakova, G., Vlaykova, T., 2010. Evaluation of thiol compounds and lipid peroxidative products in plasma of patients with copd. Trakia J. Sci. 8, 306–314.
- Mitic, V.D., Stankov-Jovanovic, V.P., Ilic, M.D., Vasiljevic, P.J., Zabar, A.L., Stojanovic, G.S., 2014. The antioxidant, hemolytic and cholinesterase inhibition properties of *Galium verum* L. and *Tragopogon pratensis* subsp. *pratensis*. Bulg. Chem. Commun. 46, 269–276.
- Mocan, A., Crişan, G., Vlase, L., Ivănescu, B., Bădărău, A.S., Arsene, A.L., 2016. Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania. Farmacia 64, 95–99.
- Mocan, A., Diuzheva, A., Bădărău, S., Moldovan, C., Andruch, V., Carradori, S., Campestre, C., Tartaglia, A., De Simone, M., Vodnar, D., Tiecco, M., Germani, R., Crişan, G., Locatelli, M., 2019. Liquid phase and microwave-assisted extractions for multicomponent phenolic pattern determination of five romanian *Galium* species coupled with bioassays. Molecules 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24071226>
- Morbidelli, L., 2016. Polyphenol-based nutraceuticals for the control of angiogenesis: Analysis of the critical issues

- for human use. *Pharmacol. Res.* 111, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.011>
- Moț, A.-C., Damian, G., Sârbu, C., Silaghi-Dumitrescu, R., 2009. Redox reactivity in propolis: direct detection of free radicals in basic medium and interaction with hemoglobin. *Redox Rep.* 14, 267–74. <https://doi.org/10.1179/135100009X12525712409814>
- Moț, A.C., Bischin, C., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R., 2015. Antioxidant activity evaluation involving hemoglobin-related free radical reactivity. *Methods Mol. Biol.* 1208, 247–55. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8_18
- Moț, A.C., Bischin, C., Muresan, B., Pârnu, M., Damian, G., Vlase, L., Silaghi-Dumitrescu, R., 2016. Antioxidant activity evaluation by physiologically relevant assays based on haemoglobin peroxidase activity and cytochrome c-induced oxidation of liposomes. *Nat. Prod. Res.* 30, 1315–1319. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1054824>
- Moț, A.C., Coman, C., Miron, C., Damian, G., Sârbu, C., Silaghi-Dumitrescu, R., 2014. An assay for pro-oxidant reactivity based on phenoxyl radicals generated by laccase. *Food Chem.* 143, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.128>
- Moț, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R., Sârbu, C., 2011. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *J. Food Compos. Anal.* 24, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.11.006>
- Muqbil, I., Banu, N., 2006. Enhancement of pro-oxidant effect of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in rats by pre-exposure to restraint stress. *Cancer Lett.* 240, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.09.008>
- Nabavi, S.F., Braidy, N., Gortzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Woźniak, K., Nabavi, S.M., 2015. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Res. Bull.* 119, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.09.002>
- Nafees, S., Rashid, S., Ali, N., Hasan, S.K., Sultana, S., 2015. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NFκB/MAPK pathway. *Chem. Biol. Interact.* 231, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.021>
- Nahrstedt, A., Butterweck, V., 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30, 129–134. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979533>
- Nanduri, J., Vaddi, D.R., Khan, S.A., Wang, N., Makerenko, V., Prabhakar, N.R., 2013. Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2α degradation by intermittent hypoxia. *PLoS One* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075838>
- Natali, A., Manen, J., Ehrendorfer, F., 1995. Phylogeny of the Rubiaceae-Rubioideae, in particular the tribe Rubieae: Evidence from a non-coding chloroplast DNA sequence. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82, 428–439.
- Nathan, C.F., Hibbs, J.B., 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 65–70. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(91\)90079-G](https://doi.org/10.1016/0952-7915(91)90079-G)
- Nestler, E.J., Hyman, S.E., 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 13, 1161–1169. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Nguyen, T.Y., To, D.C., Tran, M.H., Lee, J.S., Lee, J.H., Kim, J.A., Woo, M.H., Min, B.S., 2015. Anti-inflammatory flavonoids isolated from *Passiflora foetida*. *Nat. Prod. Commun.* 10, 929–931. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000634>
- Nikolova, M., Evstatieva, L., Nguyen, D., 2011. Screening of plant extracts for antioxidant properties. *Bot. Serbica* 35, 43–48. <https://doi.org/UDK.581.19:577.334>
- Nimse, S.B., Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5, 27986–

