

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE

Școala Doctorală Biologie Integrativă

TEZA DE DOCTORAT

**POTENȚIAL TERAPEUTIC AL PLANTELOR *ALLIUM*
SATIVUM L. ȘI *ALLIUM FISTULOSUM* L.**

- Rezumat -

Student doctorand,

ADRIAN BOGDAN ȚIGU

Conducător științific,

Prof. Univ. Dr. Habil. Marcel Pârvu

Cluj-Napoca

2020

Introducere

Scopul acestei lucrări a fost de a investiga proprietăți biologice ale extractelor de *Allium* și de a evidenția potențialul terapeutic al substanței active din extracte de *Allium* (alicina), folosind modele experimentale *in vitro* – culturi celulare umane și culturi fungice, dar și modele experimentale *in vivo* – șobolani din rasa Wistar. Extractele de *Allium* și alicina au fost analizate din punct de vedere fitochimic, iar proprietățile lor antioxidante, antifungice și antitumorale au fost analizate prin metode de analiză convenționale, considerate ”golden standard” și general acceptate.

Pentru realizarea studiilor prezentate în aceasta lucrare s-au utilizat tehnici și au fost aplicate protocoale de lucru moderne care au permis obținerea de rezultate solide și confirmate de literatura existentă. Rezultatele obținute deschid perspective spre studii aprofundate în fitomedicină.

Investigarea efectului antifungic al extractului de *Allium sativum* (usturoi) și al alicinei a fost evidențiat asupra unei onicomicoze având ca agenți infecțioși *Meyerozyma guilliermondii* și *Rhodotorula mucilaginosa*; pentru prima dată, a fost identificată o infecție a unghiilor determinată de ambele specii de fungi într-o co-infecție. Efectul antifungic al extractului de usturoi și al alicinei a fost analizat concomitent cu efectul antioxidant în vederea investigării posibilității reducerii stresului oxidativ și al inflamațiilor locale generate de co-infecția fungică. Astfel, s-a urmărit propunerea unei terapii care să țintească simultan atât infecția fungică, cât și inflamația locală.

La nivel mondial, se dorește facilitarea accesului la terapii eficiente și puțin costisitoare, îndeosebi pentru populația cu situații economice defavorabile și în comunitățile sărace. Astfel, este o nevoie continuă de terapii alternative și la îndemână pentru a combate diverse patologii, precum infecțiile fungice, care sunt prezente cu o frecvență mai ridicată în populațiile subdezvoltate și slab susținute economic. Extractele naturale, precum extractul de *Allium sativum*, pot fi o terapie la îndemână pentru combaterea acestor infecții.

Pornind de la ideea precedentă, aria de studiu a fost extinsă spre alte patologii cu impact major la nivel mondial, astfel că în urma sintetizării alicinei s-a investigat potențialul antitumoral al acesteia.

Organizația Mondială a Sănătății (OMS) estimează aproximativ 9.6 milioane de decese în anul 2018 având ca și cauză principală diverse tipuri de cancer. Iar tendința, în ceea ce privește apariția de noi cazuri de cancer, este în creștere, de la an la an, datorită unei multitudini

de factori precum poluarea, dezechilibrele genetice și factorii de mediu la care oamenii se expun constant.

Cancerul de plămân și cancerul colorectal sunt liderii detașați în ceea ce privește numărul de cazuri de cancer în rândul bărbaților, în timp ce în rândul femeilor doar cancerul de sân prezintă o frecvență mai mare în populație (Siegel și colab., 2019).

În ultimele decenii, tot mai multe terapii antitumorale au avut ca punct de plecare compuși naturali sau derivați ai acestora, natura servind ca model pentru terapiile ce se folosesc astăzi cu atât de mult succes, un exemplu răsunător fiind Paclitaxel (Weaver, 2014), având ca origine *Taxus brevifolia* - tisa, dovedindu-se eficient în combinație cu citostatice convenționale precum carboplatin sau cisplatin în cazul cancerului ovarian.

Alicina, substanța activă din *Allium sativum* cu potențial terapeutic, a fost studiată de numeroase colective de cercetare, care s-au axat în special pe studiul potențialului antitumoral al acestei substanțe sulfurice.

În această lucrare a fost investigat efectul antitumoral al alicinei din mai multe puncte de vedere: (i) asupra proliferării celulelor tumorale; (ii) asupra modificărilor morfologice induse celulelor tumorale în urma expunerii la tratamentul acut cu alicină; (iii) potențialul de inhibare a două dintre cele mai importante caracteristici ale celulelor tumorale, formarea coloniilor și migrarea, caracteristică a celulelor cu potențial de metastazare; (iv) investigarea inducerii morții celulare prin apoptoză, în cazul liniilor tumorale de cancer colorectal și de plămân.

Alicina a fost testată ca tratament individual și în combinație cu terapia convențională cu 5-fluorouracil.

Toate aceste aspecte sunt prezentate, în detaliu, în paginile ce urmează, structurate sub forma a trei studii individuale, dar având ca element comun alicina și extracte de *Allium*. Fundamentarea științifică a rezultatelor a fost posibilă datorită colaborării colectivelor științifice multidisciplinare din cadrul Universității "Babeș-Bolyai" Cluj-Napoca – Facultatea de Biologie și Geologie în colaborare cu Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, Institutului Oncologic "Ion Chiricuța" din Cluj-Napoca și Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Obiectivele și scopul cercetării

Obiectivele cercetării au urmărit: (a) obținerea și investigarea compoziției fitochimice a extractelor de *Allium*; (b) investigarea efectului antifungic și antioxidant al extractului de *Allium sativum* și al alicinei, prin compararea acestui efect cu cel al unui produs comercial antiinflamator nesteroidian, în modele *in vitro* și *in vivo*; (c) evaluarea potențialului antitumoral al alicinei ca tratament individual, dar și în combinație cu citostatice convenționale, prin investigarea modificărilor la nivel structural și molecular și a morții celulare induse prin apoptoză sau non-apoptotică; (d) investigarea potențialului de inhibare a migrării și formării coloniilor celulelor tumorale, două aspecte specifice tumorilor – migrarea și formarea de noi situsuri metastatice.

Scopul tezei de doctorat este studierea a două specii foarte comune de *Allium*, cultivate și folosite, de om, din timpuri străvechi. Folosind diferite metode de cercetare, am contribuit la îmbogățirea cunoștințelor, despre potențial terapeutic al plantelor *Allium sativum* și *Allium fistulosum*, reflectate în publicații. O importanță deosebită prezintă cercetarea unor efecte ale alicinei. Rezultatele cercetării oferă perspective importante, pentru folosire în fitomedicină.

I. Date din literatură

1. Caracterizare biologică a unor specii de *Allium*

1.1. Încadrare sistematică și speciație

Plantele de *Allium* (Regnul Plantae, Incr. Magnoliophyta, Clasa Liliopsida/Liliatae, Liliales, Liliaceae) au fost utilizate în medicina tradițională pentru potențialul lor terapeutic. Sunt cunoscute mai mult de 800 de specii de *Allium*, dintre care unele au fost descrise recent (Vimal și Devaki, 2004). Diferite specii de *Allium* au fost identificate în diverse zone, informațiile fiind publicate de-a lungul anilor. Majoritatea speciilor de *Allium* sunt native din zonele emisferei nordice, în special în Asia (Li și colab., 2010), singura specie de *Allium* întâlnită în emisfera sudică este *A. dregeanum* (Li și colab., 2010).

1.5. *Allium sativum*

A. sativum (Figura 1) este valorificată pentru proprietățile sale terapeutice, iar studiile bibliografice sugerează faptul că previne numeroase boli cronice, datorită cantităților mari de flavonoid quercitrin. Acest flavonoid contribuie la prevenirea bolilor cardiovasculare și are proprietăți antitumorale (D'Andrea, 2015). Extractul de usturoi reduce stresul oxidativ și are proprietăți hipoglicemice, echilibrând glicemia postprandial (O'Keefe și Bell, 2007).

A. sativum este una dintre cele mai cultivate legume, având culturi de aproximativ 10 milioane de tone anual, conform organizației americane de agricultură. Usturoiul este o sursă bogată de compuși bioactivi cu potențial terapeutic (Cerella și colab., 2011; Corzo-Martínez și colab., 2007).

Usturoiul inhibă activitatea carcinogenelor și induce oprirea ciclului celular în cazul celulelor maligne (în special în faza G2/M) (Xiao și colab., 2005). De asemenea, este stimulată apoptoza și metilarea histonelor (Iciek și colab., 2009). Activitatea antitumorală a usturoiului este datorată activității antimutagene și antigenotoxice a compușilor activi, precum polifenolii, dialil-sulfații și dialil-disulfații (Guyonnet și colab., 2002).

Polifenolii din componența usturoiului sunt compuși bioactivi cu multiple proprietăți biologice: antioxidante, antitumorale, antibacteriene și antiinflamatoare; plantele bogate în polifenoli au capacitatea de a inhiba degradările oxidative ale lipidelor și de a reduce stresul

oxidativ (Capasso, 2013; Nencini și colab., 2007; Thomson și Ali, 2003; Duthie și colab., 2000).



Figura 1. *Allium sativum* (tulpina și frunze – stânga; bulbili – dreapta) (Original: Marcel Pârvu).

Polifenolii sunt compuși metabolici secundari, în general sunt implicați în protejarea plantelor de radiațiile UV sau de patogeni. Însă caracterul antioxidant al acestor compuși îi face deosebit de importanți pentru medicina modernă.

Studiile efectuate asupra polifenolilor ne sugerează faptul că aceștia oferă protecție împotriva diferitelor tipuri de cancer, reduc riscul de apariție a diabetului și a bolilor degenerative (Arts și Hollman, 2005; Bianchini și Vainio, 2001).

Pornind de la aliină se pot obține numeroși compuși organosulfurici din componența usturoiului, prin procese de biotransformare (Figura 2). Aliina este transformată în urma tăierii, zdrobirii sau mojarării de către enzima aliinază în molecule de acid sulfenic, care în urma condensării a două molecule vor da naștere alicinei. Acesta este practic punctul comun al diversilor compuși organosulfurici din usturoi (și alte specii de *Allium*). În urma descompunerii, se formează fie compuși vinilici, fie dialil-sulfide (DAS), dialil-disulfide (DADS), fie dialil-trisulfide (DATS). DAS, DADS și DATS, prin reducere, vor forma alil mercaptani și alil persulfide, dar DADS și DATS prin substituție nucleofilică și adăugare de glutatiună vor forma S-alil-glutatiună care printr-o serie de substituții va forma alil-glutatiună-disulfidă (GSS) (Trio și colab., 2014).

Prin condensarea alicinei se formează ajoena, prin adăugarea unei glutatiune va rezulta s-alilmercaptogutatiună (SAMG), iar prin adăugarea unei L-cisteină va rezulta s-alilmercaptocisteină (SAMC) (Mitrová și colab., 2018; Trio și colab., 2014).

Compușii organosulfurici din usturoi nu sunt prezenți cu toții în bulbul proaspăt. Practic, prezența sau absența acestor compuși este strict legată de starea în care se găsește usturoiul. Bulbul proaspăt conține o cantitate impresionantă de alicină, uleiul esențial este bogat în DADS și DATS, în timp ce pudra de usturoi zdrobit și uscat conține aliină, DADS și

DATS. Cățeii de usturoi întregi conțin cantități mari de DADS, DATS, ajoena și compuși vinilici derivați din alicină. Dar extractul de usturoi adult conține SAMC (Trio și colab., 2014).

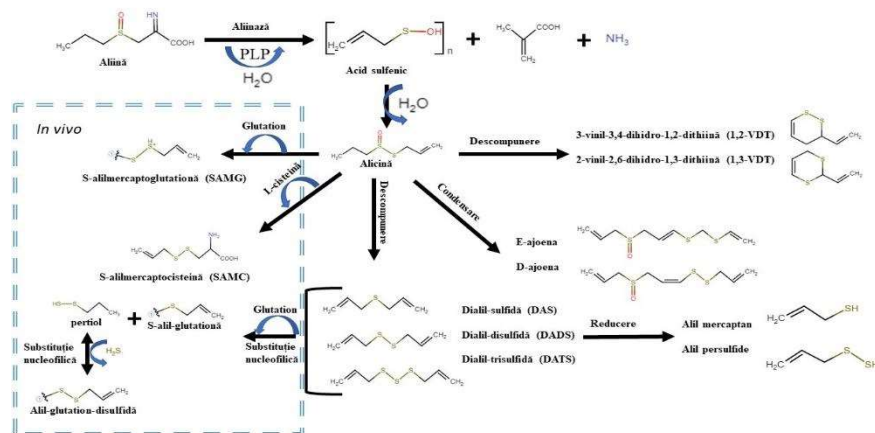


Figura 2. Biotransformarea aliinei în compuși organosulfurici (adaptată după Trio și colab., 2014).

Proprietăți antibacteriene

Alicina, împreună cu alți compuși sulfurici, este responsabilă de proprietățile antimicrobiale ale usturoiului. *A. sativum* este eficient împotriva a numeroase bacterii, fie ele Gram-negative sau Gram-pozitive (Oosthuizen și colab., 2017; Reiter și colab., 2017; Harris și colab., 2001; Abdullah și colab., 1988).

Extractul apos, alcoolic și cel în eter au fost testate împotriva a numeroase bacterii patogene, iar bacteriile Gram-pozitive precum *Staphylococcus aureus* au fost mult mai sensibile la aceste extracte decât bacteriile Gram-negative. Extractul apos de usturoi, administrat împreună cu antibiotice uzuale, poate fi utilizat în combaterea infecțiilor nosocomiale (frecvente în unitățile spitalicești) (EL-mahmood, 2009).

Proprietăți antifungice

Efectul antifungic al *A. sativum* este determinat de către compușii activi din compoziția acestuia: aliina, alicina și ajoena. Alicina prezintă activitate antifungică cu spectru larg, dar a arătat un efect antifungic puternic împotriva *Candida albicans* (Ankri și Mirelman, 1999). De asemenea, alicina obținută din *A. sativum* a fost testată în combinație cu Amfotericina B (un antifungic puternic și toxic, utilizat în principal la pacienții cu infecții fungice progresive și posibil fatale) împotriva *C. albicans*, iar rezultatele au evidențiat faptul că alicina îmbunătățește efectul Amfotericinei B împotriva *C. albicans* (An și colab., 2009).

Extractul alcoolic de usturoi are un puternic efect antifungic împotriva *M. guilliermondii* și *R. mucilaginosa* (Pârvu și colab., 2019).

Proprietăți antiparazitare și antivirale

Alicina prezintă caracter antiparazitar împotriva multor paraziți din intestinul uman, precum *Giardia lamblia* și *Entamoeba histolytica* (Ankri și Mirelman, 1999).

A. sativum prezintă proprietăți antivirale. Activitatea antivirală a compușilor activi din usturoi a fost studiată, iar ponderea cea mai mare, ca activitate antivirală, o are ajoena, urmată de alicina, alil-metil și tiosulfina (Weber și colab., 1992).

O investigație efectuată despre efectul alitridinei (dialil-trisulfid extras din *Allium sativum*) asupra replicării HCMV (*Citomegalovirus*) și asupra exprimării genelor virale a sugerat faptul că alitridina are efecte anti-HCMV (Zhen și colab., 2006).

Proprietăți antihipertensive și antitrombotice

A. sativum prezintă proprietăți antihipertensive, demonstrate în numeroase studii din literatură. Extractul apos de usturoi provoacă scăderea presiunii sanguine și bradicardie prin mecanism direct, fără a implica calea colinergică, sugerând astfel un mecanism periferic pentru hipotensiune (Nwokocha și colab., 2011; Ginter și Simko, 2010; Hiyasat și colab., 2009; Brace, 2002).

A fost demonstrat faptul că administrarea de extract apos de usturoi inhibă peroxidările lipidice și previne epuizarea glutationei, permițând recuperarea funcțională a acesteia, astfel stresul oxidativ este redus, iar tensiunea arterială și inflamațiile sunt și ele diminuate și normalizate (Sener și colab., 2007). De asemenea, se presupune că scăderea tensiunii sanguine la șobolani, după administrarea de *A. sativum*, este parțial mediată de oxidul nitric (NO), deoarece sinteza acestuia este intensificată (Al-Qattan și colab., 2006).

Alicina, substanța activă majoritară din usturoi, are efecte imunomodulatoare și stimulează limfocitele B să secrete anticorpi IgM și IgG. Această abilitate este potențată atunci când alicina este convertită împreună cu glutationul, în S-alil-mercaptoglutation; în plus, secreția de anticorpi este influențată și de nivelul de stres oxidativ din celulă (Toma și colab., 2019).

Proprietăți antiinflamatoare

Compușii activi ai usturoiului sunt implicați în modularea semnalelor intracelulare, în special a căii Nrf2-ARE (ARE este elementul de răspuns antioxidant). Nrf2 este un factor de transcriere, ce complexează cu MafK pentru a lega elementul de răspuns antioxidant (ARE) și

pentru a iniția transcrierea. Nrf2 mediază exprimarea unor enzime din faza a 2-a de metabolizare, precum HO-1, GST și Gle1. În cazul cancerului de colon, usturoiul induce translocarea Nrf2, activând enzimele antioxidante și având ca finalitate promovarea apoptozei. De asemenea, DAS, DADS și DATS stimulează exprimarea enzimelor antioxidante, inducând activarea Nrf2-ARE în celulele hepatice, iar capacitatea lor de modulare crește odată cu creșterea numărului de atomi de sulf. DAS și DATS inhibă NFκB indus de speciile reactive de oxigen, permițând cross-talk-ul dintre căile de semnalizare antiinflamatoare (Figura 3). DATS și DADS au capacitatea să inhibe procesele inflamatoare, iar moleculele organosulfurice au potențial anti-inflamator; alicina atenuează factorul de necroză tumorală α (TNF α), DADS inhibă secreția de molecule proinflamatoare, iar DATS inhibă producerea celulară de interleukine (IL-6, IL-10, IL-12) și TNF α (Trio și colab., 2014).

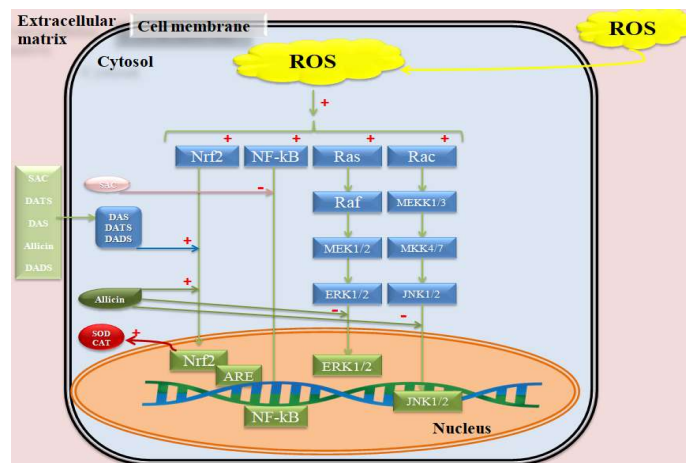


Figura 3. Schema mecanismului de acțiune antioxidant al compușilor organosulfurici din usturoi (adaptată după Trio și colab., 2014). SAC (S-Alil-Cisteină), DAS (Dialil-sulfide), DADS (Dialil-disulfide), DATS (Dialil-trisulfide), ROS (Speciile reactive de oxigen). Compușii cu sulf din compoziția usturoiului modulează calea de semnalizare a ROS și influențează modul de exprimare a Nrf-2, NF-κB, JNK 1/2 și ERK1/2, rezultând o modulare a expresiei genice și activarea complexului Nrf-2-ARE ce inițiază sinteza de enzime ale sistemului antioxidant precum SOD (Superoxid dismutază) și CAT (Catalază).

Toxicitate a extractului de *A. sativum* și a alicinei

Studiile efectuate cu privire la toxicitatea extractului de usturoi ne indică faptul că deși este de proveniență vegetală, trebuie ținut cont de doza administrată, dar și de faptul că în asociere cu anumite medicamente poate crea neplăceri sau reacții adverse.

Un studiu efectuat de Tattelman ne indică faptul că pacienții cărora li se administrează anticoagulante trebuie să administreze cu prudență dozele de extract de usturoi; astfel, dozele

mari de *A. sativum* împreună cu administrarea de anticoagulante pot duce la prelungirea timpului de sângerare în defavoarea pacienților (Tattelman, 2005).