28006. <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>

- Noda, Y., Ota, K., Shirasawa, T., Shimizu, T., 2012. Copper/Zinc superoxide dismutase insufficiency impairs progesterone secretion and fertility in female mice. *Biol. Reprod.* 86, 1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092999>
- Nürk, N.M., Crockett, S.L., 2011. Morphological and phytochemical diversity among *Hypericum* species of the mediterranean basin. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5, 14–28.
- Ochi, M., Tominaga, K., Tanaka, F., Tanigawa, T., Shiba, M., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Arakawa, T., 2008. Effect of chronic stress on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats. *Life Sci.* 82, 862–868. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.01.020>
- Ogunsanwo, O.R., Oyagbemi, A.A., Omobowale, T.O., Asenuga, E.R., Saba, A.B., 2017. Biochemical and electrocardiographic studies on the beneficial effects of gallic acid in cyclophosphamide-induced cardiorenal dysfunction. *J. Complement. Integr. Med.* 14. <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0161>
- Ohta, Y., Kaida, S., Chiba, S., Tada, M., Teruya, A., Imai, Y., Kawanishi, M., 2009. Involvement of oxidative stress in increases in the serum levels of various enzymes and components in rats with water-immersion restraint stress. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 45, 347–354. <https://doi.org/10.3164/jcbn.09-59>
- Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., Haque, M.E., 2016. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Mol. Cell. Biochem.* 418, 59–70. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2733-y>
- Olaleye, M.T., Joa, B.T., 2008. Acetaminophen-induced liver damage in mice : Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system 59, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.10.003>
- Olennikov, D.N., Tankhaeva, L.M., Stolbikova, A. V., Petrov, E. V., 2011. Phenylpropanoids and polysaccharides from *Plantago depressa* and *P. media* growing in Buryatia. *Chem. Nat. Compd.* 47, 165–169. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9872-x>
- Oprică, L., Ivan, M., Grigore, M.N., Zamfirache, M.M., 2015. Antioxidant activity of *Plantago* species in vegetative and flowering stages. *Iran. J. Public Health* 44, 142–144.
- Oshiro, C., Bradley, E.K., Eksterowicz, J., Evensen, E., Lamb, M.L., Lanctot, J.K., Putta, S., Stanton, R., Grootenhuis, P.D.J., 2004. Performance of 3D-database molecular docking studies into homology models. *J. Med. Chem.* 47, 764–767. <https://doi.org/10.1021/jm0300781>
- Pan, B., Li, H., Lang, D., Xing, B., 2019. Environmentally persistent free radicals: Occurrence, formation mechanisms and implications. *Environ. Pollut.* 248, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.032>
- Parashar, A., Mehta, V., Udayabanu, M., 2017. Rutin alleviates chronic unpredictable stress-induced behavioral alterations and hippocampal damage in mice. *Neurosci. Lett.* 656, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.058>
- Paredes-Gonzalez, X., Fuentes, F., Jeffery, S., Saw, C.L.L., Shu, L., Su, Z.Y., Kong, A.N.T., 2015. Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones apigenin and luteolin. *Biopharm. Drug Dispos.* 36, 440–451. <https://doi.org/10.1002/bdd.1956>
- Pârvu, A.E., Pârvu, M., Vlase, L., Miclea, P., Mot, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R., 2014. Anti-inflammatory effects of *Allium schoenoprasum* L. leaves. *J. Physiol. Pharmacol.* 65, 309–315.
- Pârvu, M., Roșca, O., Puscaș, M., Groza, G., 2009. Antifungal activity of *Allium fistulosum* L. *Contrib. Bot.* 44, 125–129.
- Pascuali, N., Scotti, L., Di Pietro, M., Oubiña, G., Bas, D., May, M., Gómez Muñoz, A., Cuasnicú, P.S., Cohen, D.J., Tesone, M., Abramovich, D., Parborell, F., 2018. Ceramide-1-phosphate has protective properties against

- cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure. *Hum. Reprod.* 33, 844–859. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey045>
- Patrignani, P., Patrono, C., 2015. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 422–432. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.016>
- Pinelo, M., Zornoza, B., Meyer, A.S., 2008. Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Sep. Purif. Technol.* 63, 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.07.007>
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pleşca-Manea, L., Pârvu, A.E., Pârvu, M., Tămaş, M., Buia, R., Puia, M., 2002. Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. *Phyther. Res.* 16, 316–319. <https://doi.org/10.1002/ptr.875>
- Plowchalk, D.R., Mattison, D.R., 1992. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. *Reprod. Toxicol.* 6, 411–421. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(92\)90004-D](https://doi.org/10.1016/0890-6238(92)90004-D)
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N., 2006a. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *African J. Biotechnol.* 5, 1142–1145. <https://doi.org/10.1055/s-2007-987042>
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N., 2006b. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J. Biotechnol.* 5, 1142–1145. <https://doi.org/10.1055/s-2007-987042>
- Powers, C.N., Setzer, W.N., 2015. A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *Silico Pharmacol.* 3. <https://doi.org/10.1186/s40203-015-0008-z>
- Pradeep, M., Kachlicki, P., Franklin, G., 2020. Simultaneous determination of naphthodianthrones, emodin, skyrin and new bisanthrones in *Hypericum perforatum* L. *in vitro* shoot cultures. *Ind. Crops Prod.* 144, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112003>
- Prior, R.L., Cao, G., 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *HortScience* 35, 588–592. <https://doi.org/10.21273/hortsci.35.4.588>
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011a. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids ☆. *Fitoterapia* 82, 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Puşcaş, M., Bărbos, M., Başnou, C., Frink, J.-P., Cristea, V., 2003. *Plantago sempervirens* Crantz, a new species for the Romanian Flora. *Contrib. Bot. Cluj-Napoca* 38, 7–12.
- Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration 101, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11853>
- Radulović, N., Stankov-Jovanović, V., Stojanović, G., Šmelcerović, A., Spitteller, M., Asakawa, Y., 2007. Screening of *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chem.* 103, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.062>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res. Int.* 2014, 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Rahn, K., 1996. A phylogenetic study of the Plantaginaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 120, 145–198. <https://doi.org/10.1006/bojl.1996.0009>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E.N., Lakshminarasaiiah, U., Gopas,

- J., Nishigaki, I., 2014. Antioxidants and human diseases. *Clin. Chim. Acta* 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- Rangan, G.K., Wang, Y., Harris, D.C.H., 2002. Dietary quercetin augments activator protein-1 and does not reduce nuclear factor-kB in the renal cortex of rats with established chronic glomerular disease. *Nephron* 90, 313–319. <https://doi.org/10.1159/000049067>
- Ravn, H.W., Mondolot, L., Kelly, M.T., Lykke, A.M., 2015. Plantamajoside - A current review. *Phytochem. Lett.* 12, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.02.002>
- Reina, E., Shibani, N. Al, Allam, E., Gregson, K.S., Kowolik, M., Windsor, L.J., 2013. The effects of *Plantago major* on the activation of the neutrophil respiratory burst. *J. Tradit. Complement. Med.* 3, 268–272. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.119706>
- Reinli, K., Block, G., 1996. Phytoestrogen content of foods - A compendium of literature values. *Nutr. Cancer* 26, 123–148. <https://doi.org/10.1080/01635589609514470>
- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J.C., Dias, M.M., Barros, L., Barreiro, F., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chem.* 188, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.061>
- Rietjens, I.M.C.M., Sotoca, A.M., Vervoort, J., Louisse, J., 2013. Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 100–113. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200439>
- Robson, N., 1987. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 7. Section 29. Brathys (part 1). *Bull. Br. Museum (Natural Hist.)* 16, 1–106.
- Roman, I., Puică, C., 2013. Effects of anakinetic stress and *Galium verum* extract on the thyroid and ovary morphology in wistar rats. *Bull. USAMV* 70, 167–169.
- Rønsted, N., Franzyk, H., Mølgaard, P., Jaroszewski, J.W., Jensen, S.R., 2003. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Syst. Evol.* 242, 63–82. <https://doi.org/10.1007/s00606-003-0057-3>
- Rønsted, N., Göbel, E., Franzyk, H., Jensen, S.R., Olsen, C.E., 2000. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry* 55, 337–348. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00306-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00306-X)
- Rozentsvet, O., Grebenkina, T., Nesterov, V., Bogdanova, E., 2016. Seasonal dynamic of morpho-physiological properties and the lipid composition of *Plantago media* (Plantaginaceae) in the Middle Volga region. *Plant Physiol. Biochem.* 104, 92–98. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.03.025>
- Saadi, H., Handjieva, N., Popov, S., Evstatieva, L., 1988. Iridoids from *Plantago media*. *Phytochemistry* 29, 3938–3939.
- Şahin, E., Gümüşlü, S., 2007. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: Comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 425–431. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04584.x>
- Sakr, H.F., Abbas, A.M., Elsamanoudy, A.Z., Ghoneim, F.M., 2015. Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *J. Physiol. Pharmacol.* 66, 515–527.
- Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J.L., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P.K., Sharifi-Rad, M., Kumar, P., Sharifi-Rad, J., 2018. Antioxidants: Positive or negative actors? *Biomolecules* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3390/biom8040124>
- Saller, S., Merz-Lange, J., Raffael, S., Hecht, S., Pavlik, R., Thaler, C., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., Mayerhofer,