1.6. *Allium fistulosum*

Allium fistulosum L. (Ceapa galeză) este o specie cultivată în România (Figura 4). Frunzele sale au o mare valoare nutritivă, putând fi consumate atât proaspete, cât și gătite, în plus sunt verzi pe tot parcursul anului.

Datorită conținutului bogat în compuși sulfurici, flavonoizi și acizi grași, *A. fistulosum* are proprietăți antifungice, antioxidante și antihipertensive (Lee și colab., 2018; Vlase și colab., 2013).

A. fistulosum a fost utilizată ca tratament al răcelilor, durerilor de cap, durerilor abdominale și al bolilor cardiovasculare de către adepții medicinei tradiționale. Sunt studii care atestă faptul că *A. fistulosum* previne formarea cheagurilor, are proprietăți antioxidante, antihipertensive și este un foarte bun produs antihipolipidemic (Sung și colab., 2015). Ceapa galeză prezintă un interes mare pentru cercetători, datorită compoziției bogate în propilensulfide, compuși cu puternic efect antibacterian și antiinflamator (Liu și colab., 2016).



Figura 4. *Allium fistulosum* (original: Marcel Pârnu).

Ceapa galeză, împreună cu alți membri ai familiei *Alliaceae*, are proprietăți medicinale deosebite, reduce presiunea sangvină și inhibă agregarea trombocitelor. *A. fistulosum* modulează funcțiile cardiovasculare, redă tonusul arterelor (în special aorta), dar efectul vasoconstrictor sau vasodilatator este dependent de modul în care a fost preparat extractul (Chen și colab., 2000).

2. Alicină

Alicina este un compus organosulfuric prezent în usturoi, ceapă și alte specii de *Allium*. Biosinteza alicinei se desfășoară conform figurii 5, pornind de la aliină, sub acțiunea enzimei

aliinază. Substratul de bază al aliinei este cisteina. În urma acestei reacții, se formează acid alilsulfenic, acid piruvic și o grupare NH_3 . Două molecule de acid alilsulfenic condensează și formează alicina prin eliberarea unei molecule de apă (Salehi și colab., 2019; Si și colab., 2019; Chen și colab., 2018; Huang și colab., 2017; Borlinghaus și colab., 2014).

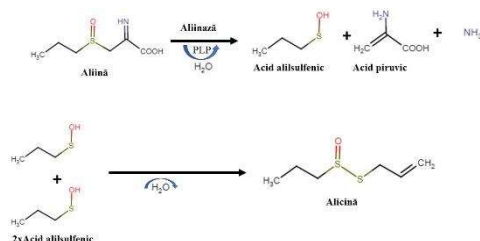


Figura 5. Biosinteza alicinei (adaptată după Salehi și colab., 2019).

Alicina are efecte antibacteriene, antivirale, antitumorale, anticoagulante, antihipertensive, antiparazitare și hepatoprotectoare. De asemenea, alicina este eficientă împotriva mai multor specii de ciuperci (Chen și colab., 2019; Huang și colab., 2017; Salama și colab., 2014; Ilić și colab., 2011; Pârvu și colab., 2011; Pârvu și colab., 2010; Josling, 2003).

Alicina reduce depunerile lipidice și are proprietăți antiinflamatoare (Marón și colab., 2020; Eilat și colab., 1995;). Lipidele în exces favorizează dezvoltarea țesutului adipos care constituie o importantă sursă de estrogeni. Există o legătură strânsă între riscul de dezvoltare a cancerului de sân și concentrațiile mari de estrogeni în circulație, astfel că numeroase femei care sunt în perioada de postmenopauză prezintă risc crescut de dezvoltare a cancerului de sân (Yue și colab., 2003).

Alicina are efecte benefice în inhibarea proliferării neuroblastomei la șoareci, iar administrarea în combinație cu ciclofosamidă se transpune într-o eficiență crescută a tratamentului convențional; de asemenea, s-a observat o îmbunătățire a subseturilor de celule T și o intensificare a imunității (Gao și colab., 2015). Alicina prezintă efect antitumoral împotriva diverselor tipuri de celule tumorale, precum cele de colon și plămân (Țigu și colab., 2020).

3. Tipuri de cancer

Cancerul reprezintă o creștere necontrolată a celulelor, proces care implică activarea unor oncogene sau inhibarea unor gene supresoare de tumori. În stadiile avansate, celulele

tumorale au abilitatea de a metastaza datorită pierderii adeziunii celulare cu substratul sau a adeziunii dintre celule (Vogelstein și Kinzler, 2004).

Efectul factorilor epigenetici este determinant în dezvoltarea celulelor tumorale. Modificările epigenetice pot induce caracteristici pro-canceroase celulelor netumorale, prin dereglarea funcției anumitor gene specifice și prin modularea proceselor ce determină ciclul celular sau inițierea apoptozei (Sarkar și colab., 2013; Sarkar și colab., 2013; Gal-Yam și colab., 2008).

Cele mai frecvent întâlnite tipuri de cancer sunt cancerul de sân, colorectal și de plămân, acestea având o incidență foarte mare la nivel mondial și fiind responsabile de numeroase decese, atât la bărbați, cât și în rândul femeilor (cazul cancerului de sân) (Siegel și colab., 2019).

3.1. Cancer de sân

Conform statisticilor, în 2018, în Statele Unite ale Americii s-au înregistrat 268.670 noi cazuri de cancer de sân (Siegel și colab., 2018).

O posibilă cauză de dezvoltare a cancerului de sân este considerată expunerea la cantități semnificative de estrogen. Expunerea la concentrații mari de estrogen crește semnificativ riscul de dezvoltare a cancerului hepatic, de col uterin și vaginal (Henderson și colab., 1988).

Trei mecanisme au fost descrise, ca fiind posibil implicate, în manifestarea carcinogenității estrogenului: activitatea hormonală mediată de receptor (strâns legată de stimularea proliferării celulelor, care cresc șansele de acumulare a erorilor în ADN) (Adlercreutz și colab., 1994); activarea citocromului P450 (activare mediată metabolic) prin care se intensifică rata mutațiilor (Liehr și colab., 1986); imposibilitatea mecanismului de reparare a ADN de a remedia greșelile făcute în urma diviziunii și astfel anumite erori pot induce carcinogenitate estrogenului (Yan și Roy, 1995).

3.2. Cancer colorectal

Cancerul colorectal este localizat în regiunea colonului și a rectului, având ca simptome prezența sângelui în scaun, diametrul scaunului redus, pierdere în greutate și adesea senzație de oboseală constantă (Whiffin și colab., 2014).

În 2018, în Statele Unite ale Americii s-au înregistrat 97.220 noi cazuri de cancer de colon, 43.030 noi cazuri de cancer rectal și 8.580 de noi cazuri de cancer anal (Siegel și colab., 2018).

Cancerul colorectal este unul dintre cele mai frecvente tipuri de cancer, fiind al 3-lea cel mai frecvent tip de cancer la bărbați și al 2-lea la femei (Muller și colab., 2016). Majoritatea cancerelor colorectale apar sporadic, doar 20-30% sunt cu componente ereditare (Whiffin și colab., 2014).

În 2018, în Statele Unite ale Americii s-au înregistrat 97.220 noi cazuri de cancer de colon, 43.030 noi cazuri de cancer rectal și 8.580 de noi cazuri de cancer anal (Siegel și colab., 2018).

3.3. Cancer pulmonar

Plămânii sunt organul primar al sistemului respirator la om și sunt localizați de-o parte și de alta a inimii. Situați în cavitatea toracică, plămânii sunt inegali (cel drept fiind mai mare), fac parte din tractul respirator inferior care începe cu traheea, iar în plămân, se ramifică în bronhii și bronhiole, iar bronhiolele se continuă cu un duct alveolar ce se termină cu alveolele pulmonare (Figura 10) (Arakawa și colab., 2000).

Cancerul pulmonar este diferențiat în două tipuri de cancer: cancerul de celule mici pulmonare (SCLC – small-cell lung carcinoma) și cancerul de celule pulmonare ce nu sunt mici (NSCLC – non-small-cell lung carcinoma). Din punct de vedere histologic, carcinomul pulmonar poate fi clasificat în SCLC, cancer de celule squamoase, adenocarcinomă și cancer pulmonar de celule mari (Lemjabbar-Alaoui și colab., 2015; Riihimaki și colab., 2014).

Majoritatea cancerelor de plămân indică stimulări paracrine și autocrine. NSCLC și SCLC exprimă în exces receptori de Tirosin Kinaze, cu precădere EGFR (Epidermal Growth Factor Receptors – Receptori pentru factori de creștere epidermali), uneori produc chiar liganzi pentru EGFR. Astfel, în calea de semnalizare, se ajunge până la activarea transcrierii; în cele mai multe cazuri, transcrierea este supraactivată, rezultând numeroase celule ce se vor divide în continuare și vor conduce spre invazie și metastazare. În multe cazuri, se activează factorii pro-angiogenici (Imyanitov și colab., 2005).

Cancerul pulmonar este cauzat de degradarea ADN-ului, dar și de modificări epigenetice (Hammerschmidt și Wirtz, 2009). Fumatul este una dintre principalele cauze ale dezvoltării cancerului pulmonar, conținând peste 70 de carcinogeni (Hecht, 2012). De asemenea, fumatul pasiv este o cauza a apariției cancerului pulmonar la nefumători. Asbestul este un alt compus ce potențează dezvoltarea cancerului pulmonar și a numeroase alte boli pulmonare (O'Reilly și colab., 2007). Poluarea aerului și expunerea la alți factori fizici și chimici, precum radiații sau gaze toxice, alimentează riscul de dezvoltare a tumorilor

pulmonare, afectând dezvoltarea celulelor tractului respirator și pulmonare (Cogliano și colab., 2011).

Mecanismele de reparare nu mai fac față la modificările aduse în celule, astfel că se acumulează un număr mare de oncogene activate. Calea de semnalizare cea mai afectată, în cazul cancerelor de plămân, este a proteinelor G cuplate cu receptori autocrini, sistemul tumoral de represie p53 și calea RAS/RAF/MEK/MAPK (Imyanitov și colab., 2005).

4. Onicomicoză

Onicomicoza este o infecție a unghiilor caracterizată prin decolorarea, subțierea și desprinderea unghiei de patul conjunctiv (Gupta și colab., 2000). Aceasta este o infecție cu o frecvență crescută, în cazul persoanelor de peste 60 de ani. În general, onicomicoza este cauzată de dermatofite (Westerberg și Voyack, 2013). În cele mai frecvente cazuri, onicomicoza este cauzată de infecția cu dermatofite din genul *Trichophyton*. Microorganismele, precum *Candida*, cauzează infecții în special la unghiile degetelor mâinii (Thomas și colab., 2010). Infecțiile ce sunt cauzate de mucegaiuri ce nu sunt încadrate în grupul dermatofitelor sunt mai puțin întâlnite, însă au fost studii ce demonstrează că aceste infecții sunt strâns legate de imunodeficiența produsă de infecțiile virale (Surjushe și colab., 2007).

Tratamentul pentru onicomicoză necesită o combinație terapeutică care să inhibe total dezvoltarea agentului infecțios. Tratamentul variază în funcție de gradul de infecție, dar trebuie ținut cont și de istoricul pacientului, astfel încât să se evite interacțiunea cu altă medicație deja existentă (Scher și colab., 2007).

Rhodotorula mucilaginosa este o specie de drojdie care, în general, infectează gazdele imunocompromise (Ioannou și colab., 2019). În anumite situații, poate fi responsabilă de producerea onicomicozei, chiar și la pacienții fără imunodeficiențe (Ge și colab., 2019; Simon și colab., 2014; Loss și colab., 2011). *R. mucilaginosa* este rezistentă la majoritatea azolilor, uneori putând fi combătută cu ketoconazol (Ge și colab., 2019).

Meyerozyma guilliermondii cauzează, în general, infecții cutanate la oameni, fiind asociată cu onicomicoza (Guler și colab., 2017; Ghannoum și colab., 2000; Dick și colab., 1985). A fost raportată o co-infecție cu *R. mucilaginosa* și *M. guilliermondii* la o persoană în vârstă, cu istoric medical ce indică infecție cu virusul hepatitei B (Pârvu și colab., 2019).

II. Contribuție personală

1. Materiale și metode de cercetare

1.1. Sinteză și caracterizare a alicinei

Alicina a fost sintetizată și analizată conform cu metoda descrisă de Jansen și colab., 1987 (Jansen și colab, 1987; Pârvu și colab., 2019). Aceste determinări au fost realizate de către Lector Dr. Augustin Cătălin Moț, în cadrul laboratorului de Chimie - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.

1.2. Izolarea, cultivarea și identificarea moleculară a ciupercilor *Meyerozyma guilliermondii* și *Rhodotorula mucilaginosa* care produc onicomicoză

M. guilliermondii (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki și *R. mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison au fost izolate de pe unghii afectate de onicomicoză, ale unei paciente în vârstă de 88 de ani, cu hepatită HBV cronică. Probele de fungi au fost identificate după morfologie și caracteristicile coloniilor din cultură după o incubare, la 22°C, timp de trei zile. Experimentele au fost desfășurate în triplicat (Pârvu și colab., 2019). Aceste determinări au fost realizate de către Prof. Univ. Dr. Marcel Pârvu, în cadrul laboratorului de Botanică al Facultății de Biologie și Geologie, UBB Cluj-Napoca.

Acest studiu a fost aprobat de către comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, iar pacientul a fost informat și a completat formularul de consimțământ și înrolare în studiu.

Speciile *M. guilliermondii* și *R. mucilaginosa* au fost confirmate molecular ținând Internal Transcribed Spacer folosind amorsele ITS1 și ITS2 (White și colab., 1990). Analiza moleculară a fost realizată de către Dr. Cristina Mircea, în cadrul laboratorului de Biologie Moleculară al Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe.

1.3. Obținerea extractelor vegetale de *Allium*

Extractele plantelor de *Allium* au fost preparate prin repercolare, la rece, la temperatura camerei, timp de trei zile (Anonymous, 1993; Ionescu-Stoian, 1977; Pârvu și colab., 2015), utilizând fragmente mici de plante ce au fost imersate și extrase în alcool 70% (Merck, București, România). Plantele au fost colectate din Grădina Botanică "Alexandru Borza" din Cluj-Napoca.

Pentru prepararea extractului de *Allium fistulosum* s-au utilizat frunze, iar pentru prepararea extractului de *Allium sativum* s-au utilizat bulbi. Pentru fiecare specie de *Allium* folosită, în acest studiu, s-a păstrat un specimen-voucher la Herbarul Universității ”Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca, România (*Allium sativum* L. – CL666161; *Allium fistulosum* L. – CL659761). Extractul fluid obținut prin filtrare a fost preparat în raport 1:1,2 cu 30% etanol pentru *A. fistulosum* și 1:1 cu 20% etanol pentru *A. sativum*, rapoartele fiind exprimate în masă:volum (g:mL). Aceste determinări au fost realizate de către Prof. Univ. Dr. Marcel Pârvu, în cadrul laboratorului de Extracte Naturale al Facultății de Biologie și Geologie, UBB Cluj-Napoca.

1.3.1. Analiză fitochimică

Separarea compușilor a fost realizată folosind sistemul HPLC Agilent 1200 (Waldbronn, Germania) (Pârvu și colab., 2019).

Aceste determinări au fost realizate de către Lector Dr. Augustin Cătălin Moț, în cadrul laboratorului de Chimie - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.

1.3.2. Evaluarea activității antifungice

În vederea determinării efectului antifungic al extractului de *Allium sativum*, prin metoda diluție agar, celulele fungice au fost inoculate cu diferite concentrații de extract de usturoi: 2%, 4%, 6%, 8%, 10% și 12% pentru *M. guilliermondii* și s-a mai adăugat o concentrație de 14% în cazul *R. mucilaginosa*. Controlul negativ a fost fără extract. Un control cu compus antifungic pe bază de clorhidrat de naftifină (Exoderil Sandoz, 10mg/mL) a fost utilizat, la concentrații variate: 0.5%, 1%, 3%, 4% și 5% pentru *M. guilliermondii* și 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% și 3% pentru *R. mucilaginosa*.

Efectul antifungic a fost exprimat în concentrație minimă inhibitoare (MIC/CMI), unde procentul de inhibiție al creșterii miceliene (P) pentru fiecare concentrație a fost calculat folosind formula $P = (C - T) \times 100 / C$, unde C este diametrul coloniei control, iar T diametrul coloniei tratate (Pârvu și colab., 2019).

Aceste determinări au fost realizate de către Prof. Dr. Marcel Pârvu, în cadrul Laboratorului de Extracte Naturale al Facultății de Biologie și Geologie, UBB Cluj-Napoca.

1.3.3. Evaluarea efectului antioxidant

Activitatea antioxidantă *in vitro* a fost evaluată folosind testele de disociere a radicalilor DPPH și ABTS conform cu protocolul publicat în literatură (Perez și colab., 1975). Rezultatele sunt exprimate în echivalenți de quercitin, obținuți prin curba de calibrare, folosind standard de quercitin (Pârvu și colab., 2019).

Pentru evaluarea activității antioxidante *in vivo* s-au folosit șobolani masculi Albino Wistar, cu greutate între 200 și 250 g, de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, România (Andreicuț și colab., 2018).

Determinarea biomarkerilor stresului oxidativ sistemic a fost realizată prin determinarea statusului oxidativ total (TOS) din ser, prin reacție colorimetrică, iar rezultatele au fost exprimate în $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ echivalent/L. Răspunsul antioxidant total în ser (TAR) a fost determinat prin metodă colorimetrică, iar rezultatele exprimate în Trolox echivalent/L. Indexul stresului oxidativ (OSI) este un indicator al gradului de stres oxidativ și a fost reprezentat ca TOS/TAR (Pârvu și colab., 2014).

Reacția Griess a fost folosită pentru a determina sinteza oxidului nitric și rezultatele au fost exprimate în $\mu\text{mol/L}$ (Pârvu și colab., 2014). Malondialdehida (MDA) a fost măsurată folosind acid tiobarbituric. Totalul tiolilor a fost estimat folosind reactivul Ellman. Toate testele pentru determinările din ser au fost efectuate prin metode spectrofotometrice folosind Spectrofotometrul Jasco V-530 UV-Vis (Jasco International Co. Ltd, Tokyo, Japonia).

Aceste determinări au fost realizate de către Prof. Univ. Dr. Alina Elena Pârvu, în cadrul laboratorului de Fiziopatologie – UMF Cluj-Napoca.

1.4. Microscopie de scanare cu electroni

Morfologia ciupercilor *R. mucilaginosa* și *M. guilliermondii* a fost analizată pentru celulele control, folosind microscopul de scanare cu electroni (SEM) JSM 5510 LV (JEOL Co, Tokyo, Japonia). Probele au fost pregătite conform cu literatura (Moț și colab., 2017). Aceste determinări au fost realizate în cadrul laboratorului de Microscopie Electronica "Constantin Crăciun" – UBB Cluj-Napoca.

1.5. Microscopie electronică cu transmisie

Ultrastructura fungilor control și a celor tratați o ora cu MIC de extract a fost analizată folosind microscopul cu electroni în transmisie (TEM) JEOL JEM 1010.

Probele au fost pregătite conform cu literatura (Moț și colab., 2017). Aceste determinări au fost realizate în cadrul laboratorului de Microscopie Electronica "Constantin Crăciun" – UBB Cluj-Napoca.

1.6. Culturi de celule umane - tumorale și netumorale

Celulele (Tabelul 2) BJ, DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1 au fost achiziționate de la ATCC (American Type Culture Collection) prin intermediul LGC Standards GmbH, Wesel, Germany. Keratinocitele umane normale HaCaT au fost furnizate de către serviciul de linii celulare al Centrului german de cercetare a cancerului – Heidelberg, Germania. Aceste activități au desfășurate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFuture – UMF Cluj-Napoca).

1.7. Testul de viabilitate celulară

După 24h de tratament, rata de viabilitate celulară a fost măsurată folosind tehnica MTT (Bromura de 3-(4,5 dimetil tiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazoliu) la 570 nm (Sigma-Aldrich, St. Louis, SUA). Plăcile au fost citite folosind spectrofotometrul TECAN SPARK 10M (TECAN, Austria GmbH, Grodig, Austria).

Folosind același protocol, s-a evaluat efectul antiproliferativ al alicinei, 5-FU (5-Fluorouracil) și al combinațiilor terapeutice prin metoda MTT (Țigu și colab., 2020). Aceste activități au fost desfășurate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFuture – UMF Cluj-Napoca.