- A., 2012. Norepinephrine, active norepinephrine transporter, and norepinephrine- metabolism are involved in the generation of reactive oxygen species in human ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 153, 1472–1483. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1769>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., 2010. Genetics vs. entropy: Longevity factors suppress the NF- κ B-driven entropic aging process. *Ageing Res. Rev.* 9, 298–314. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.11.001>
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., Samini, F., Borji, A., 2016. Protective effects of carvacrol against oxidative stress Induced by chronic stress in rat's brain, liver and kidney. *Biochem. Res. Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2645237>
- Samhan-Arias, A.K., Martín-Romero, F.J., Gutiérrez-Merino, C., 2004. Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.002>
- Samuelsen, A.B., 2000. A review: The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. *J. Ethnopharmacol.* 71, 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00212-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00212-9)
- Samuelsen, A.B., Paulsen, B.S., Wold, J.K., Otsuka, H., Yamada, H., Espevik, T., 1995. Isolation and partial characterization of biologically active polysaccharides from *Plantago major* L. *Phyther. Res.* 9, 211–218. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090312>
- Sánchez-Reus, M.I., Gómez del Rio, M.A., Iglesias, I., Elorza, M., Slowing, K., Benedí, J., 2007. Standardized *Hypericum perforatum* reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats. *Neuropharmacology* 52, 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.09.003>
- Sánchez, F., Smitz, J., 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1896–1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
- Saplonțai-Pop, A., Moț, A., Moldovan, M., Oprean, R., Silaghi-Dumitrescu, R., Orășan, O., Pârvu, M., Gal, E., Ionescu, C., 2015. Testing antiplatelet and antioxidant activity of the extract of seven varieties of *Allium cepa* L. *Open Life Sci.* 10, 89–98. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0011>
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K., 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403, 136–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>
- Schäfer, M., Werner, S., 2007. Transcriptional control of wound repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 69–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123609>
- Schiavone, S., Jaquet, V., Trabace, L., Krause, K.H., 2013. Severe life stress and oxidative stress in the brain: From animal models to human pathology. *Antioxidants Redox Signal.* 18, 1475–1490. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4720>
- Schmidt, C., Fronza, M., Goettert, M., Geller, F., Luik, S., Flores, E.M.M., Bittencourt, C.F., Zanetti, G.D., Heinzmann, B.M., Laufer, S., Merfort, I., 2009. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 122, 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.022>
- Schmidt, R.L., Straseski, J.A., Raphael, K.L., Adams, A.H., Lehman, C.M., 2015. A risk assessment of the Jaffe vs enzymatic method for creatinine measurement in an outpatient population. *PLoS One* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143205>
- Schopfer, F.J., Baker, P.R.S., Freeman, B.A., 2003. NO-dependent protein nitration: A cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* 28, 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.10.006>

- Schulz, H.U., Schürer, M., Bässler, D., Weiser, D., 2005. Investigation of pharmacokinetic data of hypericin, pseudohypericin, hyperforin and the flavonoids quercetin and isorhamnetin revealed from single and multiple oral dose studies with a hypericum extract containing tablet in healthy male volunteers. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 55, 561–568. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296905>
- Selman, C., McLaren, J.S., Himanka, M.J., Speakman, J.R., 2000. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1279–1285.
- Semchyshyn, H.M., Lozinska, L.M., 2012. Fructose protects baker's yeast against peroxide stress: Potential role of catalase and superoxide dismutase. *FEMS Yeast Res.* 12, 761–773. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00826.x>
- Sevgi, K., Tepe, B., Sarikurkcu, C., 2015. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* 77, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.006>
- Sharma, M., Kumari, A., Mahant, E., 2017. Micropropagation and phytochemical profile analysis of tissue culture grown *Plantago ovata* Forsk. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 10, 202–206. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i4.16532>
- Shehata, A.A., 2006. On the taxonomy of Plantaginaceae Juss. sensu lato: evidence from SEM of the seed coat. *Turk. J. Botany* 30, 71–84.
- Sheikh, Naila, Ahmad, A., Siripurapu, K.B., Kuchibhotla, V.K., Singh, S., Palit, G., 2007. Effect of *Bacopa monniera* on stress induced changes in plasma corticosterone and brain monoamines in rats. *J. Ethnopharmacol.* 111, 671–676. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.025>
- Sheikh, Nadeem, Dudas, J., Ramadori, G., 2007. Changes of gene expression of iron regulatory proteins during turpentine oil-induced acute-phase response in the rat. *Lab. Investig.* 87, 713–725. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700553>
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748.
- Şik, L., Yildirim, H., Pirhan, A.F., Altıoğlu, Y., Gemici, M., 2016. *Galium shinasii* (Rubiaceae): A new species of *Galium* L. from Eastern Turkey. *PhytoKeys* 75, 19–29. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.75.10244>
- Simpson, C.M., Robertson, D.M., Al-Musawi, S.L., Heath, D.A., McNatty, K.P., Ritter, L.J., Mottershead, D.G., Gilchrist, R.B., Harrison, C.A., Stanton, P.G., 2014. Aberrant GDF9 expression and activation are associated with common human ovarian disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 615–624. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3949>
- Singh, D., Arya, P. V., Sharma, A., Dobhal, M.P., Gupta, R.S., 2015. Modulatory potential of α -amyrin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in wistar albino rats. *J. Ethnopharmacol.* 161, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.025>
- Skulachev, V.P., 2012. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J. Alzheimer's Dis.* 28, 283–289. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111391>
- Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M., 1999. The *in vitro* antibacterial activity of turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 67, 79–86.
- Song, D., Zhong, Y., Qian, C., Zou, Q., Ou, J., Shi, Y., Gao, L., Wang, G., Liu, Z., Li, Haibo, Ding, H., Wu, H., Wang, F., Wang, J., Li, Hong, 2016. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. *Biomed Res. Int.* 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/2517514>