1.8. Microscopie confocală de fluorescență

După 24h de expunere la jumătate din IC_{50} și la combinația dintre acestea, modificările morfologice au fost urmărite folosind metoda de colorație triplă dezvoltată în laboratorul de terapii celulare al MedFuture, UMF Cluj-Napoca și publicată într-o lucrare anterioară (Budisan et al., 2019). Imaginile au fost procesate cu softul ImageJ (Țigu și colab., 2020). Aceste activități au fost desfășurate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFuture – UMF Cluj-Napoca.

1.9. Determinări biochimice: LDH, CAT și Casp3

Celulele au fost incubate în placi cu 12 godeuri, la o concentrație de 100000 celule per godeu, la un volum final de 2000 μ L. După 24h de incubare, celulele au fost tratate cu trei

concentrații diferite de extract: 10%, doză de IC₅₀ și doză sub IC₅₀. Supernatantul a fost colectat după 24h de incubare cu extracte, iar prin îngheț/dezgeț s-a obținut omogenatul celular. Lactat dehidrogenaza (LDH) și Catalaza (CAT) au fost determinate din supernatant celular, pentru a verifica nivelul acestora în mediul de cultură. Activitatea LDH a fost măsurată la 340 nm folosind LDH Activity Kit pentru studii in-vitro (Biomaxima, Lublin, Polonia), iar probele au fost analizate la spectrofotometrul 2000 Evolution (Biochemical Systems International, Italia). Activitatea catalazei a fost determinată la 240 nm folosind spectrofotometrul UV-Vis VWR UV-1600PC (Vives-Bauza și colab., 2007). Caspaza 3 (Casp3) a fost determinată folosind supernatantul, utilizând kitul pentru Caspaza 3 activată (Invitrogen), iar placa a fost citită folosind spectrofotometrul TECAN SPARK10M (TECAN, Austria GmbH, Grodig), respectând protocolul din kitul de analiză. Aceste activități au fost desfășurate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFuture – UMF Cluj-Napoca și în cadrul Institutului de Cercetări Biologice Cluj-Napoca.

1.10. Citometrie de flux pentru evaluarea morții celulare

Pentru investigarea morții celulare, de tipul apoptozei sau necrozei, după 24h de tratament, s-a aplicat tehnica de detectare a morții celulare prin citometrie de flux (Țigu și colab., 2020). Aceste determinări au fost realizate de către Dr. Ancuța Jurj, în cadrul centrului de Genomică – UMF Cluj-Napoca.

1.11. Testul de migrare (Wound healing assay)

Celulele de cancer colorectal și cancer pulmonar au fost cultivate, în plăci de 96 godeuri cu fund plat. În fiecare godeu, au fost însămânțate 50.000 celule și incubate peste noapte. După 24h, a fost adăugat tratamentul pentru o zi, iar apoi mediul de cultură a fost schimbat, iar celulele private de ser fetal bovin (Liang și colab., 2007). Rana a fost creată utilizând un vârf de pipetă și monitorizată până rana din proba control a fost complet închisă. Imaginile au fost procesate folosind softul ImageJ (Țigu și colab., 2020). Aceste activități au fost desfășurate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFuture – UMF Cluj-Napoca.

1.12. Testul de formare a coloniilor

Pentru fiecare tratament și control, la ambele linii celulare folosite, s-au însămânțat 500 de celule per godeu, în plăci de 6 godeuri. După 24h de tratament, mediul de cultură a fost schimbat, iar celulele au fost analizate pentru o perioadă de două săptămâni, în vederea

obținerii de colonii. După două săptămâni, celulele au fost fixate cu metanol pur proaspăt scos de la congelator și colorate cu cristale violet dizolvate în metanol. Reactivii au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich, St. Louis, SUA) (Țigu și colab., 2020; Rafehi și colab., 2011). Aceste activități au fost desfășurate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFuture – UMF Cluj-Napoca.

1.13. Western blot

Celulele au fost resuspendate în Trizol, iar fracțiunea proteică a fost utilizată pentru determinările ulterioare. (Țigu și colab., 2020). Aceste activități au fost desfășurate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFuture – UMF Cluj-Napoca.

1.14. Animale și etica cercetării

Experimentele cu model animal au fost derulate la Facultatea de Medicină de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca și la Facultatea de Medicină Veterinară de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca. 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).

Animalele au fost cumpărate de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, șobolani albi din rasa Wistar, femele adulte cu greutate cuprinsă între 150-180 g, generația F1. Acestea au fost găzduite în condiții zooigienice, ciclul lumină-întuneric 12/12 h, la 20°C, ferite de zgomote. Animalele au fost manipulate cu grijă și în liniște. S-a asigurat accesul la apă și mâncare standard, *ad libitum*, dieta standard fiind formată din granule speciale pentru rozătoare, obținute de la Institutul Cantacuzino, București (Farcaș et al., 2019; Toma et al., 2017; Pârvu et al., 2014; Roman și Puică, 2013).

2. Rezultate și discuții

2.1. Alicină: potențial antitumoral

2.1.1. Efect antiproliferativ al alicinei și 5-FU asupra unor linii celulare de cancer pulmonar și colorectal

În acest studiu, a fost utilizat ca adjuvant alicina, compus sulfuric sintetizat *in house*, în combinație cu 5-FU. Compușii naturali interacționează cu diferite mecanisme moleculare; în funcție de natura patologiei, unii compuși naturali reduc degradările ADN, stresul oxidativ, inhibă proliferarea sau reduc alterările genetice, fiind folosite ca agenți antitumorali (Moosavi și colab., 2018; Nabavi și colab., 2018; Braicu și colab., 2017; Budisan și colab., 2017; Rajput și Mandal, 2012). Alicina este un compus natural, cu potențial de agent adjuvant, cu numeroase efecte biologice demonstrate și intens studiate, în ultimii zeci de ani; efectele antioxidant, anti-inflamator, imunostimulator sau antifungic au prezentat interes pentru numeroase grupuri de cercetare (Pârvu și colab., 2019; Toma și colab., 2019). Consumul de alicină, prin adăugarea usturoiului în alimentație, reduce semnificativ riscul de dezvoltare a inflamațiilor cronice, de creștere a stresului oxidativ și de distrugere a ADN-ului (Padiya și colab., 2014; Schafer și Kaschula, 2014; Dhawan și Jain, 2005).

Scopul acestui studiu este de a evidenția efectul sinergistic al combinației terapeutice dintre 5-FU și alicină împotriva cancerului de plămân și colorectal. Prin reducerea dozei de 5-FU și înlocuire cu alicină sunt vizate rezultate similare sau mai bune decât terapia convențională (cu 5-FU).

2.1.1.1. Teste de viabilitate celulară – efect antiproliferativ al alicinei și 5-FU

A fost evaluat efectul inhibitor, pentru diferite concentrații de 5-FU și alicină, analizând viabilitatea celulelor de fibroblast normal (BJ), adenocarcinom colorectal (DLD-1) și adenocarcinom squamos de plămân (SK-MES-1), după 24h de tratament, prin metoda MTT (Figura 11). După 24h de tratament cu 5-FU, toate cele trei linii au prezentat un IC_{50} similar, 195.5 μ M pentru BJ, 214.3 μ M pentru DLD-1 și 202.2 μ M pentru SK-MES-1, ceea ce indică o acțiune nespecifică a 5-FU. Acest compus este incapabil să deosebească celulele tumorale de celulele normale; acesta este un aspect general pentru compuși citostatici. În urma expunerii la alicină, pentru 24h, linia SK-MES-1 a fost cea mai sensibilă cu un IC_{50} de 8.625 μ M, apoi linia BJ cu IC_{50} de 33.17 μ M, iar linia de cancer colorectal a fost cea mai rezistentă cu un IC_{50} de 53.53 μ M, evidențiind un efect diferit comparat cu 5-FU (Figura 12).

După obținerea valorilor de IC₅₀ au fost investigate efectele combinației terapeutice dintre 5-FU și alicină. Efectul antiproliferativ al combinației dintre 5-FU și alicinei la jumătate din IC₅₀ a fost semnificativ mai bun comparat cu tratamentele individuale, după cum este reprezentat în figura 13. Efectul antiproliferativ asupra celulelor de colon și plămân a fost mai pronunțat în cazul grupului tratat cu combinația de 5-FU și alicină, comparat cu 5-FU și alicina ca tratamente singulare la doza de IC₅₀.

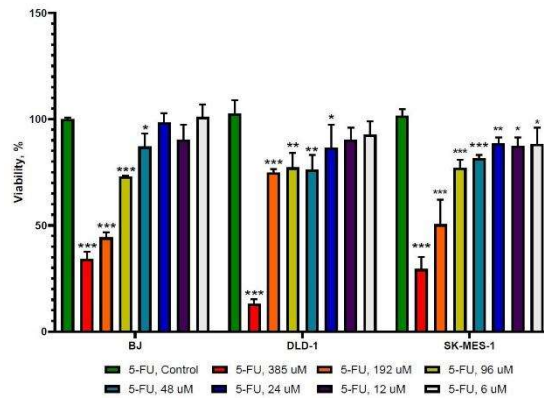


Figura 11. Analizarea viabilității celulare, după tratamentul cu 5-FU. Acesta a inhibat creșterea celulară într-un mod dozo-dependent, cu un efect similar pentru cele trei linii celulare incubate, pentru 24h cu 6, 12, 24, 48, 96, 192 și 385 μM 5-FU. Rezultatele cu $P < 0.05$ au fost considerate semnificative statistic (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ și *** $P < 0.001$) (Țigu și colab., 2020).

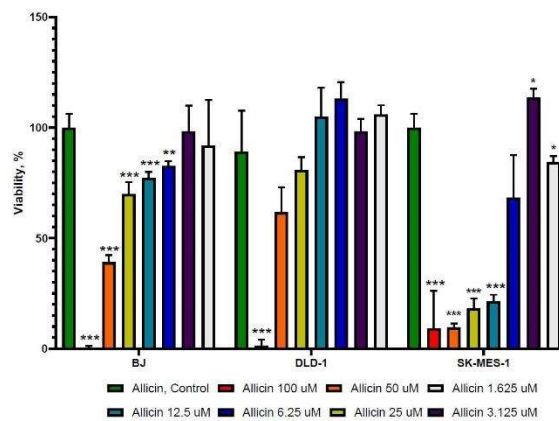


Figura 12. Analiza viabilității celulare, după expunere la 24h de tratament cu alicină. Alicina a avut efect inhibitor diferit pentru cele trei linii celulare tratate cu 1.625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 și 100 μM alicină. Rezultatele cu $P < 0.05$ au fost considerate semnificative statistic (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ și *** $P < 0.001$) (Țigu și colab., 2020).

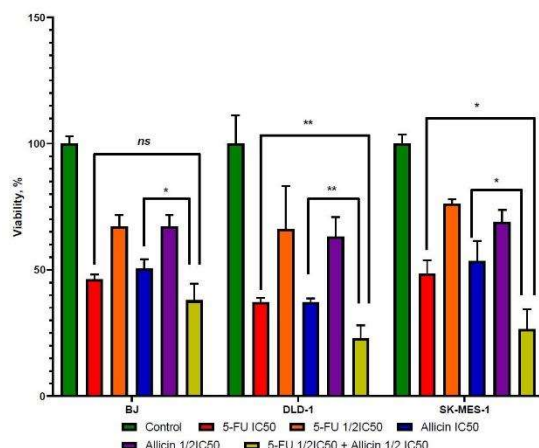


Figura 13. Investigarea viabilității celulare, pentru celulele tratate cu combinația dintre 5-FU și alicină comparat cu grupurile tratate cu tratament singular. Această comparație indică faptul că terapia combinată este mai eficientă împotriva celulelor tumorale comparat cu tratamentele individuale. NS – nesemnificativ; Control – grup netratat; 5-FU IC₅₀ – grup tratat cu 5-FU la IC₅₀; 5-FU 1/2 IC₅₀ – grup tratat cu jumătate din IC₅₀ pentru 5-FU; Allicin IC₅₀ – grup tratat cu alicină IC₅₀; Allicin 1/2 IC₅₀ – grup tratat cu jumătate de IC₅₀ pentru alicină; 5-FU 1/2 IC₅₀ + Allicin 1/2 IC₅₀ – grupul cu tratamentul combinat dintre jumătățile de IC₅₀. Rezultatele cu P < 0.05 au fost considerate semnificative statistice (*P < 0.05, **P < 0.01) (Țigu și colab., 2020).

2.1.1.2. Analiză morfologică prin microscopie confocală pentru evaluarea modificărilor morfologice determinate de tratamente

Pentru o evaluare completă a toxicității, indusă de tratamentele combinate, a fost investigată morfologia celulelor utilizând tehnica de triplă colorație dezvoltată în laboratorul de terapii celulare al MedFuture - UMF Cluj-Napoca (Țigu și colab., 2020; Budișan și colab., 2019). Rețelele mitocondriale au fost marcate cu roșu folosind ca marker Mitotracker, citoscheletul a fost marcat cu verde prin legarea phalloidinei-FITC de filamentele de actină, iar nucleul a fost marcat cu albastru folosind DAPI de 100 uM.

În figura 14 sunt prezentate modificările induse de tratamente. Co-tratamentul are efect antiproliferativ pronunțat, moartea celulară fiind indusă la toate cele trei linii celulare folosite. În cazul celulelor BJ, distrugerile celulare sunt atribuite în principal pentru 5-FU. Aceste celule au o rată de diviziune mult mai slabă, comparativ cu celulele tumorale, deoarece regenerarea celulelor a fost foarte mult afectată.

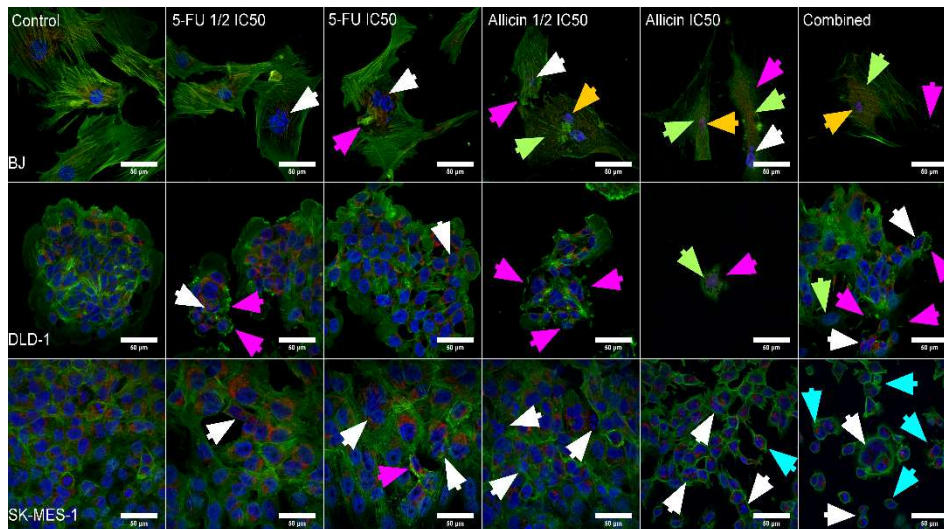


Figura 14. Investigarea modificărilor morfologice prin microscopie confocală de fluorescență. Arhitectura celulară este evidențiată folosind Mitotracker-Red (roșu – rețelele mitocondriale), phalloidină-FITC (verde – filamentele de actină) și DAPI (albastru – nucleul). Co-tratamentul prezintă efect citotoxic față de toate liniile examinate. În urma administrării combinației terapeutice, sunt reduse populațiile celulare pentru DLD-1 și SK-MES-1, în plus spațiile dintre celule sunt mărite. Forma normală a celulelor (grupul control) este schimbată, devenind ușor rotunde în cazul tratamentelor. Legendă: săgeți albe – distrugerii ale nucleului; săgeți orange – nuclear shrinkage; săgeți magenta (roz) – distrugerii ale citoscheletului; săgeți verzi – scăderea activității mitocondriale; săgeți cian (albastru deschis) – AVD; BJ – fibroblaști normali; DLD-1 – celule de cancer colorectal; SK-MES-1 – celule de cancer pulmonar; , 5-FU ½ IC₅₀ – grup tratat cu 5-FU IC₅₀, 5-FU IC₅₀ – grup tratat cu 5-FU IC₅₀, Allicin ½ IC₅₀ – grup tratat cu jumătate de IC₅₀ pentru alicină, Allicin IC₅₀ – grup tratat cu alicină la IC₅₀, Combined – grup tratat cu combinația jumătăților de IC₅₀ (Țigu și colab., 2020).

Celulele DLD-1 au prezentat o reducere a populației, în toate grupurile tratate, dar în special în grupul tratat cu alicină. La doza de IC₅₀, alicina a redus semnificativ numărul de celule, iar în cazul co-tratamentului s-au evidențiat modificări celulare ce sugerează inițierea apoptozei. Celulele tratate cu jumătate din doza de IC₅₀ au prezentat modificări celulare atribuite unui stres celular.

În cazul celulelor de cancer pulmonar, distrugerii ale nucleului au fost observate în special în grupul tratat cu alicină, iar celulele tratate cu combinația terapeutică, a celor două doze la jumătate din IC₅₀-uri, se observă o scădere a volumului celular (Apoptotic volume decrease – AVD). Acest aspect este observat doar la linia pulmonară, după co-tratament. Foarte puține celule au prezentat AVD, în cazul grupului tratat cu alicină. În cazul celulelor normale, s-a observat o scădere a activității mitocondriale, ca urmare a tratamentului cu alicină și a co-tratamentului; un aspect specific liniei normale a fost micșorarea dimensiunii nucleului (nuclear shrinkage). În cazul DLD-1, distrugerile citoscheletului au fost mai intense comparat cu SK-MES-1 și BJ, dar caracteristicile apoptozei au fost puțin vizibile.

Rezultatele obținute sunt confirmate de literatura existentă. Alicina sintetizată a inhibat migrarea și formarea coloniilor, iar în combinație cu 5-FU efectul inhibitor a fost mult mai

pronunțat. Cele mai vizibile efecte au fost modificările morfologice induse, degradarea citoscheletului și modificarea formei celulelor indicând declanșarea morții celulare. În cazul celulelor de adenocarcinom pulmonar, efectele au fost mai vizibile. Scăderea volumului celular (AVD) este un aspect specific pentru această linie celulară, nefiind observat la DLD-1. AVD a fost raportat ca semn al apoptozei (Gruhlke și colab., 2019).

De asemenea, este vizibil faptul că 5-FU și alicina, în combinație, produc modificări morfologice în mod diferit: distrugerii ale citoscheletului și distrugerii nucleare în cazul DLD-1, AVD, care indică inițierea apoptozei, în cazul SK-MES-1.

În imaginile ce reprezintă SK-MES-1, sunt observate inhibarea creșterii celulare și diviziunii celulare și spații mari între celule, în urma administrării tratamentului cu 5-FU. Tratamentul cu alicină a produs modificări ale arhitecturii celulare, iar celulele tratate au devenit sferice și au prezentat aspecte morfologice, precum AVD, ce indică inițierea apoptozei. Rezultatele indică faptul că, atât tratamentele individuale, cât și combinația terapeutică, au afectat morfologia celulelor tumorale.

2.1.1.3. Evaluarea viabilității celulare prin citometrie de flux

Pentru evaluarea ratei de apoptoză/necroză a fost folosit testul de citometrie de flux cu Annexina V/P.I. Rezultatele indică faptul că alicina și 5-FU acționează ca stimulatori ai apoptozei timpurii în cazul celulelor normale (Figura 15), în timp ce pentru DLD-1 și SK-MES-1 profilul morții celulare a fost schimbat spre apoptoză târzie și necroză (Figurile 16 și 17). Co-tratamentul a fost foarte eficient în inducerea morții celulare, în special în cazul DLD-1, în timp ce în cazul SK-MES-1, raportul dintre celule viabile și celule în moarte celulară a fost mai mare, probabil datorită incapacității de a detecta celulele SK-MES-1 care au murit înainte de a putea fi marcate, aceste aspecte sunt confirmate de analizele morfologice unde SK-MES-1 prezintă numeroase celule rotunde.

Moartea celulară poate fi indusă prin programarea celulară precum apoptoza sau autofagia sau prin necroză (Song și colab., 2015). În acest studiu, am investigat aspecte care să ne permită să identificăm tipul morții celulare induse de 5-FU și alicină; între cele două tipuri de cancer au existat diferențe. În cazul SK-MES-1, moartea celulară a fost dependentă de caspaze, fiind o moarte celulară programată prin apoptoză; aspectele morfologice și analizele de tipul Western blot au confirmat activarea Caspazei 3 și eliberarea citocromului C din mitocondrii (Figura 20 – subcapitolul dedicat analizei de Westernblot). În cazul DLD-1,

moartea celulară a fost indusă prin mecanisme independente de caspaze, fiind o moarte celulară ce nu a necesitat inițierea apoptozei.

Rezultatele obținute, în urma administrării tratamentului combinat, sugerează o stare de apoptoză târzie în cazul ambelor linii celulare, comparat cu celulele normale care s-au aflat în starea de apoptoză timpurie. Acest fapt dovedește că toxicitatea a fost indusă cu latență în cazul liniei normale, comparativ cu liniile tumorale.

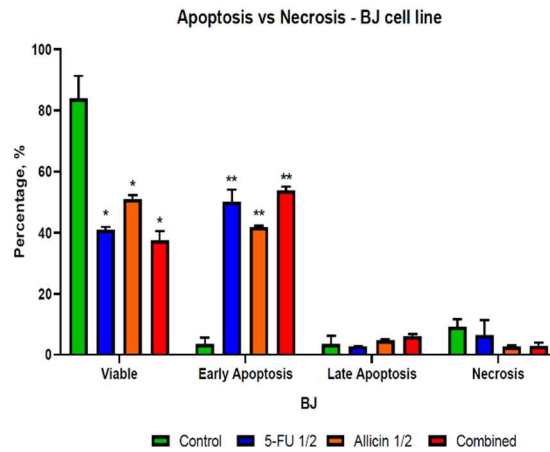


Figura 15. Prezentarea distribuției populațiilor celulare de fibroblaști, după 24h de tratament. Se observă o schimbare a profilului populațiilor în urma tratamentelor, crescând semnificativ procentele de celule aflate în apoptoză timpurie (Țigu și colab., 2020).

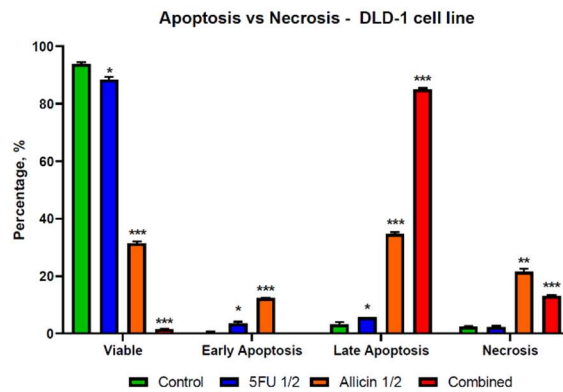


Figura 16. Prezentarea distribuției populațiilor celulare de adenocarcinom colorectal DLD-1. Se poate observa schimbarea populațiilor spre apoptoză târzie și necroză la co-tratament și tratamentul cu alicină, în timp ce 5-FU a redus foarte puțin viabilitatea celulară (Țigu și colab., 2020).

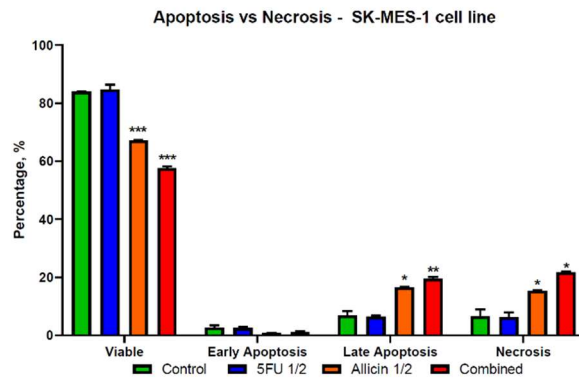


Figura 17. Prezentarea distribuției populațiilor celulare de adenocarcinom pulmonar SK-MES-1. Schimbarea populației nu este drastică, comparativ cu DLD-1, însă se observă schimbarea profilului spre apoptoză târzie și necroză, la tratamentele ce conțin alicină (Țigu și colab., 2020).

2.1.1.4. Testul de migrare (*Wound healing assay*) – inhibarea migrării celulelor tumorale

Migrarea este o caracteristică fundamentală a celulei tumorale. Inhibarea mecanismului de migrare este o țintă terapeutică, în vederea limitării dezvoltării tumorilor. A fost evaluat efectul alicinei și 5-FU asupra migrării, atât independent, cât și în combinație, iar rezultatele obținute după 24h de tratament sunt prezentate în figura 18.

În acest studiu, au fost evidențiate anumite efecte ale alicinei ca tratament singular, dar și ca adjuvant în combinația cu 5-FU. Alicina a inhibat migrarea și a stimulat inițierea morții celulare în cazul liniilor celulare tumorale de colon și plămân, similar cu datele menționate în literatură (Chu și colab., 2012; Bat-Chen și colab., 2010). Efectele benefice ale alicinei sunt atribuite grupării tiol, care are potențialul de a degrada microtubulii prin interacțiunea cu tubulin polimeraza. Prin inhibarea polimerizării tubulinei, migrarea și polarizarea celulară sunt inhibate și astfel diviziunea celulară este semnificativ redusă (Xiang și colab., 2018; Gruhlke și colab., 2016).

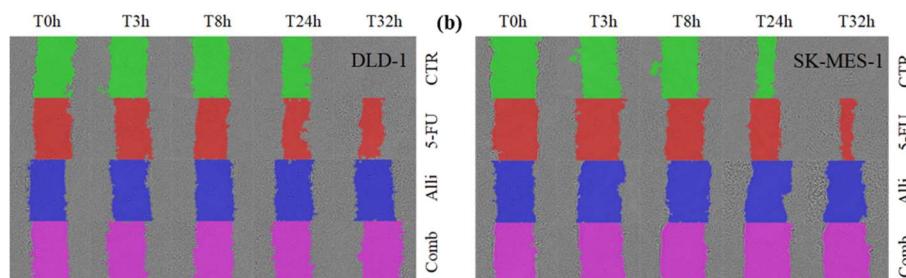


Figura 18. Investigarea migrării celulelor tumorale după 24h de tratament. (A) Celulele DLD-1 prezintă sensibilitate ridicată la alicină și combinație terapeutică, în timp ce 5-FU a avut efect limitat asupra migrării. (B) Celulele SK-MES-1 prezintă sensibilitate ridicată la alicină și co-tratament, în timp ce 5-FU nu a fost capabil să inhibe complet migrarea (Țigu și colab., 2020).

2.1.1.5. Testul de formare a coloniilor – inhibarea formării coloniilor din celule tumorale

Capacitatea de formare a coloniilor reprezintă o proprietate a celulelor tumorale de a dezvolta noi situsuri metastatice pornind de la o singură celulă, în cele mai multe cazuri celulă tumorală circulantă. Aceste colonii noi formate vor genera situsuri metastatice, la distanță față de situsul primar al tumorii, făcând dificil tratamentul. Inhibarea acestui mecanism și combaterea concomitentă a mai multor proprietăți ale celulelor tumorale (ex. migrarea, proliferarea) pot reprezenta o direcție terapeutică care să vină în ajutorul pacienților în stadiile avansate ale tumorilor.

Inhibarea formării coloniilor din celule tumorale pulmonare și colorectale a fost investigată după administrarea alicinei, 5-FU și a combinației terapeutice timp de 24h, iar rezultatele sunt prezentate în figura 19.

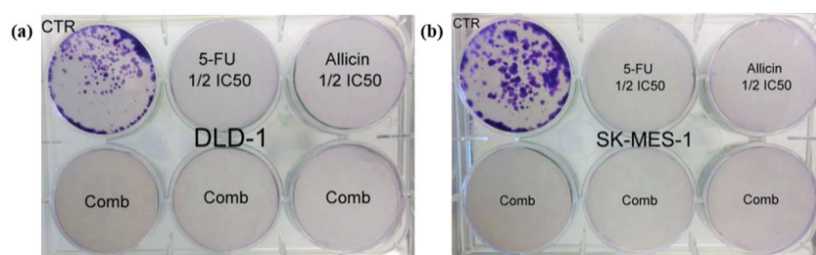


Figura 19. Investigarea formării coloniilor după 24h de tratament. (A) DLD-1; (B) SK-MES-1, inhibarea coloniilor a fost confirmată pentru toate tratamentele aplicate (Țigu și colab., 2020).

2.1.1.6. Western blot

Pentru a confirma rezultatele obținute anterior și pentru a valida moartea celulară indusă de alicină, 5-FU și de combinația terapeutică, s-a evaluat nivelul de expresie al unor proteine cheie în căile apoptotice, citocromul C (CytC) și caspaza 3 (Casp3). Astfel, CytC a fost evaluat ca indicator al inițierii apoptozei intrinseci, iar Casp3 ca efector al mecanismului de apoptoză, fiind și moleculă de legătură între calea intrinsecă și cea extrinsecă.

GAPDH a fost folosit ca normalizator, iar probele s-au prelucrat în duplicat, rezultatele fiind reprezentate în figura 20.

Apoptoza este un mecanism care poate fi activat și de stresul oxidativ și expunerea la xenobiotice (Xu și colab., 2014), dar și de agenți proapoptotici, precum citostatice sau compuși adjuvanți. Ambele căi apoptotice, cea intrinsecă și cea extrinsecă, converg în activarea caspazei 3, calea intrinsecă fiind modulată de eliberarea citocromului C (CytC). În cazul căii apoptotice

extrinseci, stimulii externi activează caspaza 8 prin receptorii morții celulare, iar apoi este activată caspaza 3, care este proteina cheie pentru efectuarea morții celulare prin apoptoză. Există și interacțiuni de tipul cross-talk între calea apoptotică intrinsecă și cea extrinsecă, precum interacțiunea dintre caspaza 8 și Bid (Fulda și colab., 2010; Bortner și Cidlowski, 2007).

Rezultatele sunt în concordanță cu alte publicații și demonstrează faptul că alicina are potențial antitumoral (Chen și colab., 2018; Lichota și Gwozdziński, 2018; Petrovic și colab., 2018) împotriva a două tipuri de celule tumorale, iar 5-FU combinat cu alicina prezintă efecte similare cu efectul sinergistic antitumoral obținut împotriva celulelor de cancer hepatic (Zou și colab., 2016).

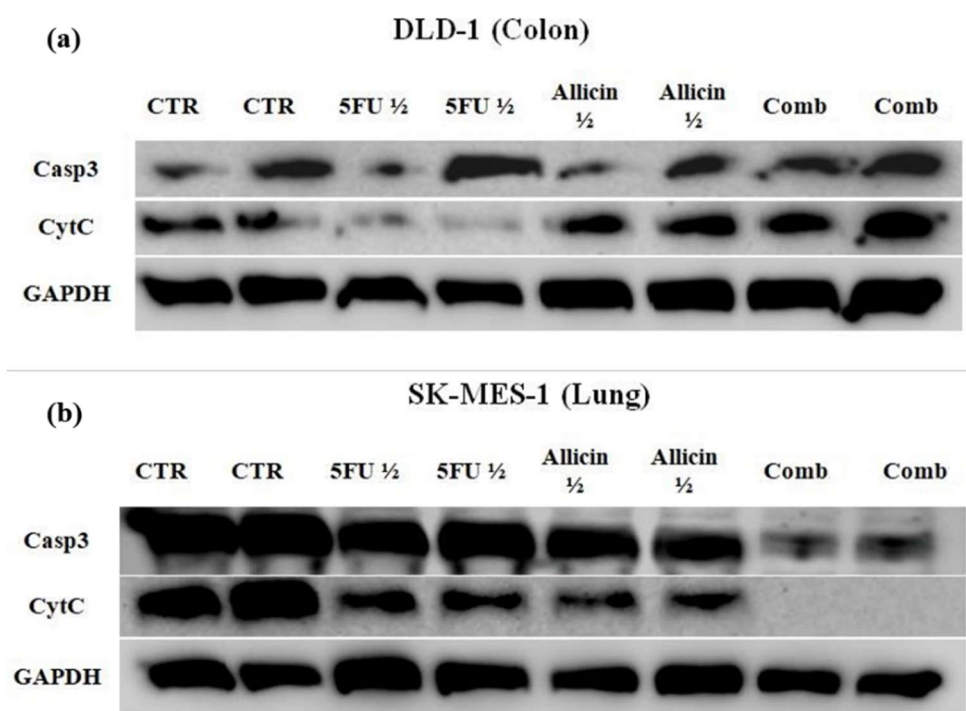


Figura 20. Analiza proteinelor prin Western blot. (a) Determinări pentru linia DLD-1, GAPDH folosit ca normalizator pentru Caspaza 3 și citocrom C. (b) Determinări pentru SK-MES-1; moleculele analizate sunt similare cu cele pentru DLD-1 (Țigu și colab., 2020).

2.2. Extract vegetal de *Allium sativum* (usturoi)

Datorita compoziției chimice, *A. sativum* este un foarte bun agent antibacterian, antifungic, antiinflamator și antitumoral (Pârvu și colab., 2019; Balea și colab., 2018; Bhandari, 2012); compușii organosulfurici din compoziția usturoiului sunt responsabili de majoritatea proprietăților biologice (Matysiak și colab., 2015).

2.2.1. Compoziție chimică

Prin utilizarea tehnicii de cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (HPLC-MS) s-au obținut date importante privind compoziția chimică a extractului hidroalcoolic de usturoi. Pentru determinarea compușilor fenolici, din extractele hidroalcoolice, a fost dezvoltată o metodă de analiză în cadrul laboratorului de chimie analitică al Facultății de Chimie și Inginerie Chimică, UBB Cluj-Napoca (Tabelul 3 și Tabelul 4).

Tabelul 3. Timpul de eluare, caracteristicile metodei analitice și determinarea concentrației de aliină și alicină în probele analizate (n=4)

Nr.	Compus	t_{elutie} (min)	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	<i>A. sativum</i> ($\mu\text{g/mL}$)*
1	Aliină	3.77	0.9999	5.8	1410±50
2	Alicină	15.40	0.9999	14.1	380±15

LOD – limita de detecție, R^2 – coeficient de determinare pentru curba de calibrare (la șase concentrații). Intervalele indicate reprezentate sub formă de medie± deviația standard ($n = 4$). *Datele despre *A. sativum* sunt publicate (Pârvu și colab., 2019).

Tabelul 4. Timpul de eluare, metoda analitică și determinarea concentrațiilor de acizi fenolici și flavonoide din extractul vegetal

Nr.	Compus	t_{elutie} (min)	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	<i>A. sativum</i> ($\mu\text{g/mL}$)*
1	Acid Gentisic	8.13	0.9997	3.4	60±5
2	Acid Chlorogenic	9.15	0.9995	4.6	65±5
3	Acid 4-hydroxybenzoic	10.31	0.9999	2.3	25±3
4	Rutin	11.39	0.9998	2.7	-
5	Isoquercitrin	11.91	0.9999	2.2	-
6	p-Coumaric	12.38	0.9999	1.9	44±4
7	Quercitrin	12.72	0.9998	2.7	-
8	Acid Ferulic	12.85	0.9999	2.0	-
9	Quercetin	16.35	0.9997	3.3	-
10	Kaempferol	19.77	0.9998	2.7	-

LOD – limita de detecție, LOQ – limita de cuantificare, R^2 – coeficient de determinare pentru curba de calibrare (la șase concentrații). Intervalele indicate reprezentate sub formă de medie± deviația standard ($n = 4$). *Datele despre *A. sativum* sunt publicate (Pârvu și colab., 2019).

2.2.2. Caracterizarea onicomicozei și confirmarea moleculară a ciupercilor

A fost analizată unghia de la un pacient cu o dublă infecție asociată, de *Meyerozyma guilliermondii* și *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 21); pentru identificarea fungilor, s-au caracterizat coloniile obținute pe SDA. Coloniile de *M. guilliermondii* prezintă aspect alb mucilaginos, iar *R. mucilaginosa* prezintă aspect mucilaginos și o culoare roșie (Figura 21B).



Figura 21. Unghiile afectate de onicomicoză (A); B. Colonii albe (de *M. guilliermondii*) și colonii roșii (de *R. mucilaginosa*) obținute din fragmente de unghie infectată și cultivate pe mediul SDA (Pârnu și colab., 2019).

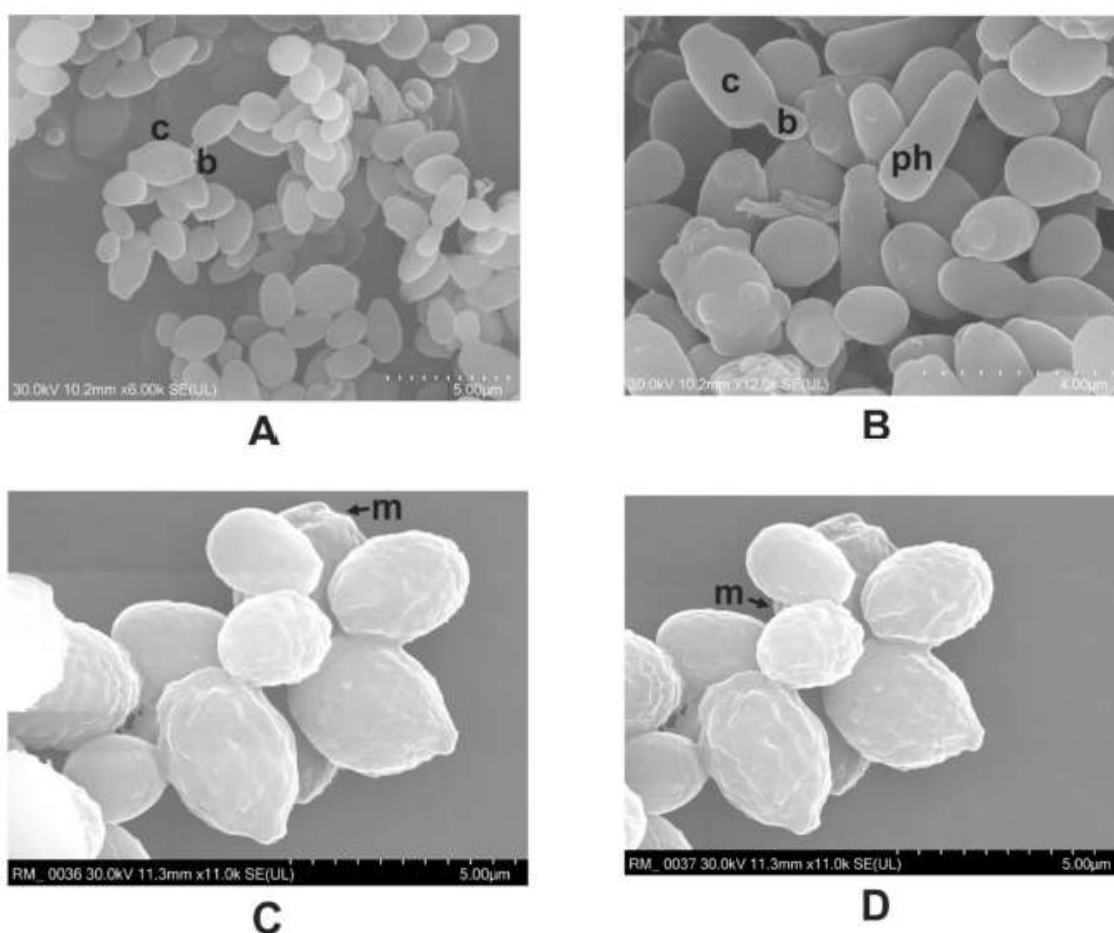


Figura 22. Microscopia de scanning cu electroni prezintă *M. guilliermondii* (A, B) și *R. mucilaginosa* (C, D). Legendă: b, mugure; c, celulă; m, mucilagiu; ph, pseudohifă (Pârnu și colab., 2019).

Caracterizarea morfologică a fost realizată cu ajutorul microscopiei de scanare cu electroni (SEM). Celulele de *M. guilliermondii* prezintă formă sferică sau sub-sferică de aproximativ 2.0-4.0 x 4.0-6.5 µm, cu ramificații și pseudohife, având aspect fin, dar și blastoconidii dense (Figura 22 A-B). Imaginile SEM pentru *R. mucilaginosa* prezintă celule

cu aspect sferic-oval cu dimensiuni de 2.5-6.5 x 6.5x14.0 μm , având pigmenți carotenoizi și fără formarea de hife, în plus este foarte vizibil mucilagiul ce învelește coloniile acestui fung (Figura 22 D).