- Srivastava, S., Singh, D., Patel, S., Singh, M.R., 2017. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. *Int. J. Biol. Macromol.* 101, 502–517. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.100>
- Stanisavljevic, I., Stojicevic, S., Velickovic, D., Lazic, M., Veljkovic, V., 2008. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from Plantain (*Plantago major* L.) leaves. *Sep. Sci. Technol.* 43, 3652–3662. <https://doi.org/10.1080/01496390802219091>
- Stojiljković, D., Arsić, I., Tadić, V., 2016. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. *Ind. Crops Prod.* 80, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.023>
- Su, Y.Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., Eppig, J.J., 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135, 111–121. <https://doi.org/10.1242/dev.009068>
- Sun, G. bo, Sun, X., Wang, M., Ye, J. xue, Si, J. yong, Xu, H. bo, Meng, X. bao, Qin, M., Sun, J., Wang, H. wei, Sun, X. bo, 2012. Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 265, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.002>
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34, 497–500.
- Tamokou, J. de D., Chouna, J.R., Fischer-Fodor, E., Chereches, G., Barbos, O., Damian, G., Benedec, D., Duma, M., Efouet, A.P.N., Wabo, H.K., Kuate, J.R., Mot, A., Silaghi-Dumitrescu, R., 2013. Anticancer and antimicrobial activities of some antioxidant-rich cameroonian medicinal plants. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055880>
- Taskova, R., Evstatieva, L., Handjieva, N., Popov, S., 2002. Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 42–50. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-1-208>
- Taskova, R., Handjieva, N., Evstatieva, L., Popov, S., 1999. Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cymbalaria*. *Phytochemistry* 52, 1443–1445. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00182-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00182-X)
- Tatenda, M., Quinn, M., Plebanski, M., 2016. Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat. Rev.* 42, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.11.005>
- Țăbrențu, C.E., Iordache, T.V., Ionescu, E., Mihaela Crețu, R., Florea, A.M., Teodor, S., Apostol, S., Zaharia, A., Radu, A.L., Sârbu, A., 2020. Straightforward Preparation of Naphtodianthrone-Rich Ethanolic Extracts from Wild St. John's Wort. *J. Diet. Suppl.* 17, 88–96. <https://doi.org/10.1080/19390211.2018.1484404>
- Teixeira, R.R., de Souza, A.V., Peixoto, L.G., Machado, H.L., Caixeta, D.C., Vilela, D.D., Baptista, N.B., Franci, C.R., Espindola, F.S., 2017. Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats. *Neurosci. Lett.* 655, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.010>
- Tetali, S.D., 2019. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta* 249, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x>
- Thakare, V.N., Dhakane, V.D., Patel, B.M., 2016. Potential antidepressant-like activity of silymarin in the acute restraint stress in mice: Modulation of corticosterone and oxidative stress response in cerebral cortex and hippocampus. *Pharmacol. Reports* 68, 1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.06.002>

- Thenmozhi, A.J., William Raja, T.R., Manivasagam, T., Janakiraman, U., Essa, M.M., 2017. Hesperidin ameliorates cognitive dysfunction, oxidative stress and apoptosis against aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease. *Nutr. Neurosci.* 20, 360–368. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1144846>
- Thomé, R.G., dos Santos, H.B., dos Santos, F.V., da Silva Oliveira, R.J., de Camargos, L.F., Pereira, M.N., Longatti, T.R., Souto, C.M., Franco, C.S., de Oliveira Aquino Schüffner, R., Ribeiro, R.I.M.A., 2012. Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 237, 1379–86. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012139>
- Tingen, C., Kim, A., Woodruff, T.K., 2009. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 795–803. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap073>
- Tiperciuc, B., Pârvu, A., Tamaian, R., Nastasa, C., Ionuț, I., Oniga, O., 2013. New anti-inflammatory thiazolyl-carbonyl-thiosemicarbazides and thiazolyl-azoles with antioxidant properties as potential iNOS inhibitors. *Arch. Pharm. Res.* 36, 702–714. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0083-9>
- Toma, V. Al, Farcaș, A.D., Pârvu, M., Silaghi-Dumitrescu, R., Roman, I., 2017. CA3 hippocampal field: Cellular changes and its relation with blood nitro-oxidative stress reveal a balancing function of CA3 area in rats exposed to repeated restraint stress. *Brain Res. Bull.* 130, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.012>
- Toma, V. Al, Farcaș, A.D., Roman, I., Sevastre, B., Hathazi, D., Scurtu, F., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R., 2016. Comparative *in vivo* effects of hemoglobin-based oxygen carriers (hbo) with varying prooxidant and physiological reactivity. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153909>
- Toumi, M.L., Merzoug, S., Tahraoui, A., 2016. Effects of quercetin on predator stress-related hematological and behavioural alterations in pregnant rats and their offspring. *J. Biosci.* 41, 237–249. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9613-1>
- Tsai-Turton, M., Luong, B.T., Tan, Y., Luderer, U., 2007. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol. Sci.* 98, 216–230. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm087>
- Ueno, T., Hirayama, S., Sugihara, M., Miida, T., 2016. The bromocresol green assay, but not the modified bromocresol purple assay, overestimates the serum albumin concentration in nephrotic syndrome through reaction with α 2-macroglobulin. *Ann. Clin. Biochem.* 53, 97–105. <https://doi.org/10.1177/0004563215574350>
- Ugochukwu, N.H., Babady, N.E., Cobourne, M., Gasset, S.R., 2003. The effect of *Gongronema latifolium* extracts on serum lipid profile and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *J. Biosci.* 28, 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF02970124>
- Umekl, A., Kreft, S., Kartnig, T., Heydel, B., 1999. Quantitative phytochemical analyses of six *Hypericum* species growing in Slovenia. *Planta Med.* 65, 388–390.
- Unal, E.L., Mavi, A., Kara, A.A., Cakir, A., Şengül, M., Yildirim, A., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of some plants used as remedies in Turkish traditional medicine. *Pharm. Biol.* 46, 207–224. <https://doi.org/10.1080/13880200701735577>
- Varadharaj, S., Kelly, O.J., Khayat, R.N., Kumar, P.S., Ahmed, N., Zweier, J.L., 2017. Role of dietary antioxidants in the preservation of vascular function and the modulation of health and disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 4, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00064>
- Vasilevna, I.T., Volodymyrivna, G.O., Leonidivna, T.E., Aleksandrovna, K.I., Mihaylovna, K.A., 2016. Antimicrobial activity of the genus *Galium* L. *Pharmacogn. Commun.* 6, 42–47. <https://doi.org/10.5530/pc.2016.1.8>

- Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Roman-Ramos, R., Vega-Avila, E., Perez-Gutierrez, M.S., 2006. Effect of *Plantago major* on cell proliferation *in vitro*. J. Ethnopharmacol. 103, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.050>
- Veličković, D.T., Nikolova, M.T., Ivancheva, S. V., Stojanović, J.B., Veljković, V.B., 2007. Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. J. Serbian Chem. Soc. 72, 73–80. <https://doi.org/10.2298/JSC0701073V>
- Venditti, A., Serrilli, A.M., Cecco, M. Di, Ciaschetti, G., Piazzale, C., Moro, A., Roma, U., Sapienza, L., 2011. Phytochemical analysis of *Plantago sempervirens* from Majella National 37–41.
- Verdile, G., Keane, K.N., Cruzat, V.F., Medic, S., Sabale, M., Rowles, J., Wijesekara, N., Martins, R.N., Fraser, P.E., Newsholme, P., 2015. Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity between insulin resistance, obesity and Alzheimer’s disease. Mediators Inflamm. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/105828>
- Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., Srijaranai, S., 2010. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. LWT - Food Sci. Technol. 43, 1325–1330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.007>
- Vitale, D.C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., Salomone, S., 2013. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 38, 15–25. <https://doi.org/10.1007/s13318-012-0112-y>
- Vlase, L., Mocan, A., Hanganu, D., Gheldiu, A., Crişan, G., 2014. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (Rubiaceae). Dig. J. Nanomater. Biostructures 9, 1085–1094.
- Vredenburg, G., den Braver-Sewradj, S., van Vugt-Lussenburg, B.M.A., Vermeulen, N.P.E., Commandeur, J.N.M., Vos, J.C., 2015. Activation of the anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 BM3 mutants. Toxicol. Lett. 232, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.005>
- Wang, J., Huang, J., Wang, L., Chen, C., Yang, D., Jin, M., Bai, C., Song, Y., 2017. Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK- NF-κB signaling pathway. J. Thorac. Dis. 9, 4398–4412. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.09.135>
- Wang, Q., Shen, B., Chen, L., Zheng, P., Feng, H., Hao, Q., Liu, X., Liu, L., Xu, S., Chen, J., Teng, J., 2015. Extracellular calumenin suppresses ERK1/2 signaling and cell migration by protecting fibulin-1 from MMP-13-mediated proteolysis. Oncogene 34, 1006–1018. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.52>
- Warner, M., Huang, B., Gustafsson, J.A., 2017. Estrogen receptor β as a pharmaceutical target. Trends Pharmacol. Sci. 38, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.006>
- Weatherman, R. V., 2006. Untangling the estrogen receptor web. Nat. Chem. Biol. 2, 175–176. <https://doi.org/10.1038/nchembio0406-175>
- Wu, X., Matzuk, M.M., 2002. GDF-9 and BMP-15: Oocyte organizers. Rev. Endocr. Metab. Disord. 3, 27–32. <https://doi.org/10.1023/A:1012796601311>
- Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M., 2006. *Hypericum perforatum*: A “modern” herbal antidepressant - Pharmacokinetics of active ingredients. Clin. Pharmacokinet. 45, 449–468. <https://doi.org/10.2165/00003088-200645050-00002>
- Wuttke, W., Jarry, H., Westphalen, S., Christoffel, V., Seidlová-Wuttke, D., 2002. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 83, 133–147. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00259-5](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00259-5)
- Xue, M., Momiji, H., Rabbani, N., Barker, G., Bretschneider, T., Shmygol, A., Rand, D.A., Thornalley, P.J., 2015.

- Frequency Modulated Translocational Oscillations of Nrf2 Mediate the Antioxidant Response Element Cytoprotective Transcriptional Response. *Antioxidants Redox Signal.* 23, 613–629. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5962>
- Yang, J., Li, Y., Wang, F., Wu, C., 2010. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6525–6531. <https://doi.org/10.1021/jf903070a>
- Yang, L.E., Meng, Y., Peng, D.L., Nie, Z.L., Sun, H., 2018. Molecular phylogeny of *Galium* L. of the tribe Rubieae (Rubiaceae) – Emphasis on Chinese species and recognition of a new genus *Pseudogalium*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 126, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.004>
- Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P., Bahadoran, Z., 2015. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian J. Sports Med.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.5812/asjasm.24898>
- Yernazarova, K.B., Abdrassulova, Z.T., Tuleuhanov, S.T., Tussupbekova, G.A., Salybekova, N.N., Basim, H., 2019. Biological features of the medicinal plant *Plantago major* L. *Int. J. Biol. Chem.* 12, 86–93. <https://doi.org/10.26577/ijbch-2019-1-i11>
- Zhao, R., Chen, Z., Jia, G., Li, J., Cai, Y., Shao, X., 2011. Protective effects of diosmetin extracted from *Galium verum* L. on the thymus of U14-bearing mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 89, 665–673. <https://doi.org/10.1139/y11-058>
- Zheng, K., Wu, L., He, Z., Yang, B., Yang, Y., 2017. Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement* 112, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.08.013>
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M.T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Saboury, A.A., 2019. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34, 279–309. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>
- Zou, Y., Lu, Y., Wei, D., 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5032–5039. <https://doi.org/10.1021/jf049571r>
- Zubair, M., Ekholm, A., Nybom, H., Renvert, S., Widen, C., Rumpunen, K., 2012a. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *J. Ethnopharmacol.* 141, 825–830. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.016>
- Zubair, M., Nybom, H., Ahnlund, M., Rumpunen, K., 2012b. Detection of genetic and phytochemical differences between and within populations of *Plantago major* L. (Plantain). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 136, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.01.002>
- Zuo, T., Zhu, M., Xu, W., 2016. Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrome and cancers. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/8589318>