2.2.3. Efect antifungic

A. sativum a inhibat germinarea și creșterea ciupercii *M. guilliermondii* pe mediul de agar. După trei zile de incubare, în proba control au fost prezente coloniile albe mucilaginoase de 11-12 mm, iar în probele tratate s-a observat o reducere a dimensiunii coloniilor; efectul a fost direct proporțional cu concentrația extractului de usturoi adăugat în mediu (Figura 23).

Pe SDA, cu 4% extract, coloniile au prezentat diametru de 9-10 mm, în timp ce la 8% extract, dimensiunea a fost redusă la 3-4mm. În plus, nicio colonie nu a fost identificată la 12% extract (120 mg/mL). Efectul maxim inhibitor al naftifinei hidrocilorid a fost la 55-56%, ceea ce corespunde la concentrația 5% (500 $\mu\text{g/mL}$) în cazul izolatului de *M. guilliermondii*. De asemenea, 55-56% inhibiție a fost obținută și la 3%, respectiv 4% împotriva coloniei de *M. guilliermondii* (Figura 23; Tabelul 5).

În cazul ciupercii *R. mucilaginosa*, coloniile control au avut aspect mucooid și un diametru de 12-13 mm după 72h de incubare pe agar. Coloniile au fost evidențiate prin colorația lor roșie, datorată conținutului de carotenoid. Pe mediul cu SDA, extractul de usturoi a redus diametrul coloniilor de *R. mucilaginosa*. La 4% extract, coloniile au fost reduse la 10-11 mm diametru, iar la 8% au ajuns până la 7-8 mm. Efectul inhibitor al extractului împotriva *R. mucilaginosa* a fost 22.5% în cazul de 4% și de 90% în cazul de 12% concentrație (Figura 24, Tabelul 6).

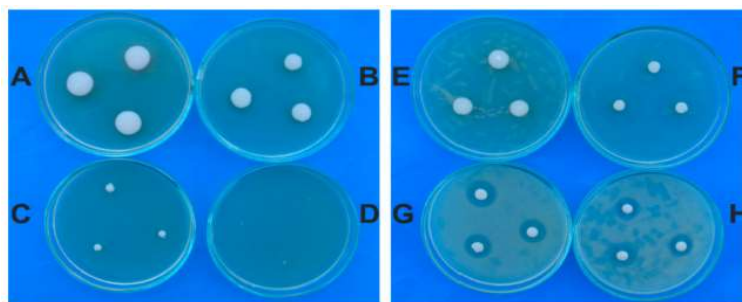


Figura 23. Colonii de *M. guilliermondii* pe SDA: (A) Control; (B) 4% extract de usturoi; (C) 8% extract de usturoi; (D) 12% extract de usturoi; (E) Naftifină 0.5%; (F) Naftifină 1%; (G) Naftifină 3%; (H) Naftifină 5% (Pârvu și colab., 2019).

Caracteristicile ultrastructurale ale celulelor control de *R. mucilaginosa* evidențiază un perete celular lamelar și electron dens, plasmalemă, reticul endoplasmic, mitocondrii, lipide și glicogen acumulate în citoplasmă, dar și un nucleu sferic-oval.

În citoplasma celulelor tinere, s-au evidențiat numeroase granule lipidice de dimensiuni mici și neuniforme, în timp ce în celulele mai bătrâne s-au evidențiat granule de dimensiuni mari, unele chiar fuzionând (Figura 26 A-D). Extractul de usturoi a provocat leziuni ireversibile în *R. mucilaginosa*, precum pierderea integrității structurale și a capacității de germinare. Moartea celulară a fost indusă prin precipitarea conținutului citoplasmatic și distrugerea organelor celulare și prin alterarea nucleului (Figura 26 E-F).

Tabelul 5. Efectul *in vitro* al extractului de *A. sativum* și naftifinei, asupra ciupercii *M. guilliermondii*, determinat prin metoda diluție agar (Pârvu și colab., 2019)

Extract de usturoi (%)	Diametrul coloniei (mm) ^a	P ^a	Soluție Naftifină (%)	Diametrul coloniei (mm) ^b	P ^b
C	11.66±0.81	0	C	11.66±0.81	0
2	11.16±0.40	4.28±0.40	0.5	10.0±0.63	14.23±0.63
4	9.66±0.51	17.15±0.51	1	8.33±0.51	28.55±0.51
6	6.66±0.51	42.88±0.51	2	6.83±0.83	41.42±0.83
8	3.50±0.54	69.98±0.54	3	5.16±0.40	55.74±0.40
10	1.33±0.51	88.59±0.51	4	5.16±0.40	55.74±0.40
12	0	100	5	5.16±0.40	55.74±0.40

^a efectul extractului de usturoi; ^b efectul naftifinei; C control (20% EtOH); P inhibiția creșterii miceliului- rezultate exprimate ca medie ± deviația standard pentru 6 experimente.

La TEM, celulele control de *M. guilliermondii* prezintă perete celular, plasmalemă, vacuole, mitocondrii și nucleu; aceste organe sunt foarte vizibile (Figura 25 A-D). Straturile distincte ale peretelui celular și adiacente cu plasmalema, sunt observate în câmp electron dens (Figura 25 C).

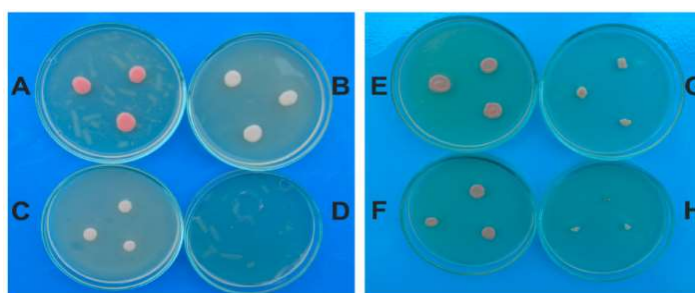


Figura 24. Colonii de *R. mucilaginosa* pe SDA: (A) 4% extract de usturoi ; (B) 6% extract de usturoi; (C) 8% extract de usturoi; (D) 10% extract de usturoi; (E) Control; (F) Naftifină 0.1%; (G) Naftifină 1.5%; (H) Naftifină 3% (Pârvu și colab., 2019).

Tabelul 6. Efectul *in vitro* al extractului de *A. sativum* și naftifinei, asupra ciupercii *R. mucilaginosa*, determinat prin metoda diluție agar (Pârvu și colab., 2019)

Extract de usturoi (%)	Diametrul coloniei (mm) ^a	P ^a	Soluție Naftifină (%)	Diametrul coloniei (mm) ^b	P ^b
C	13.33±0.51	0	C	13.33±0.51	0
2	12.16±0.75	8.77±0.75	0.1	12.83±0.40	3.75±0.40
4	10.33±0.51	22.50±0.51	0.5	10.5±0.54	21.23±0.54
6	9.0±0.63	32.48±0.63	1.0	7.83±0.40	41.26±0.40
8	7.33±0.57	45.01±0.57	1.5	6.33±0.51	52.51±0.51
10	4.0±0.63	69.99±0.63	2.0	3.66±0.81	72.54±0.81
12	1.33±0.51	90.02±0.51	2.5	1.33±0.51	90.02±0.51
14	0	100	3.0	0	100

^a efectul extractului de usturoi; ^b efectul naftifinei; C control (20% EtOH); P inhibiția creșterii miceliului- rezultate exprimate ca medie ± deviația standard pentru 6 experimente.

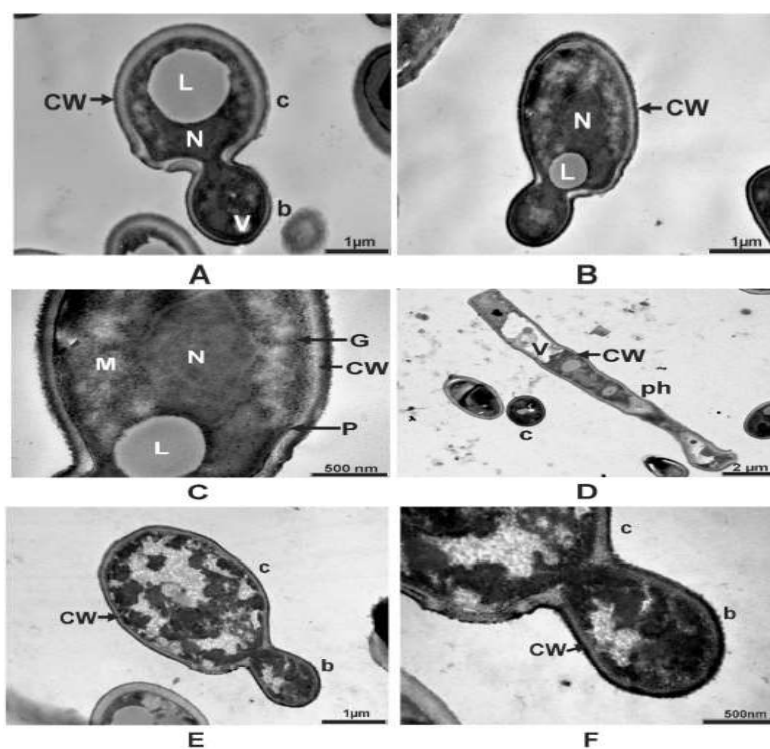


Figura 25. Modificări produse, de extractul de usturoi (12%), în ultrastructura ciupercii *M. guilliermondii*, examinată la TEM: (A-B) secțiune longitudinală printr-un mugure și o celulă; (C) detalii ale secțiunii longitudinale prin celulă; (D) secțiune longitudinală prin pseudohifă (ph) și secțiune transversală printr-o celulă; (E) modificări produse de extract: secțiune longitudinală prin celulă; (F) secțiune longitudinală prin celulă (detaliu). Legendă: b, mugure; c, celulă; CW, perete celular; G, glicogen; L, lipidă; M, mitocondrii; N, nucleu; P, plasmalemă; V, vacuolă (Pârvu și colab., 2019).

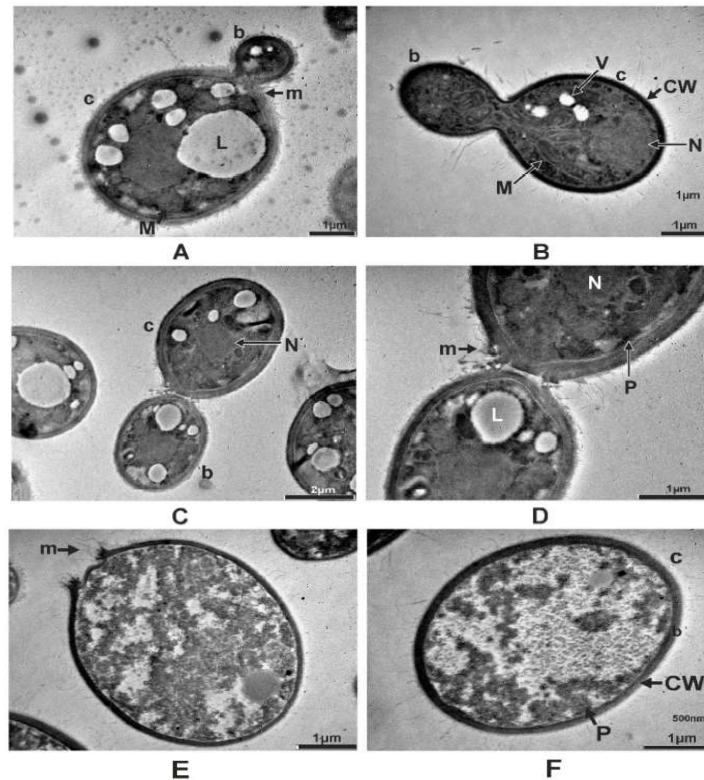


Figura 26. Modificări produse de extractul de usturoi (14%) în ultrastructura ciupercii *R. mucilaginosa* examinată la TEM: (A, B, C) secțiune longitudinală prin mugure și o celulă; (D) secțiune longitudinală prin mugure și celulă, în detaliu; secțiune longitudinală (E) și secțiune transversală prin celulă (F) cu modificări produse de extract. Legendă: b, mugure; c, celulă; CW: perete celular; ER, reticul endoplasmatic; G, glicogen; L, lipide; M, mitocondrie; m, mucilagiu; N, nucleu; P, plasmalemă; V, vacuolă (Pârnu și colab., 2019).

Modificările ultrastructurale induse de extract pot fi corelate cu ceea ce se induce în momentul administrării tratamentelor antifungice, indicând posibilitatea utilizării extractului de usturoi, ca tratament pentru fungii dermatofitici precum *Candida* (Li și colab., 2016). În general, compușii cu potențial antioxidant prezintă și capacitatea de a acționa ca agenți antimicrobieni (Esposito și colab., 2019), aceștia reducând semnificativ nivelul stresului oxidativ. Testarea *in vitro* a activității antioxidante s-a realizat prin testele ABST și DDPH. Efectul este atribuit compușilor cu sulf, care pot fi implicați în transferul electronilor, contribuind la restabilirea echilibrului redox, iar conținutul de alicină și aliină este ridicat și confirmat de analizele fitochimice.

2.2.4. Efect antioxidant

Efectul antioxidant *in vitro* al extractului de *A. sativum* a fost investigat folosind teste de albire cu acid 2,20-azino-bis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic (ABTS) și 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Activitatea antioxidantă a fost mai intensă, atunci când s-a folosit metoda de albire ABST, comparativ cu DPPH (Figura 27). Este foarte bine documentat efectul

antioxidant al usturoiului, datorită compoziției chimice bogate în substanțe cu potențial antioxidant (Shang și colab., 2019; Jang și colab., 2018; Sallam și colab., 2004).

Tratamentele cu extract au redus semnificativ TOS ($p < 0.01$) și OSI ($p < 0.01$), dar fără a modifica semnificativ TAR, pentru toate diluțiile. Alicina a avut un efect similar în ceea ce privește TOS, comparativ cu extractul, însă diclofenacul nu a avut un efect foarte intens în inhibarea inflamației (Tabelul 7).

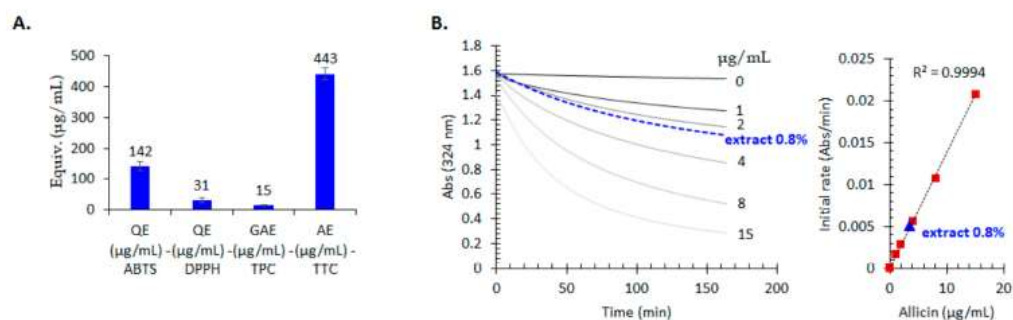


Figura 27. Evaluarea efectului antioxidant *in vitro* și determinarea conținutului total de tioli. (A) Efectul antioxidant *in vitro* evaluat prin: testele ABST și DPPH și exprimat în echivalenți de quercetin (QE); determinarea conținutului total de fenoli (TPC) cu reactivul Folin-Ciocalteu și exprimat ca echivalenți de acid gallic (GAE); conținutul total de tiosulfinați (TTC) exprimați în echivalenți de alicină (AE), $n=3$; eroarea a fost calculată funcție de deviația standard. (B) Determinarea kinetică a conținutului total de tiosulfinați ai extractului folosit de 0.8% folosind metoda descrisă de Miron și colab. (Miron et al., 2002), și standardele de alicină (0-15 µg/mL) și curba de calibrare (Pârvu și colab., 2019).

Nitriții și nitrații serici au fost semnificativ crescuți, în grupul INFL comparat cu grupul control. Variantele experimentale cu extract de usturoi 100% și 50% au contribuit la o reducere semnificativă a NOx, dar extractul de 25% a fost mai puțin eficient. Alicina a fost un bun inhibitor al sintezei de NOx, iar efectul a fost comparabil cu cel obținut după administrarea extractului la concentrațiile de 100% și 50%, dar cu un efect mult mai bun decât cel obținut în urma administrării de diclofenac (Tabelul 7). Totalul de tioli (SH) a fost diminuat în grupul INFLAM, iar tratamentele cu alicină și diclofenac au indus o creștere semnificativă a SH. Extractul de usturoi, în concentrație de 50%, a avut un efect stimulator de SH mai mic, comparativ cu extractul la concentrație de 100% și 25% (Tabelul 7).

Acest studiu prezintă, pentru prima dată, un caz clinic de onicomicoză cu unghie total distrofică, datorită unei co-infecții cu *M. guilliermondii* și *R. mucilaginosa*, indicând efectul antifungic al *A. sativum* asupra celor două specii de fungi.

Efectul antioxidant al extractului de *A. sativum* este atribuit în mare măsură alicinei, astfel că efectele antioxidante obținute au fost comparate cu alicina. Pentru confirmarea

efectului antioxidant și anti-inflamator, s-a realizat o comparație cu efectul obținut de diclofenac, un anti-inflamator nesteroidian (Pârvu și colab., 2019).

Tabelul 7. Markeri serici ai stresului oxidativ *in vivo* (Pârvu și colab., 2019)

Lot	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv/L)	TAR (mmol trolox equiv/L)	OSI	NOx ($\mu\text{mol/L}$)	MDA ($\mu\text{mol/mL}$)	SH mmol (THS/mL)
Control	38.22 \pm 4.77 a*	1.0897 \pm 0.0014 a**	35.04 \pm 4.39 a***	52.88 \pm 2.60 a***	5.82 \pm 0.56 a***	0.67 \pm 0.07 a***
Inflammation	66.35 \pm 8.49 b**, c*	1.0891 \pm 0.0009 b*, c*	60.90 \pm 7.81 b**, c**	82.42 \pm 0.27 b***, c*	7.50 \pm 0.77 b***, c*	0.50 \pm 0.08 b**, c*
Diclofenac	48.65 \pm 8.36 a**, b*	1.0970 \pm 0.0017 b*	44.47 \pm 7.59 a***, b*	58.71 \pm 5.29 a**, b*	5.75 \pm 0.80 a**, b*	0.71 \pm 0.11 a**, b*
Allicină	33.76 \pm 4.82 a**, c*	1.0884 \pm 0.0005 a*, c*	31.02 \pm 4.43 a**, c*	40.30 \pm 6.12 a***, c*	5.57 \pm 0.48 a**, c*	0.75 \pm 0.13 a**, c*
A. sativum 100%	33.13 \pm 8.06 a**, b*, c*	1.0894 \pm 0.0009 a*, b*, c*	30.43 \pm 7.39 a**, b*, c*	38.12 \pm 7.57 a***, b*, c**	5.54 \pm 0.32 a**, b*, c*	0.60 \pm 0.09 a**, b*, c*
A. sativum 50%	31.88 \pm 6.91 a**, b*, c*	1.0884 \pm 0.0009 a*, b*, c*	29.27 \pm 6.34 a**, b*, c*	38.15 \pm 8.10 a***, b*, c*	5.48 \pm 0.63 a**, b*, c*	0.81 \pm 0.29 a**, b*, c*
A. sativum 25%	32.25 \pm 3.75 a**, b*, c*	1.0884 \pm 0.0005 a*, b*, c*	29.63 \pm 3.43 a**, b*, c*	53.91 \pm 8.83 a**, b*, c*	5.79 \pm 0.51 a**, b*, c*	0.62 \pm 0.15 a**, b*, c*

Valorile sunt exprimate ca medie \pm deviația standard (SD) la un număr de 5 probe. TOS: statusul oxidativ total; TAR: reactivitatea antioxidantă totală; OSI: indexul stresului oxidativ; NOx: nitriți și nitrați; SH: tioli totali; MDA: malondialdehidă; a vs INFLAM; b vs Allicin; c vs DICLOFENAC; p<0.05; p<0.01**; p<0.001***.*

2.2.5. Efecte produse liniilor celulare netumorale BJ și HaCaT

2.2.5.1. Testul MTT

Pentru a investiga efectul extractelor de *Allium*, asupra proliferării celulelor BJ și HaCaT, a fost ales testul MTT, la 24h. Astfel, conform figurii 28, *A. sativum* a inhibat creșterea celulelor BJ și HaCaT, într-o manieră dozo-dependentă, având un indice de inhibare a creșterii celulare IC₅₀ la valoarea de 0.8841% extract, în mediul de cultură, pentru BJ (echivalentul a 8.841 mg/mL extract) și de 1.086% extract în mediul de cultură, pentru HaCaT (echivalentul a 10.86 mg/mL extract).