Site-ografie

<https://eunis.eea.europa.eu/species/177829>

<http://eunis.eea.europa.eu/species/181730>

<https://eunis.eea.europa.eu/species/173352>

<https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=HYPER>

<https://www.turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/view-photo/3599/15974.html>

Contribuții personale

(cf. Anexa Ordin 6129_2016 standarde minimale_CNATDCU, Comisia de Biologie și Biochimie)

Articole în reviste indexate ISI, ca autor principal

1. *In vivo pharmacological and anti-inflammatory evaluation of xerophyte Plantago sempervirens Crantz*, **Farcaș, A.D.**, Moț, A.C., Pârvu A.E., Toma V.Al., Popa M.A., Mihai M.C., Sevastre B., Roman I., Vlase L., Pârvu M., (2019), *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-13, (<https://doi.org/10.1155/2019/5049643>)⁵; IF: 4.86 (2018).
2. *Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/pro-oxidant effect of Galium verum extract during acute restraint and dark stress in female rats*, **Farcaș A.D.**, Moț A.C., Zagrean-Tuza C., Toma V.Al., Cimpoiu C., Hosu A., Pârvu M., Roman I., Silaghi-Dumitrescu R., (2018), *PlosOne*, 13(7), 1-18 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200022>)⁶; IF: 2.77 (2018).
3. *Remarkable rutin-rich Hypericum capitatum extract exhibits anti-inflammatory effects on turpentine oil-induced inflammation in rats*, **Farcaș A.D.**, Moț A.C., Zagrean-Tuza C., Țicolea M., Sevastre B., Kulak M., Silaghi-Dumitrescu R., Pârvu A.E., (2019), *BMC Complementary and alternative medicine*, 19, 289, 1-13 (<https://doi.org/10.1186/s12906-019-2680-8>)⁷; IF: 2.47 (2018).
4. *In vivo evaluation of hemerythrin-based oxygen carriers: similarities with hemoglobin-based counterparts*, Toma, V.A*, **Farcaș, A.D.***, Roman, I., Sevastre, B., Hathazi, D., Scurtu, F., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, (2017), *R., Int. J. Biol. Macromol.*, S0141-8130 (17), 31756-7 (<http://www.science-direct.com/science/article/pii/S0141813017317567>); IF: 4.78 (2018).
5. *Comparative in vivo effects of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC) with varying prooxidant and physiological reactivity*, Toma, V.*, **Farcaș, A.***, Roman, I., Sevastre, B., Hathazi, D., Scurtu, F., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R., (2016), *PloS ONE*, 11(4), 1-16 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27097326>); IF: 2.77 (2018).

Articole în reviste indexate ISI, ca și contributor

1. *New Aspects Towards a Molecular Understanding of The Allicin Immunostimulatory Mechanism via Colec12, MARCO and SCARB1 Receptors*, V. Toma, B.A. Tigu, **Farcas, A.**, B. Sevastre, M. Taulescu, A.M.R. Gherman, I.Roman, E. Fischer-Fodor, M. Parvu, (2019), *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3627 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6696194/>); IF: 4.18 (2018).
2. *CA3 hippocampal field: Cellular changes and its relation with blood nitro-oxidative stress reveal a balancing function of CA3 area in rats exposed to repeated restraint stress*, Toma, VA, **Farcas, A**, Parvu, M., Silaghi-Dumitrescu, R., Roman, I. (2017), *Brain Res Bull.*, 130, 10-17 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28013041>); IF: 3.44 (2017).
3. *In vivo tests of cell-free hemoglobin-based blood substitutes candidates: histopathological characterization*, Vlad Al. Toma, **Anca D. Farcaș**, Ioana Roman, Florina Scurtu-Deac, Radu Silaghi-Dumitrescu, (2016), *Rev Romana Med Lab-Supliment* 24(1), 88-89 (http://www.rml.ro/articole/2016/2016_1_supliment.pdf); IF: 0.80 (2018).

⁵ Rezultate din domeniul tezei

⁶ Rezultate din domeniul tezei

⁷ Rezultate din domeniul tezei

Articole în reviste indexate BDI, ca autor principal

1. *The down-regulation outcome of wild European apple (Malus sylvestris (L.) Mill.) extract on a series of biochemical markers during oxidative stress*, (2018), **Farcaș, A.D.**, Toma, V.A., Crișan, F., Dume, B.R., Roman, I., *Annals of Romanian Society for Cellular Biology*, 22(2), 34-41 (DOI: [10.1016/j.annrscb.2018.00019](https://doi.org/10.1016/j.annrscb.2018.00019)).

Articole în reviste indexate BDI, ca și contributor

1. *The antioxidants are not enough. Malus sylvestris (L.) Mill. extract enhances the carbon tetrachloride liver toxicity in albino rats*, Toma, V.A., Dume, B., **Farcaș, A.D.**, Roman, I., (2018), *Annals of The Romanian Society for Cell Biology*, 22(2), 26-33 (http://www.annalsofrscb.ro/numar%20in%20curs/22%20/vlad4_1.pdf).

2. *Behavior, MRI features and ultrastructural bases of the autism-like disorder induced in rats by prenatally exposed to sodium valproate*, Toma, V.A., Farcașanu, A., Sevastre-Berghian, A., Barbu-Tudoran, L., Tripon, S., Sevastre B., **Farcaș, A.D.**, Roman, I., Simon, S., Pârvu, M., (2017), *Brain Disord. Ther.*, 6(3 Suppl), 56, 2017. DOI: 10.4172/2168-975X-C1-018. (<https://www.omicsonline.org/proceedings/behavior-mri-features-and-ultrastructural-bases-of-the-autism-likedisorders-induced-in-rats-by-prenatally-exposed-to-sod-080010.html>).

3. *Protective effects of Gallium verum L., extract on the hypothalamic – pituitary – adrenal axis under anakinetic stress conditions, in rats. Histological aspects*, Roman, I., Toma, V., **Farcaș, A.**, (2015), *Studia Universitatis "Vasile Goldiș"*, 25(3), 207-214 (<http://www.studiauniversitatis.ro/pdf/25-2015/25-3-2015/10-25-3-%20I.R.-%20207-%20214.pdf>).

Studii

1. *Explorarea potențialului adjuvant al unor fitocompuși din genul Plantago în medicația bolilor degenerative prin interacție cu biosisteme expuse unor metaboliți toxici ai ciclofosfamidei* aparținând proiectului PN 16-30 02 03, din anul 2016, înregistrat ca rezultat CDI la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare (INDCDTIM) Cluj-Napoca.

Membru în proiecte de cercetare

- **PN-III-P1.2-PCCDI-2017-0387** "Emerging technologies for the industrial capitalization of 2D structures (graphene and nongraphenic)".

- **Core project PN16-30 02 03** "Border reaserch for molecular technology development – New applications for isotopic and molecular processes for decontamination based on functionalized nanomaterials", 2017-2018, National Institute for Reseach and Development of Isotopic and Molecular Techologies Cluj-Napoca;

- **Young researcher teams** -PN-II-RU-TE-2014-4-2555 "Non-symbiotic Hemoglobins from plants and their reactions to stress", Babeș-Bolyai University;

- **Core Project PN09-440.213** „ Biochemical and biophysical evaluation of some proteins involved in oxidative metabolism, Phase I-2014/Phase II-IV-2015, National Institute for Reseach and Development of Isotopic and Molecular Techologies Cluj-Napoca.

- **Core Project PN09-360.202** "Morphological, phytocenological, biochemical and histochemical

(histoenzymological) studies on some officinal riched in active principles in order to obtain pharmaceutical bioproducts”, Institute of Biological Research, Phase II-2015.

Participări la conferințe

Peste 10 participări la conferințe naționale și internaționale, dintre care cele mai reprezentative sunt:

1. Evaluation of antioxidant properties and biological activities of several *Plantago* hidroalcoholic extracts, **The 15th International Symposium of the 3rd Millennium Agriculture, 29.09-1.10.2016, Cluj-Napoca, Romania**

Anca D. Farcaș, Augustin C. Moș, Vlad Al. Toma, Alina E. Pârvu, Ioana Roman, Silvia Neamțu, Marcel Pârvu

<http://www.usamvcluj.ro/eng/index.php/16-galerie-foto/234-simpozion-perspective-ale-agriculturii-mileniului-iii>)

2. Comparative antioxidant and prooxidant activities of five *Plantago* species, **The 4th Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences "IC-ANMBES 2016", 29.06-1.07.2016, Brașov, Romania**

Anca Farcaș, Augustin Moș, Vlad Toma, Laurian Vlase, Silvia Neamțu, Marcel Pârvu

<http://icanmbes.unitbv.ro/>)

3. Structure - biological activity relationship of estrogenic flavonoids from *Plantago sempervirens*, **The 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress in Edinburgh, Scotland in July 2017**

Anca D. Farcaș, Luiza Buimagă-Iarinca, Augustin C. Moș, Vlad Al. Toma, Marcel Pârvu

<http://www.iupab2017.org/home>)

4. Structure – biological activity profile of *Plantago* flavonoids with estrogenic potential, **11th International Conference Processes in Isotopes and molecules, 27-29.09.2017, Cluj-Napoca, Romania**

Anca D. Farcaș, Luiza Buimagă-Iarinca, Augustin C. Moș, Vlad Al. Toma, Silvia Neamțu, Marcel Pârvu

<http://pim.itim-cj.ro/>)

5. Luteolin mimics the *in vivo* effects of estrogen during induced-ovarian insufficiency, **The 17th International Symposium Prospects for the 3rd Millennium Agriculture, 27-29.09.2018, Cluj-Napoca, Romania**

Anca Farcaș, Vlad Toma, Ioana Roman, Orsolya Srpataki, Bogdan Sevastre, Septimiu Tripon, Lucian Barbu-Tudoran, Marcel Pârvu

<http://www.usamvcluj.ro/eng/index.php/16-galerie-foto/234-simpozion-perspective-ale-agriculturii-mileniului-iii>)

H-index: 4

Profil Google academic: <https://scholar.google.com/citations?user=GQEIzhIAAAAJ&hl=ro>

Mulțumiri

Prezenta teză de doctorat este rezultatul efortului tuturor colaboratorilor din Cluj-Napoca și București, care au contribuit semnificativ la creșterea calității acestei lucrări. Având un caracter interdisciplinar, prezenta teză de doctorat cuprinde rezultatele activităților desfășurate în mai multe laboratoare de cercetare, după cum urmează:

1. Laboratorul de Botanică de la Grădina Botanică, în care au fost preparate extractele de *Plantago* (*P. cornuti*, *P. lanceolata*, *P. major*, *P. media* și *P. sempervirens*). La Herbarul Universității Babeș-Bolyai au fost depuse vouchere de indentificare a speciilor (*P. cornuti*-CL663371; *P. lanceolata*-CL663372; *P. major*- CL663369; *P. media*- CL663370; *P. sempervirens*- CL663373, *Galium verum* – CL666632);

2. Departamentul de Biologie al Facultății de Arte și Științe de la Universitatea Kilis 7 Aralık, Turcia, unde a fost preparat extractul de *Hypericum capitatum* și unde a fost depus un voucher de indentificare pentru aceasta specie (K.A.1109);

3. Laboratorul de Chimie Bioanorganică de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității „Babeș-Bolyai”, unde a fost preparat extractul de *Hypericum capitatum*, au fost efectuate analizele cromatografice pentru extractul de *Galium verum*, *H. capitatum*, au fost realizate analizele de activitate antioxidantă și pro-oxidantă, dar și evaluarea prin rezonanță electronică de spin;

4. Laboratorul de Chimie Analitică de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității „Babeș-Bolyai”, unde a fost efectuată analiza cromatografică în strat subțire pentru extractul de *G. verum*;

5. Laboratorul departamentului de Tehnologie Farmaceutică și Biofarmacie de la Facultatea de Farmacie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, în care a fost efectuată analiza cromatografică la extractele de *Plantago*;

6. Biobaza Facultății de Biologie și Geologie de la Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, de la Facultatea de Medicină Veterinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca și de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca. Cele trei biobaze au fost folosite pentru experimentele *in vivo*, fiind gazdele animalelor de experiment;