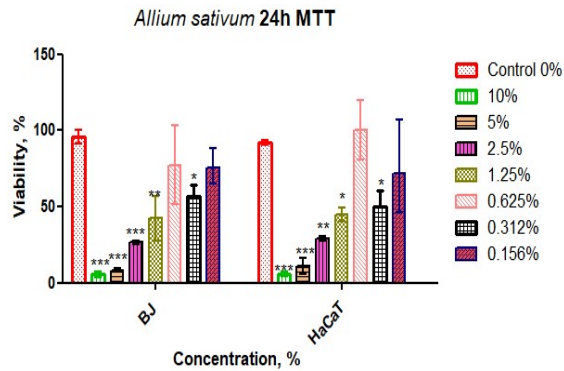


Figura 28. Efectul extractului de *A. sativum*, pe celule BJ și HaCaT, testat prin MTT (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ în urma comparației făcute cu grupul control). Probele analizate în triplicat prezintă diferențe statistice, cu efecte citotoxice pronunțate ale extractului, la concentrații mai mari de 1.25% în mediul de cultură (date nepublicate).

Compușii ce intră în contact cu celulele induc modificări în comportamentul acestora, iar modificările morfologice se fac vizibile.

Pentru a evidenția compartimentele celulare importante în procesul de apoptoză, s-au evidențiat fluorescent nucleul, mitocondriile și citoscheletul. În figura 29, se observă efectul inhibitor al extractului de usturoi (Bhandari, 2012; Matysiak și colab., 2015).

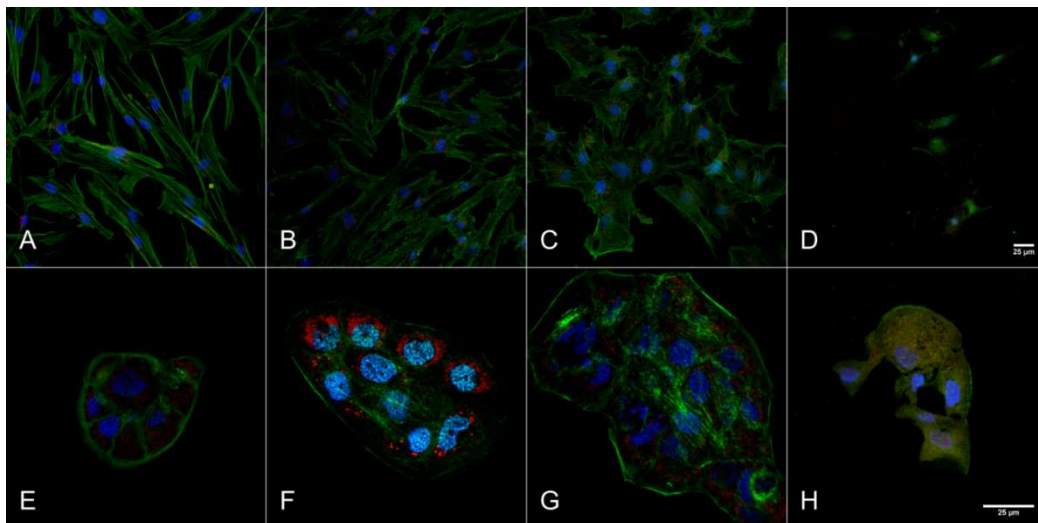


Figura 29. Ilustrarea efectului inhibitor, dozo-dependent, al extractului de usturoi asupra proliferării celulelor BJ și HaCaT, examinate cu obiectivul 40X (A- grup control, B-0.5% extract, C-doza IC₅₀, D-10% extract) și cu obiectivul 100X cu imersie (E- grup control, F-0.1% extract, G- doza IC₅₀, H-10% extract). Celulele au fost marcate cu DAPI pentru nucleu (albastru), Mitotracker pentru mitocondrii (roșu) și Phalloidin-FITC pentru citoschelet (verde). Citotoxicitatea cea mai pronunțată a fost evidențiată la lotul cu extract 10%, unde citoscheletul și nucleul pot fi observate cu greu, iar rețelele mitocondriale lipsesc. Concentrația de IC₅₀ nu prezintă efect citotoxic pronunțat, însă induce modificări morfologice, la nivelul citoscheletului. Caracteristicile morfologice și integritatea celulară nu sunt afectate, la celulele tratate cu dozele mai mici decât IC₅₀. Imaginile sugerează o inducere a morții celulare ce se finalizează într-o necroză, cu puține semne de apoptoză (date nepublicate).

Concentrația de extract de usturoi de 100 mg/mL a avut efecte inhibitoare pronunțate asupra dezvoltării celulelor, la ambele linii celulare (Figura 29D și 29H). Concentrația de aproximativ IC₅₀, pentru ambele linii celulare, celulele prezintă o morfologie schimbată, cu citoscheletul ușor afectat, dând semne de necroza (Figura 29C și 29G). La concentrație de sub IC₅₀ (Figura 29B și 29F), se observă că modificările morfologice sunt minore, comparativ cu grupurile control (Figura 29A și 29E).

2.2.5.2. Determinarea caspazei 3, catalazei și lactat dehidrogenazei

Extractele speciilor de *Allium* pot induce apoptoza, datorită concentrațiilor ridicate în compuși cu sulf, ce cresc raportul Bax/Bcl-2 și activitatea Casp3 (Farhadi și colab., 2015). Extractul de *A. sativum* a indus o creștere a Casp3 (Figura 30), însă nu suficient de mare, încât să fie determinantă pentru a afirma că celulele sunt în apoptoză.

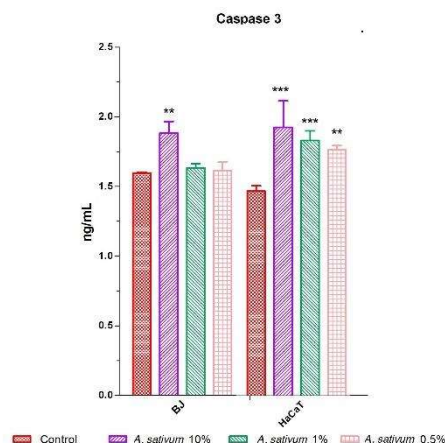


Figura 30. Evaluarea efectului extractului de usturoi asupra activității caspazei 3, la linii celulare BJ și HaCaT. Doza de 10% extract, în mediul de cultură, a produs o intensificare a activității caspazei 3 în cazul ambelor linii celulare, în timp ce dozele de 1% și 0.5% au intensificat activitatea caspazei 3, doar în cazul liniei HaCaT (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparativ cu grupul control). Rezultatele sunt exprimate prin medie \pm SD, iar semnificația statistică a fost determinată folosind testul T student (date nepublicate).

Pentru confirmarea morții celulare, fie apoptoză, fie necroză, investigarea Casp 3 este esențială, este molecula cheie în acționarea mecanismului de apoptoză, fiind elementul comun între calea apoptozei intrinseci și a celei extrinseci. Literatura sugerează faptul că alicina, compusul activ al extractelor de *Allium*, activează Caspaza 3 și induce apoptoză (Blazquez et al., 2006; Park et al., 2005). În plus, pentru investigarea necrozei, analizarea activității LDH poate evidenția o degradare membranară, caracteristică principală pentru acest tip de moarte celulară (Szychowski și colab., 2018; Chan și colab., 2013).

Catalaza (CAT) este o enzimă importantă, implicată în mecanismul celular de protecție împotriva stresului oxidativ. CAT contribuie la disocierea apei oxigenate în apă și oxigen molecular (Nandi și colab., 2019; Chelikani și colab., 2004). O activitate intensificată a CAT sugerează un stres oxidativ în celule.

Mecanismul prin care a fost indusă necroza este dificil de determinat, însă, aspectele morfologice sugerează un stres celular, posibil stres oxidativ, deși extractul este bogat în compuși antioxidanți, iar concentrația relativ mare poate avea efectul opus (Syntichaki și Tavernarakis, 2002). Astfel că, investigarea activității catalazei este binevenită, aceasta fiind enzima cheie implicată în mecanismul celular de protecție împotriva stresului oxidativ, disociind apă oxigenată (Chelikani și colab., 2004).

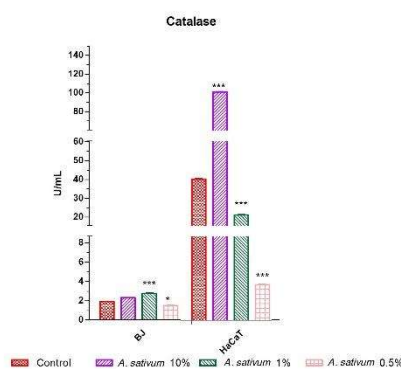


Figura 31. Evaluarea modulării activității catalazei (CAT), în urma administrării extractului de usturoi, în diferite doze, la linii celulare netumorale (BJ și HaCaT). Intensificarea activității catalazei, în cazul liniei celulare BJ, a fost observată după administrarea extractului de usturoi la doza de IC₅₀. În cazul liniei HaCaT, activitatea CAT a fost intensificată doar la adăugarea extractului în concentrație de 10%, iar la doze mici a fost redusă semnificativ comparativ cu controlul. Astfel, se observă efectul dual al extractelor în funcție de doza administrată. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparativ cu grupul control. Rezultatele sunt exprimate prin medie \pm SD, iar semnificația statistică a fost determinată folosind testul T student (date nepublicate).

Investigarea necrozei și a apoptozei necesită confirmare, astfel că, determinările prin testul cu Annexina V și P.I. prin citometrie de flux, sunt metoda standard de confirmare a morții celulare și sunt utilizate frecvent, pentru astfel de studii (Țigu și colab., 2020; Budișan și colab., 2019; Koç și colab., 2018).

Prin comparație cu 5% DMSO, care reprezintă controlul pozitiv pentru necroză, s-a validat faptul că necroza este indusă dozo-dependent în cazul liniilor celulare normale.

Pentru a putea să tragem o concluzie, despre efectul extractelor asupra celulelor BJ și HaCaT, determinarea activității LDH din citoplasma celulelor tratate ne oferă informații prețioase despre integritatea membranelor (Figura 32).

O activitate crescută a LDH indică distrugerea membranelor și o posibilă necroză (Szychowski și colab., 2018; Faloppi și colab., 2015; Chan și colab., 2013). Activitatea LDH a fost intensificată (Figura 32), în urma administrării extractului de usturoi, în diferite concentrații, comparativ cu grupul control, în cazul ambelor linii celulare (BJ, HaCaT).

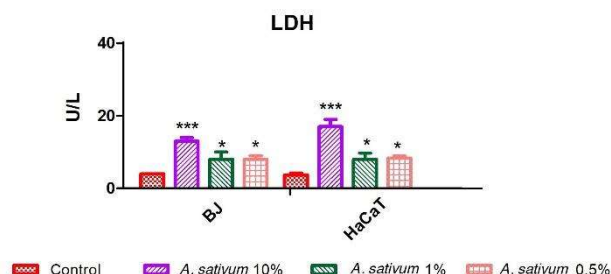


Figura 32. Evaluarea activității LDH, la linii celulare (BJ, HaCaT), în urma administrării extractului de usturoi. Activitatea LDH a fost intensificată, în urma administrării celor trei doze (10%; 1%; 0.5%) de extract de usturoi, în cazul ambelor linii celulare analizate (BJ, HaCaT). Intensificarea activității LDH este pronunțată semnificativ, la concentrația de 10%, comparativ cu dozele de 1% și 0.5% extract. Astfel, se observă efectul dual al extractelor, în funcție de doza administrată; activitatea LDH indică degradări membranare (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparativ cu grupul control). Rezultatele exprimate sunt medie \pm SD, iar semnificația statistică a fost determinată folosind testul T student (date nepublicate).

2.2.5.3. Determinarea viabilității celulare

Testul pentru determinarea tipului de moarte celulară, cu Annexină V și P.I., este metoda universal utilizată. Prin acest test se determină procentul de celule viabile, necrotice și apoptotice, din fiecare probă analizată la citometrul de flux. În cazul de față, toate datele obținute prin tehnicile de microscopie, testele de viabilitate și analizele biochimice sunt validate de rezultatele obținute la acest test, la 24h, cu tratament (Figura 33).

Celulele HaCaT prezintă o viabilitate de 95%, la grupul control, cu doar 5% necrotice, în timp ce controlul pozitiv tratat cu DMSO 5%, prezintă o viabilitate de 88.6%, cu 10,8% necroză, și 0.6% apoptoză. DMSO este folosit ca indicator al necrozei, deoarece toate datele anterioare ne sugerează că celulele BJ și HaCaT sunt afectate de necroză. Necroza a fost indusă, într-un mod dependent de doză, la celulele HaCaT; la 5% extract de usturoi sunt 6.1% celule necrotice și 93.9% viabile (Figura 33).

La fel ca orice alt tratament, la o anumită concentrație, acesta devine citotoxic, pentru celulele din experiment. Extractele de *Allium*, în special cel de usturoi, sunt studiate intens pentru a determina proprietățile lor biologice, precum activitatea antioxidantă (Maldonado și colab., 2003; Razo-Rodriguez et al., 2008), activitatea antiinflamatoare (Lee și colab., 2012),

potențialul antitumoral (Wang și colab., 2012), efectul antibacterian (Lu și colab., 2011), dar și alte potențiale efecte benefice, datorate compoziției chimice.

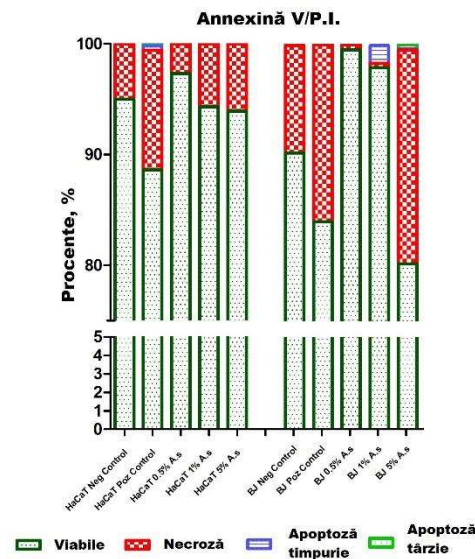
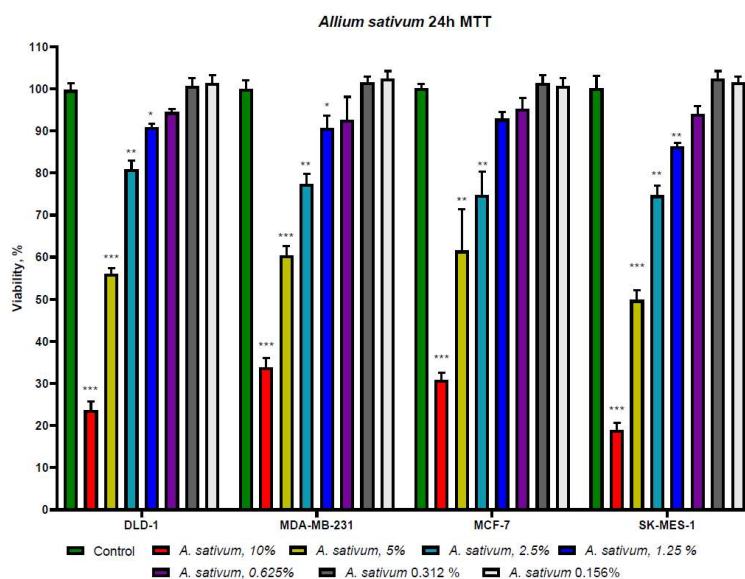


Figura 33. Determinarea raportului apoptoză/necroză, prin citometrie de flux, utilizând Annexina V și P.I. (I.P), pe linii BJ și HaCaT, tratate cu extract (5%; 1%; 0,5%) de *A. sativum*. Controlul negativ nu a fost tratat, iar controlul pozitiv este tratat cu 5% DMSO, pentru a valida indicatorul de necroză (date nepublicate).

2.2.6. Potențial antitumoral

Pentru evaluarea potențialului antitumoral, extractul de *A. sativum* a fost testat asupra a patru linii celulare (Tabelul 2) tumorale (DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1), la concentrații similare (de la 10% până la 0.156%, în mediul de cultură), cu cele utilizate pentru investigarea proliferării celulelor normale (Figura 34).

Valorile obținute, pentru doza de IC_{50} , sunt foarte mari, fiind echivalente cu peste 1 mg/mL. Acest aspect nu ne permite să evaluăm un posibil potențial antitumoral al acestui extract, deoarece doza este foarte mare. O posibilă explicație, pentru acest aspect, poate fi conținutul ridicat de nutrienți prezent în acest extract, ceea ce favorizează dezvoltarea celulelor normale, dar și a celor tumorale.



	DLD-1	MDA-MB-231	MCF-7	SK-MES-1
IC50	5.482	6.375	6.131	4.651

Figura 34. Efectul extractului de *A. sativum*, pe celule tumorale DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1, determinat prin testul MTT (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, în urma comparației făcute cu grupul control, folosind testul T student). Probele analizate, în triplicat, prezintă diferențe statistice, cu efecte citotoxice pronunțate ale extractului, la concentrații mai mari de 1.25%, în mediul de cultură. Efectul cel mai pronunțat este la concentrație de 10% extract, în mediul de cultură, echivalent cu aproximativ 100 mg extract/mL. Valorile de IC50 sunt relativ apropiate, în jurul valorii de 5% extract, în mediul de cultură, echivalent cu aproximativ 50 mg/mL extract (date nepublicate).

Usturoiul este asociat cu diferite efecte profilactice și este utilizat ca plantă medicinală; efectul antitumoral a fost investigat în ultimele decenii. În anul 1990, în SUA, a fost inițiat un program național de investigare a prevenției cancerului prin studierea diverselor alimente ce pot avea efect antitumoral (Dahanukar și Thatte, 1997); usturoiul este printre cele mai potente alimente ce pot avea efect antitumoral, prin activarea mecanismelor de prevenție a dezvoltării necontrolate a celulelor tumorale (Bayan și colab., 2014). Extractul de usturoi a redus proliferarea liniilor celulare tumorale, folosite în experimente, precum HeLa (cancer de col uterin), 5637 și J83 (cancer de vezică urinară) (Li și colab., 2018), SCG-15 (celule squamoase tumorale) (Szychowski și colab., 2018) sau a contribuit la blocarea celulelor MCF-7 (cancer de sân) și HepH2 (cancer hepatic) în anumite stadii ale ciclului celular (Shaban și colab., 2018).

2.3. Extract vegetal de *Allium fistulosum* (ceapă galeză)

2.3.1. Compoziție chimică

Similar cu investigarea compoziției chimice pentru extractul de *A. sativum*, extractul de *A. fistulosum* a fost analizat în ceea ce privește fitoconstituenții pe care-i conține. Din extractul

de ceapă galeză au fost preparate și analizate patru replicate, iar rezultatele s-au exprimat în $\mu\text{g/mL}$. Extractul de ceapă galeză conține 145 $\mu\text{g/mL}$ aliină și 20 $\mu\text{g/mL}$ alicină (Tabelul 8).

A. fistulosum este bogat în isoquercitrină, acid ferulic și rutin, iar extractul de *A. sativum* conține cantități mari de acid clorogenic, acid p-cumaric și acid 4-hidroxi benzoic (Tabelul 4). Interesant este faptul că toți compușii identificați (acizi fenolici și flavonoide), în extractul de ceapă galeză (Tabelul 9), nu se regăsesc în extractul de *A. sativum* (Tabelul 4).

Tabelul 8. Timpul de eluare, caracteristicile metodei analitice și determinarea concentrației de aliină și alicină în probele analizate (n=4)

Nr.	Compus	t_{elutie} (min)	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	<i>A. fistulosum</i> ($\mu\text{g/mL}$)
1	Aliină	3.77	0.9999	5.8	145±15
2	Alicină	15.40	0.9999	14.1	20±5

LOD – limita de detecție, R^2 – coeficient de determinare pentru curba de calibrare (la șase concentrații). Intervalele indicate reprezentate sub formă de medie± deviația standard(n = 4).

Tabelul 9. Timpul de eluare, metoda analitică și determinarea concentrațiilor de acizi fenolici și flavonoide din extractul vegetal

Nr.	Compus	t_{elutie} (min)	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	<i>A. fistulosum</i> ($\mu\text{g/mL}$)
1	Acid Gentisic	8.13	0.9997	3.4	-
2	Acid Chlorogenic	9.15	0.9995	4.6	-
3	Acid 4-hydroxybenzoic	10.31	0.9999	2.3	-
4	Rutin	11.39	0.9998	2.7	215±3
5	Isoquercitrin	11.91	0.9999	2.2	280±3
6	p-Coumaric	12.38	0.9999	1.9	-
7	Quercitrin	12.72	0.9998	2.7	95±3
8	Acid Ferulic	12.85	0.9999	2.0	230±2
9	Quercetin	16.35	0.9997	3.3	26±3
10	Kaempferol	19.77	0.9998	2.7	30±3

LOD – limita de detecție, LOQ – limita de cuantificare, R^2 – coeficient de determinare pentru curba de calibrare (la șase concentrații). Intervalele indicate reprezentate sub formă de medie± deviația standard(n = 4).

2.3.2. Efecte produse liniilor celulare netumorale BJ și HaCaT

2.3.2.1. Testul MTT

Pentru extractul de *A. fistulosum*, rezultatele au fost analizate comparativ, cu cele obținute pentru extractul de usturoi, deoarece păstrează trendul și dozo-dependența. Valorile de IC_{50} sunt diferite pentru cele două linii celulare netumorale. Pentru linia celulară BJ, IC_{50} are o valoare de 0.2433% extract în mediul de cultură, adică echivalentul a 2.019 mg/mL

extract. În ceea ce privește linia celulară HaCaT, valoarea (de IC₅₀) este de 0.6197% sau 5.144 mg/mL extract (Figura 35). *A. fistulosum* a dovedit că este un bun agent antifungic și antimicrobian, proprietăți susținute de compușii cu sulf și sterolii pe care-i conține (Vlase și colab., 2013).

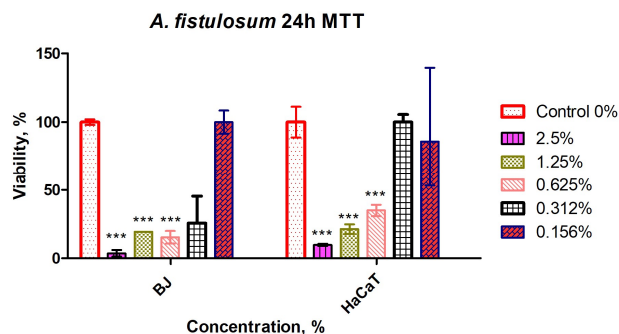


Figura 35. Efectul extractului de *A. fistulosum*, pe celule BJ și HaCaT, determinat prin testul MTT (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ în urma comparației făcute cu grupul control). Probele analizate, în triplicat, prezintă diferențe statistice, cu efecte citotoxice pronunțate ale extractului, la concentrații mari. Limitarea a fost de 2.5% extract, în mediul de cultură. La concentrații mai mari, a fost observată o toxicitate imediată asupra celulelor, cel mai probabil datorită osmolarității modificate (date nepublicate).

În figura 36, la concentrație de 83 mg/mL (Figura 36D și 36H), se observă moartea celulară indusă la ambele linii celulare din experiment (concentrație echivalentă cu 10% extract în mediul de cultură). Citoscheletul este complet distrus, rețelele mitocondriale lipsesc cu desăvârșire, iar nucleul este neclar comparativ cu lotul control (Figura 36A și 36E). Doza de IC₅₀ induce modificări la nivelul rețelelor mitocondriale la celulele HaCaT, iar la BJ citoscheletul prezintă ușoare urme de fragmentare (Figura 36C și 36G). La concentrație de 0.1% (sub IC₅₀), liniile celulare BJ și HaCaT nu prezintă semne de apoptoză sau necroză, iar morfologia este similară cu cea normală (Figura 36B și 36F).

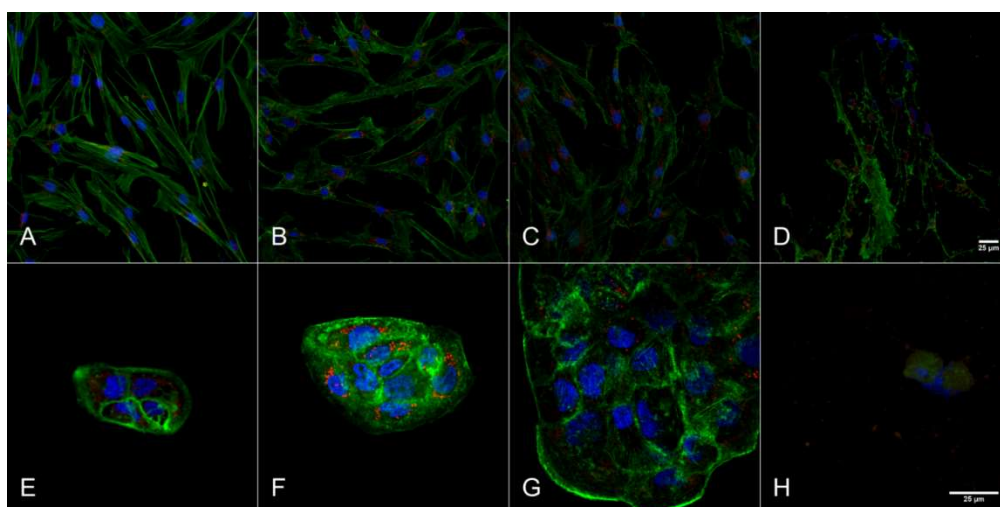


Figura 36. Ilustrarea efectului citotoxic, al extractului de *A. fistulosum*, cu obiectivul de 40X, pe celule BJ (A- grup control, B- 0.5% extract, C- doza IC₅₀, D- 10% extract) și cu obiectivul de 100X cu imersie, pe celule HaCaT (E- grup control, F- 0.1% extract, G- doza IC₅₀, H- 10% extract). Celulele au fost marcate cu DAPI pentru nucleu (albastru), Mitotracker pentru mitocondrii (roșu) și Phalloidin-FITC pentru citoschelet (verde). Citotoxicitatea cea mai pronunțată a fost evidențiată la lotul cu extract 10%, unde citoscheletul și nucleul pot fi observate cu greu, iar rețelele mitocondriale lipsesc. La doza de IC₅₀, se observă mici modificări la nivel de aspect, însă nu sunt determinante în supraviețuirea celulelor. La dozele de sub IC₅₀, celulele prezintă aspecte morfologice normale, cu rețele mitocondriale evidențiate și citoschelet integru (date nepublicate).

2.3.2.2. Determinarea caspazei 3, catalazei și lactat dehidrogenazei

Determinarea activității caspazei 3 (Casp 3), catalazei (CAT) și a lactat dehidrogenazei (LDH) ne permite să evaluăm stresul celular indus de extractul de ceapă galeză și să determinăm dacă moartea celulară a fost datorată necrozei sau apoptozei. Tipul de moarte celulară s-a confirmat prin citometrie de flux.

Caspaza 3 este molecula determinantă, pentru efectuarea procesului de apoptoză; aceasta este proteina efectoră ce facilitează legătura dintre apoptoză intrinsecă și apoptoză extrinsecă (Ponder și Boise, 2019; Végran și colab., 2011).

În timpul apoptozei intrinseci, caspaza 9 este activată, după eliberarea CytC din mitocondrii, iar mai apoi se activează caspaza 3 și se realizează procesul de apoptoză. În tot acest timp, caspaza 7 este elementul de suport, pentru menținerea procesului de apoptoză intrinsecă și stimulează desprinderea celulelor (Brentnall și colab., 2013). Pe calea apoptozei extrinseci, caspaza 8 și caspaza 10 activează executorul, iar caspaza 3 facilitează efectuarea procesului de apoptoză, datorită unor stimuli externi (Krautwald și colab., 2010).

În urma administrării extractului de *A. fistulosum*, a fost observată o intensificare a activității caspazei 3; la linia HaCaT, în urma administrării celor trei doze de extract, iar în cazul BJ doar la doza de 10%. Aceste rezultate indică o posibilă inițiere a procesului de apoptoză, în cazul ambelor linii celulare; HaCaT a fost mai afectată vizibil de acest extract (Figura 37).

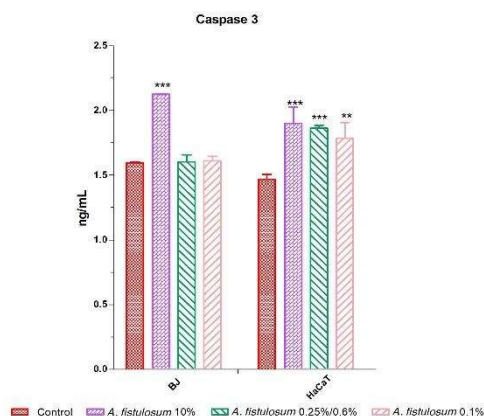


Figura 37. Evaluarea activității caspazei 3, la linia celulară BJ și HaCaT, în urma administrării extractului de *A. fistulosum*. Activarea pronunțată a caspazei 3 este vizibilă la concentrație de 10% extract, care este o doză suficient de mare pentru a induce moartea celulară, în timp ce dozele de IC₅₀ (0.25% pentru BJ și 0.6% pentru HaCaT) și de 0.1% extract au intensificat activitatea caspazei doar la linia celulară HaCaT (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 comparativ cu grupul control). Rezultatele sunt exprimate prin medie ± SD, iar semnificația statistică a fost determinată folosind testul T student (date nepublicate).

Catalaza, enzimă a sistemului antioxidant, este determinantă în vederea evaluării stresului oxidativ, la nivel celular. Activitatea CAT este direct proporțională cu nivelul de apă oxigenată (Glorieux și Calderon, 2017; Alfonso-Prieto și colab., 2009).

În urma administrării extractului de ceapă galeză, în cazul liniei BJ, CAT a prezentat o activitate redusă, comparativ cu grupul control. În ceea ce privește linia celulară HaCaT, doza de 10% extract de *A. fistulosum* a intensificat activitatea CAT; în urma administrării dozei de IC₅₀ și sub IC₅₀, activitatea CAT a scăzut comparativ cu controlul (Figura 38).

Aceste rezultate indică faptul că este foarte importantă doza, pe care o alegem, în vederea realizării studiilor, deoarece concentrațiile foarte mari de extract produc dezechilibre la nivel celular și intensifică stresul oxidativ.

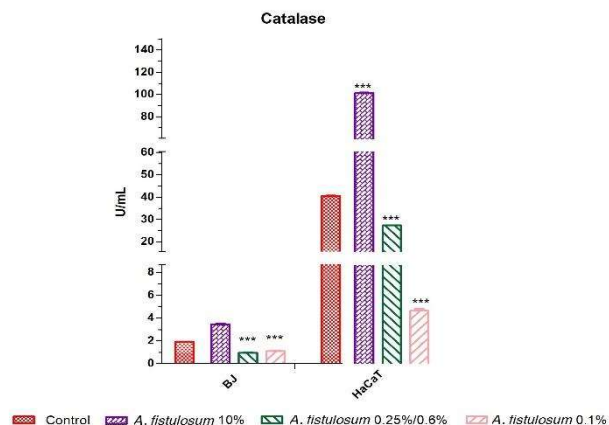


Figura 38. Evaluarea activității CAT, la linii celulare BJ și HaCaT, în urma administrării extractului de *A. fistulosum*. În cazul BJ, se observă o creștere redusă a activității CAT, în urma administrării a 10% extract, iar la linia HaCaT, creșterea activității CAT este mult mai pronunțată. În cazul ambelor linii celulare, dozele de IC₅₀ (0.25% pentru BJ și 0.6% pentru HaCaT) și sub IC₅₀ au redus activitatea CAT, comparativ cu controlul (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparativ cu grupul control). Rezultatele sunt exprimate prin medie \pm SD, iar semnificația statistică a fost determinată folosind testul T student (date nepublicate).

Deoarece imaginile de microscopie confocală evidențiază degradări ale citoscheletului, la ambele linii celulare (BJ și HaCaT), într-o manieră dozo-dependentă, evaluarea LDH ne confirmă dacă degradarea citoscheletului poate fi asociată cu degradările membranare. LDH se leagă de membrane prin legături electrostatice, dar poate să formeze și legături prin forțele hidrofobe (Dym și colab., 2000). LDH este un foarte bun indicator, pentru distrugerile membranare, deoarece este eliberată în mediul extracelular, în momentul în care membranele sunt supuse diversilor factori de stres (Kumar și colab., 2018; Specian și colab., 2016; Benson și colab., 2015; Kato și colab., 2006). În urma administrării tratamentelor cu extract de ceapă galeză, ambele linii celulare au prezentat o intensificare a activității LDH, chiar și la concentrație de 0.1%. Aceste rezultate indică faptul că, datorită compoziției chimice a extractului, membranele celulare permit eliberarea LDH, chiar și la doze foarte mici (de extract, în mediul de cultură), comparativ cu controlul (Figura 39). Deși bogat în substanțe nutritive, extractul de *A. fistulosum* poate deveni citotoxic, dacă concentrația acestor substanțe produce dezechilibre la nivel celular.

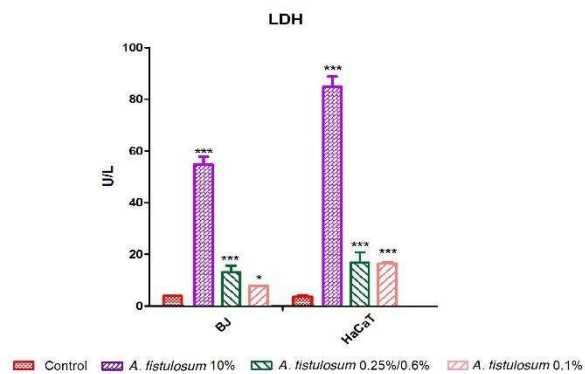


Figura 39. Evaluarea activității LDH, la linii celulare BJ și HaCaT, în urma administrării extractului de *A. fistulosum*. Activitatea LDH este semnificativ intensificată, în urma administrării a 10% extract. În cazul concentrațiilor de IC₅₀ (0.25% pentru BJ și 0.6% pentru HaCaT) și sub IC₅₀, activitatea LDH este mai puțin intensă, însă semnificativ mai accentuată comparativ cu lotul control, în cazul ambelor linii celulare (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparativ cu grupul control). Rezultatele sunt exprimate prin media \pm SD, iar semnificația statistică a fost determinată folosind testul T student (date nepublicate).

2.3.2.3. Determinarea viabilității celulare

Moartea celulară poate fi indusă prin procese programate celular sau datorită unor factori externi de natură să afecteze integritatea structurală a celulelor (Kroemer și colab., 2009). Testul de evaluare a morții celulare, prin citometrie de flux, cu Annexină V și I:P: (iodură de propidiu), este testul standard ce evidențiază raportul dintre celule viabile și cele apoptotice sau necrotice (Figura 40). Annexina V este o proteină de dimensiuni mici, dependentă de ionii de Ca²⁺ și care se leagă de fosfatidilserină. Fosfatidilserina este dispusă, la periferia celulei, în interiorul membranei citoplasmatică.

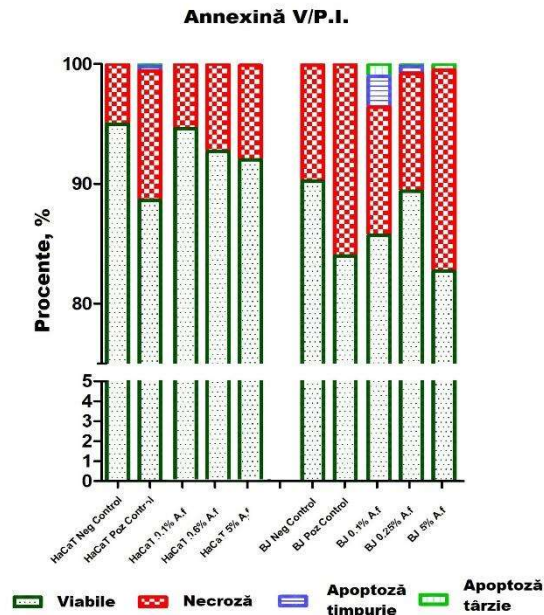


Figura 40. Determinarea raportului apoptoză/necroză, prin citometrie de flux, cu Annexina V și P.I. (I.P), la linii celulare, BJ și HaCaT, tratate cu extract de *A. fistulosum*. Controlul negativ nu a fost tratat, iar controlul pozitiv este tratat cu 5% DMSO, pentru a valida indicatorul de necroză. Concentrațiile extractelor sunt: 5% pentru ambele linii celulare; 0.25% pentru BJ; 0.6% pentru HaCaT. Extractul de *A. fistulosum* a fost adăugat în concentrație de 0.1% (date nepublicate).

Annexina V poate lega fosfatidilserină, doar atunci când membranele sunt permeabilizate sau degradate, iar resturile de fosfatidilserină sunt expuse spre exteriorul celulei (Crowley și colab., 2016). Acest aspect este caracteristic celulelor apoptotice, însă Annexina V poate lega resturile de fosfatidilserină și în cazul celulelor necrotice. Pentru a distinge necroza, se utilizează iodura de propidiu, care nu poate lega materialul genetic la celulele apoptotice, ci doar la cele necrotice (Rieger și colab., 2011; Schutte și colab., 1998).

A. fistulosum induce moartea unui procent redus de celule, chiar și la doze mici de extract; la dozele de IC_{50} și doze mai mici, aceste rezultate necesită studii suplimentare, pentru a determina, cu exactitate, doza optimă ce nu afectează celulele normale. Dozele de 5% extract, au prezentat rezultate similare cu controlul pozitiv, care reprezintă 5% Dimetilsulfoxid, adăugat în mediul de cultură, confirmând inducerea necrozei. Totuși, substanțele active din compoziția extractului, prezintă interes terapeutic, iar izolate și purificate, pot avea potențial terapeutic împotriva afecțiunilor inflamatorii și pot avea efect antioxidant (Braicu și colab., 2020).

2.3.3. Potențial antitumoral

Pentru investigarea potențialului antiproliferativ, extractul de ceapă galeză a fost testat pe linii celulare tumorale (DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1) prin testul MTT

(Figura 41). Pentru aceasta, s-au folosit aceleași concentrații, precum la evaluarea efectului antiproliferativ asupra celulelor normale (Figura 35).

Extractul de ceapă galeză prezintă o activitate antitumorală redusă, deoarece doza maximă ce a putut fi utilizată, pentru investigarea efectului antiproliferativ, a fost de 2.5% extract în mediul de cultură. Dozele mai mari au indus schimbarea pH-ului mediului de cultură, astfel că moartea celulară a fost indusă de schimbarea echilibrului acido-bazic.

Compoziția chimică a extractului de *A. fistulosum* indică concentrații mari de compuși fenolici precum rutin (0.215 mg/mL), isoquercitrin (0.280 mg/mL), acid ferulic (0.230 mg/mL), quercetin (0.026 mg/mL) și kaempferol (0.030 mg/mL). Compusul fenolic rutin prezintă potențial antitrombotic și antiinflamator (Morling și colab., 2018), iar isoquercitrin prezintă efect antiinflamator și poate fi utilizat ca agent de prevenție a tromboembolismului. De asemenea, compusul fenolic isoquercitrin poate avea și efecte antitumorale, deoarece acționează asupra mecanismului de peroxidare a lipidelor și asupra mecanismului de inhibare a inflamației (Orfali și colab., 2016). Quercetin acționează ca agent antioxidant, fiind un bun agent de îndepărtare a radicalilor liberi (Russo și colab., 2014). Kaempferolul este un produs al metabolismului plantelor, fiind utilizat în medicina alternativă, având efect antioxidant și putând juca un rol de agent chemopreventiv și chiar antitumoral (Budișan și colab., 2019; Chen și Chen, 2013).