7. Laboratoarele de Biochimie și Histologie Animală de la Institutul de Cercetări Biologice, în care au fost prelucrate și analizate probele biologice prelevate de la animalele din experimentele *in vivo*. Analizele efectuate au cuprins, în principal, biochimia sângelui, parametri de stres oxidativ, determinări hormonale, examinări citologice și prelucrarea statistică;

8. Laboratorul de Hematologie de la Facultatea de Medicină Veterinară din cadrul USAMV Cluj-Napoca, în care s-au efectuat hemoleucograma completă, într-un timp foarte scurt de la prelevarea probelor;

9. Laboratorul de Chimie din cadrul Departamentului de Fiziopatologie de la Facultatea de Medicină din cadrul UMF Cluj-Napoca, în care au fost determinați markeri ai stresului nitro-oxidativ din ser prelevat de la experimentele *in vivo* cu *P. sempervirens* și *H. capitatum*;

10. Laboratorul de Celule Stem al Institutului de Biologie și Patologie Celulară al Academiei Române de la București, în care a fost efectuat testul de regenerare celulară în culturi *in vitro* îmbunătățite cu extract de *P. sempervirens*;

11. Laboratorul de Biologie Tumorală al Institutului Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” din Cluj-Napoca, în care au fost citite microplăcile pentru testele ELISA;

12. Centrul de Microscopie Electronică “Constantin Crăciun” al Universității “Babeș-Bolyai, în care au fost prelucrate țesutul ovarian din experimentele cu *P. sempervirens*, în vederea analizelor de microscopie electronică a celulelor granuloase și celulelor theca din ovare;

13. Departamentul de Fizică Moleculară și Biomoleculară de la Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, unde au fost efectuate simulările de docking molecular la flavonoide;

Totodată, pentru realizarea experimentelor prezentate în teza de doctorat, sprijinul financiar a fost unul considerabil, cu precădere din proiecte de cercetare, după cum urmează:

a. PN09-44 02 13 (2016) – Evaluarea biochimică și biofizică a unor proteine implicate în metabolismul oxidativ din cadrul Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare coordonat de CS1 dr. Ioan Turcu. Acest proiect a stat la baza dezvoltării laboratoarelor de Biochimie și Histologie din cadrul Institutul de Cercetări Biologice și în care am efectuat cea mai mare parte din analize pentru aceasta teză de doctorat (<https://www.itim-cj.ro/documents/Raport%20final%20nucleu%202009-2015.pdf>);

b. PN16-30 02 03 - Cercetări de frontieră dedicate dezvoltării de tehnologii moleculare din cadrul Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, Faza 4 - *Explorarea potențialului adjuvant al unor fitocompuși din genul Plantago în medicația bolilor degenerative prin interacție cu biosisteme expuse unor metaboliți toxici ai ciclofosfamidei*, coordonat de CSIII Dr. Silvia Neamtu și CS1 dr. Lorant Janoși. În acest proiect am avut șansa să fiu responsabilă de o parte din ideile tezei de doctorat, care a început în toamna anului 2015. Resursele financiare au contribuit semnificativ la realizarea cercetărilor asupra celor cinci extracte de *Plantago*, de la analizele de compoziție chimică, la cele de regenerare *in vitro* și terminand cu studiile *in vivo* pe modele de stres oxidativ și gonadotoxicitate;

c. PN-II- RU-TE- 4-2014-2555 - Hemoglobine nonsimbiotice din plante cu implicare în răspunsuri asociate stresului, 2015-2017, în care am efectuat cercetări în echipa de cercetare coordonată de directorul de proiect lector dr. Moț Augustin, cercetări care au privit activități antioxidante ale extractelor de *Galium* și *Hypericum*;

d. Grantul doctoral (2015-2018) de la Școala doctorală Biologie Integrativă de la Universitatea Babeș-Bolyai, care a fost un sprijin financiar semnificativ pentru materiale și taxa de publicare a articolului *Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/pro-oxidant effect of Galium verum extract during acute restraint and dark stress in female rats*, Farcaș A.D., Moț A.C., Zagrean-Tuza C., Toma V.Al., Cimpoiu C., Hosu A., Pârvu M., Roman I., Silaghi-Dumitrescu R., (2018), PlosOne, 13(7), 1-18 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200022>);

Toată activitatea de cercetare cuprinsă în această teză a fost atent coordonată și în permanență verificată de coordonatorul științific al tezei de doctorat, Prof. univ. dr. Marcel Pârvu și de către comisia de îndrumare, Conf. univ. dr. Manuela Banciu, Conf. univ. dr. Lucian Barbu și Lect. univ. dr. Augustin Moț.

Mulțumesc tuturor colaboratorilor care m-au ajutat la realizarea obiectivelor acestei teze de doctorat, atât cu îndrumări științifice, cât și cu sprijin tehnic și financiar: d-lui Conf. univ. dr. Bogdan Sevastre (USAMV Cluj-Napoca), d-șoarei Asist. univ. dr. Orsolya Sarpataki; d-nei Prof. univ. dr. Alina Pârvu (UMF Cluj-Napoca); d-nei CSI dr. Eva Fischer-Fodor (IOCN Cluj-Napoca); d-nei CSIII dr. Silvia Neamtu (INCDTIM Cluj-Napoca); d-lui CSI dr. Ioan Turcu (INCDTIM Cluj-Napoca); d-nei CSIII dr. Luiza Buimagă-Iarinca (INCDTIM Cluj-Napoca); Dr. Cristina Mihai (IBPC București), Dr. Mirel Popa (IBPC București).

Mulțumiri speciale le adresez colegilor Vlad Alexandru Toma și dr. Ioana Roman, cu care am împărtășit idei, am proiectat experimente și am petrecut cel mai mult timp în laboratoarele de la ICB Cluj-Napoca. Totodată, mulțumiri speciale d-lui Lect. univ. dr. Augustin Moț, care m-a îndrumat îndeaproape pe parcursul celor 5 ani, în special în pregătirea manuscriselor științifice și publicarea acestora.

Nu în ultimul rând, coordonatorului tezei de doctorat, d-lui Prof. univ. dr. Marcel Pârvu, alese mulțumiri pentru toate eforturile pe care le-a depus pe parcursul celor aproape 5 ani de doctorat, pentru îndrumările științifice, pentru răbdare, spirit critic și pentru încrederea acordată.