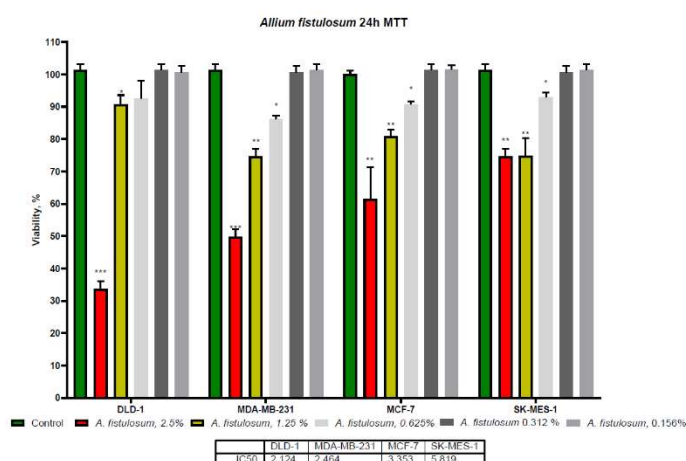


Figura 41. Efectul extractului de *A. fistulosum*, pe celule tumorale DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1, determinat prin testul MTT (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ în urma comparației făcute cu grupul control folosind testul T student). Probele analizate, în triplicat, prezintă diferențe statistice, cu efecte citotoxice pronunțate ale extractului, la concentrații mari, iar limitarea a fost de 2.5% extract în mediul de cultură. La concentrații mai mari, a fost observată o toxicitate imediată asupra celulelor, cel mai probabil datorită osmolarității modificate. Dozele de IC₅₀ sunt ușor diferite; cea mai puțin sensibilă linie celulară a fost linia pulmonară. Dozele de IC₅₀ variază de la echivalentul a 50 mg/mL extract până la aproximativ 20 mg/mL extract (date nepublicate).

3. Concluzii

Pe baza rezultatelor cercetării efectuate și a datelor din literatură, pot fi formulate concluzii cu importante aplicații terapeutice.

Alicina sintetizată în laborator are potențial antitumoral asupra liniilor celulare pulmonare (SK-MES-1) și colorectale (DLD-1), dovedit prin mai multe metode actuale de cercetare.

Efectul alicinei combinate cu 5-fluorouracil (5-FU) asupra celor două linii celulare tumorale (SK-MES-1 și DLD-1) este mai puternic (sinergistic) decât al alicinei și a fost dovedit, prin diferite rezultate experimentale: inhibarea formării coloniilor din celule tumorale; inhibarea migrării celulelor tumorale; evaluarea morții celulare prin citometrie de flux; evaluarea modificărilor celulare determinate de tratamente prin microscopie confocală; confirmarea inițierii morții celulare prin western blot.

Efectul antiproliferativ al alicinei este unul dozo-dependent, iar inducerea morții celulare poate urma fie calea necrozei, fie calea apoptozei.

În urma administrării combinației de alicină și 5-fluorouracil (5-FU) au fost evidențiate următoarele aspecte:

- 5-FU acționează nespecific, având doza citotoxică similară, atât în cazul liniilor tumorale de plămân (SK-MES-1) și de colon (DLD-1), cât și în cazul linei normale BJ;
- alicina acționează diferit, în funcție de linia celulară expusă la tratament; celulele tumorale de plămân sunt mult mai sensibile la acest tratament, comparativ cu celulele tumorale colorectale;
- administrarea combinațiilor de jumătăți de IC_{50} a produs o scădere a viabilității comparativ cu 5-FU și alicina la doza de IC_{50} ;
- schimbările morfologice induse de tratamentul combinat sunt variate, în cazul liniei DLD-1 sunt produse degradări semnificative ale citoscheletului, iar scăderea volumului celular (AVD – apoptotic volume decrease) este o caracteristică a efectului tratamentului combinat, în cazul liniei SK-MES-1;
- alicina ca tratament individual și combinația dintre alicină și 5-FU au efect inhibitor asupra migrării celulelor și asupra formării coloniilor, două caracteristici importante ale celulelor tumorale;
- moartea celulară este indusă prin mecanisme diferite. În cazul liniei tumorale colorectale, moartea celulară este non apoptotică, fără a activa caspaza 3, pe când, în cazul liniei tumorale de plămân, moartea celulară a fost indusă prin: apoptoză, eliberarea citocromului C și activarea caspazei 3.

În extractele vegetale de *Allium sativum* (usturoi) și de *Allium fistulosum* (ceapă galeză) au fost determinate cantitativ diferiți fitocompuși (alicină, aliină, acizi fenolici și flavonoide).

Extractul de ceapă galeză prezintă o cantitate redusă de aliină și alicină (de aproximativ 10 ori mai puțin decât în extractul de usturoi) și cantități semnificative de compuși fenolici, printre care isoquercitrin și rutin (peste 0.2 mg/mL).

Extractul vegetal de *A. sativum* (usturoi) a fost obținut din bulbi și a fost cercetat în ceea ce privește: efectul antioxidant; efectul antifungic; efectul citotoxic asupra celulelor normale BJ și HaCaT; potențialul antitumoral.

Efectul antioxidant al extractului de *A. sativum* a fost determinat *in vitro* și *in vivo* și este atribuit în mare măsură alicinei.

Ciupercile *Meyerozyma guilliermondii* și *Rhodotorula mucilaginosa* au fost izolate de pe o unghie cu o infecție mixtă de onicomicoză și au fost cultivate pe mediu de cultură SDA.

Pe lângă caracterele morfologice și culturale, confirmarea ciupercilor *M. guilliermondii* și *R. mucilaginosa* s-a realizat prin analiză moleculară de ADN.

Efectul *in vitro* al extractului de *A. sativum*, asupra ciupercilor *M. guilliermondii* și *R. mucilaginosa*, a fost determinat prin metoda diluție agar și a fost comparat cu produsul comercial naftifină (Exoderil).

Extractul vegetal de *A. sativum* are efect fungicid, asupra ciupercilor *M. guilliermondii* și *R. mucilaginosa*, la CMI de 12% și respectiv 14%, aspecte ilustrate prin modificările ultrastructurale ireversibile obținute în imagini la TEM (Figurile 25 și 26).

Extractul de *A. sativum* poate induce necroză la celulele umane de fibroblaști BJ și keratinocite HaCaT, dacă se administrează în concentrații mari (ex. 100 mg/mL extract de usturoi), dar nu afectează viabilitatea celulară, la doze mici;

Potențialul antitumoral al extractului de *A. sativum* a fost testat în diferite concentrații (10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,312%; 0,156%) pe celule tumorale DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1, iar rezultatele obținute confirmă că efectul antitumoral al extractului de usturoi este determinat de alicină.

Extractul de *A. fistulosum* obținut din frunze a fost cercetat cu privire la: efectul asupra liniilor celulare normale/netumorale (BJ și HaCaT) și liniilor tumorale (DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1); modularea activității caspazei 3, LDH și catalazei; raportul dintre celulele viabile și cele aflate în moarte celulară.

Extractul de *A. fistulosum* a dovedit efect inhibitor *in vitro* asupra proliferării celulelor normale BJ și HaCaT, într-o manieră dozo-dependență; cel mai pronunțat efect a fost vizibil la doze de 2.5% și 1.25% extract în mediul de cultură.

Efectul antiproliferativ al extractului de *A. fistulosum*, asupra liniilor celulelor tumorale (DLD-1, MDA-MB-231, MCF-7 și SK-MES-1), a fost apreciat prin o ușoară scădere a viabilității celulelor tumorale, la doze de 2.5% și 1.25% extract în mediul de cultură.

Potențialul citotoxic al extractelor vegetale de *Allium sativum* și *A. fistulosum* asupra liniilor celulare normale (BJ și HaCaT) a fost studiat prin: testul MTT; determinarea caspazei 3, catalazei și lactat dehidrogenazei; analiza morții celulare induse;

Efectele citotoxice au fost evidențiate, la cele două extracte de *Allium*, la doze de 10% extract în mediul de cultură; la doze de IC₅₀, s-a observat modificarea aspectelor morfologice ale celulelor BJ și HaCaT. Citoscheletul și nucleul celulelor normale au fost afectate la administrarea dozei de 10%, iar la dozele de IC₅₀ compartimentele celulare au prezentat modificări structurale reduse. Corelația cu analizele moleculare, implicate în moartea celulară, ne indică faptul că celulele au urmat calea morții celulare prin necroză. Moartea celulară declanșată în cazul celulelor normale este de tipul necrozei, deoarece este afectată integritatea membranelor și este intensificată activitatea LDH.

Efectul antioxidant al extractelor de *Allium sativum* și *A. fistulosum* este dependent de doza administrată. La doze mici (sub 1%) în mediul de cultură, activitatea CAT este normală. La doze mai mari, activitatea CAT este intensificată în cazul ambelor extracte de *Allium* și în

cazul ambelor linii celulare normale, indicând un stres oxidativ indus (de concentrația foarte mare a extractelor).

Rezultatele cercetării efectuate sunt susținute de publicațiile realizate în perioada stagiului doctoral (2016-prezent).

Lista întregă a referințelor bibliografice

1. Aala, F., Yusuf, U.K., Nulit, R., Rezaie, S. Inhibitory effect of allicin and garlic extracts on growth of cultured hyphae. *Iran J Basic Med Sci.* **2014** Mar;17(3):150-4. PMID: 24847416;
2. Abdulmir, A. S., Hafidh, R. R., Abu Bakar, F. The association of *Streptococcus bovis/galloyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J Exp Clin Cancer Res* **2011**, 30, 11.
3. Abdullah, T. H., Kandil, O., Elkadi, A., Carter, J. Garlic revisited: therapeutic for the major diseases of our times? *J Natl Med Assoc* **1988**, 80, (4), 439-45.
4. Adlercreutz, H., Gorbach, S. L. Goldin, B. R., Woods, M. N., Dwyer, J. T., Hamalainen, E. Estrogen metabolism and excretion in Oriental and Caucasian women. *J Natl Cancer Inst* **1994**, 86, (14), 1076-82.
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Programmed Cell Death (Apoptosis). In *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*, Garland Science, New York: 2002.
6. Alfonso-Prieto, M., Biamés, X., Vidossich, P., Rovira, C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc.* **2009**; 131(33):11751-11761. doi:10.1021/ja9018572
7. Al-Qattan, K. K., Alnaqeeb, M. A., Ali, M. The antihypertensive effect of garlic (*Allium sativum*) in the rat two-kidney-one-clip Goldblatt model. *J Ethnopharmacol* **1999**, 66, (2), 217-22.
8. Al-Qattan, K. K., Thomson, M., Al-Mutawa'a, S., Al-Hajeri, D., Drobiova, H., Ali, M. Nitric oxide mediates the blood-pressure lowering effect of garlic in the rat two-kidney, one-clip model of hypertension. *J Nutr* **2006**, 136, (3 Suppl), 774S-776S.
9. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **1997**, 25, (17), 3389-402.
10. Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* **2001**, 131, (3s), 955S-62S.
11. An, M., Shen, H., Cao, Y., Zhang, J., Cai, Y., Wang, R., Jiang, Y. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents* **2009**, 33, (3), 258-63.
12. Anastasiadi, Z., Lianos, G. D., Ignatiadou, E., Harissis, H. V., Mitsis, M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates in surgery* **2017**, 69, (3), 313-317.
13. Andreicuț, A.-D., Parvu, A. E., Moț, A. C., Parvu, M., Fischer-Fodor, E., Feldrihan, V., Florinela, A., Cătoi, M. C., Irimie, A. J. F. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Mahonia aquifolium* leaves and bark extracts. **2018**, 66, (1).
14. Ankri, S., Mirelman, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* **1999**, 1, (2), 125-9.
15. Anonymous, Farmacopeea Română, A. Farmacopeea Română. **1993**, 1053.
16. Arakawa, H., Niimi, H., Kurihara, Y., Nakajima, Y., Webb, W. R. Expiratory high-resolution CT: diagnostic value in diffuse lung diseases. *AJR Am J Roentgenol* **2000**, 175, (6), 1537-43.
17. Arellano Buendia, A. S., Tostado Gonzalez, M., Sanchez Reyes, O., Garcia Arroyo, F. E., Arguello Garcia, R., Tapia, E., Sanchez Lozada, L. G., Osorio Alonso, H. Immunomodulatory Effects of the Nutraceutical Garlic Derivative Allicin in the Progression of Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci* **2018**, 19, (10).
18. Arts, I. C., Hollman, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **2005**, 81, (1 Suppl), 317S-325S.
19. Asdaq, S. M., Inamdar, M. N. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Interactions of Propranolol with Garlic (*Allium sativum*) in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**, 2011, 824042.
20. Astin, M., Griffin, T., Neal, R. D., Rose, P., Hamilton, W. The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract* **2011**, 61, (586), e231-43.
21. Ataollahi, M. R., Sharifi, J., Paknahad, M. R., Paknahad, A. Breast cancer and associated factors: a review. *Journal of medicine and life*, 2015, 8(Spec Iss 4), 6-11.
22. Balea, S. S., Pârvu, A. E., Pop, N., Marin, F. Z., Pârvu, M. Polyphenolic Compounds, Antioxidant, and Cardioprotective Effects of Pomace Extracts from Feteasca Neagra Cultivar. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 2018, 8194721.
23. Bat-Chen, W., Golan, T., Peri, I., Ludmer, Z., Schwartz, B. Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2. *Nutr Cancer* **2010**, 62, (7), 947-57.
24. Bayan, L., Koulivand, P. H., Gorji, A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna journal of phytomedicine*, **2014**, 4(1), 1-14.
25. Beato, V. M., Orgaz, F., Mansilla, F., Montano, A. Changes in phenolic compounds in garlic (*Allium sativum* L.) owing to the cultivar and location of growth. *Plant Foods Hum Nutr* **2011**, 66, (3), 218-23.
26. Benson, B. A., Vercellotti, G. M., Dalmasso, A. P. IL-4 and IL-13 induce protection from complement and melittin in endothelial cells despite initial loss of cytoplasmic proteins: membrane resealing impairs quantifying cytotoxicity with the lactate dehydrogenase permeability assay. *Xenotransplantation*, **2015**, 22(4), 295-301.
27. Bhandari, P. Garlic (*Allium sativum* L.): a review of potential therapeutic applications. *Int J Green Pharm* **2012**, 6, 118-129.
28. Bhaumik, I., Pal, K., Debnath, U., Karmakar, P., Jana, K., Misra, A. K. Natural product inspired allicin analogs as novel anti-cancer agents. *Bioorganic chemistry* **2019**, 86, 259-272.
29. Bianchini, F., Vainio, H. *Allium* vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer?. *Environ Health Perspect.* **2001**, 109(9):893-902. doi:10.1289/ehp.01109893.
30. Blazquez, S., Sirvent, J. J., Olona, M., Aguilar, C., Pelegri, A., Garcia, J. F., Palacios, J. Caspase-3 and caspase-6 in ductal breast carcinoma: a descriptive study. *Histol Histopathol* **2006**, 21, (12), 1321-9.
31. Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C., Nwachukwu, I. D., Slusarenko, A. J. Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules* **2014**, 19, (8), 12591-618.
32. Bortner, C. D., Cidowski, J. A. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, 462, (2), 176-188.
33. Brace, L. D. Cardiovascular benefits of garlic (*Allium sativum* L.). *The Journal of cardiovascular nursing* **2002**, 16, (4), 33-49.

34. Bracht, K., Nicholls, A. M., Liu, Y., Bodmer, W. F. 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *Br J Cancer* **2010**, 103, (3), 340-6.
35. Braicu, C., Gulei, D., Cojocneanu, R., Raduly, L., Jurj, A., Knutsen, E., Calin, G. A., Berindan-Neagoe, I. miR-181a/b therapy in lung cancer: reality or myth? *Mol Oncol* **2019**, 13, (1), 9-25.
36. Braicu, C., Mehterov, N., Vladimirov, B., Sarafian, V., Nabavi, S. M., Atanasov, A. G., Berindan-Neagoe, I. Nutrigenomics in cancer: Revisiting the effects of natural compounds. *Semin Cancer Biol*, **2017**, 46, 84-106.
37. Braicu, C., Zanoaga, O., Zimta, A. A., Tigu, A. B., Kilpatrick, K. L., Bishayee, A., Nabavi, S. M., Berindan-Neagoe, I. Natural compounds modulate the crosstalk between apoptosis- and autophagy-regulated signaling pathways: Controlling the uncontrolled expansion of tumor cells. *Semin Cancer Biol*, **2020**, 10.1016/j.semcancer.2020.05.015.
38. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2018**, 68, (6), 394-424.
39. Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., Boise, L. H. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*, **2013**, 14, 32.
40. Brickell, C. *The Royal Horticultural Society A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. Dorling Kindersley, London: **1996**.
41. Brody, H. Colorectal cancer. *Nature* **2015**, 521, (7551), S1.
42. Budisan, L., Gulei, D., Jurj, A., Braicu, C., Zanoaga, O., Cojocneanu, R., Pop, L., Raduly, L., Barbat, A., Moldovan, A., Moldovan, C., Tigu, A. B., Ionescu, C., Atanasov, A. G., Irimie, A., Berindan-Neagoe, I. Inhibitory Effect of CAPE and Kaempferol in Colon Cancer Cell Lines-Possible Implications in New Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* **2019**, 20, (5).
43. Budisan, L., Gulei, D., Zanoaga, O. M., Irimie, A. I., Sergiu, C., Braicu, C., Gherman, C. D., Berindan-Neagoe, I. Dietary Intervention by Phytochemicals and Their Role in Modulating Coding and Non-Coding Genes in Cancer. *Int J Mol Sci* **2017**, 18, (6).
44. Canavan, C., Abrams, K.R., Mayberry, J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. **2006**; 23(8):1097-1104. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x.
45. Capasso, A. Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. *Molecules*, **2013**, 18, (1), 690-700.
46. Cebeci Guler, N., Tosun, I., Aydin, F., The identification of *Meyerozyma guilliermondii* from blood cultures and surveillance samples in a university hospital in Northeast Turkey: A ten-year survey. *J Mycol Med*, **2017**, 27, (4), 506-513.
47. Cerella C, Dicato M, Jacob C, Diederich M. Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds. *Anticancer Agents Med Chem.*, **2011**;11(3):267-271. doi:10.2174/187152011795347522.
48. Chan, F. K.-M., Moriwaki, K., De Rosa, M. J. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. In *Immune Homeostasis: Methods and Protocols*, Snow, A. L., Lenardo, M. J., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, **2013**; pp 65-70.
49. Chan, J. Y., Yuen, A. C., Chan, R. Y., Chan, S. W. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phytotherapy research : PTR* **2013**, 27, (5), 637-46.
50. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cel Mol Life Sci CMLS* **2004**, 61, (2), 192-208.
51. Chen, A. Y., Chen, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry*, 2013, 138(4), 2099-2107.
52. Chen, H., Zhu, B., Zhao, L., Liu, Y., Zhao, F., Feng, J., Jin, Y., Sun, J., Geng, R., Wei, Y. Allicin Inhibits Proliferation and Invasion in Vitro and in Vivo via SHP-1-Mediated STAT3 Signaling in Cholangiocarcinoma. *Cell Physiol Biochem* **2018**, 47, (2), 641-653.
53. Chen, J. H., Chen, H. I., Wang, J. S., Tsai, S. J., Jen, C. J. Effects of Welsh onion extracts on human platelet function in vitro. *Life Sci* **2000**, 66, (17), 1571-9.
54. Chen, Y., Wang, Y., Yang, M., Guo, M. Y. Allicin Inhibited Staphylococcus aureus -Induced Mastitis by Reducing Lipid Raft Stability via LxR α in Mice. *J agricultural and food chem*, **2019**, 67, (39), 10863-10870.
55. Choi, Y. H., Park, H. S. Apoptosis induction of U937 human leukemia cells by diallyl trisulfide induces through generation of reactive oxygen species. *J Biomed Sci* **2012**, 19, 50.
56. Choo, S., Chin, V.K., Wong, E.H., Madhavan, P., Tay, S.T., Yong, P.V.C., Chong, P.P. Review: antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications. *Folia Microbiol*, **2020**, 65, 451-465.
57. Chu, Y. L., Ho, C. T., Chung, J. G., Rajasekaran, R., Sheen, L. Y. Allicin induces p53-mediated autophagy in Hep G2 human liver cancer cells. *J Agric Food Chem* **2012**, 60, (34), 8363-71.
58. Ciocărlan, V. *Flora ilustrată a României Preridophyta et Spermatophyta* Ed. Ceres, București **2009**.
59. Circu, M. L., Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, **2010**, 48, (6), 749-62.
60. Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Wild, C. P. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst* **2011**, 103, (24), 1827-39.
61. Corzo-Martínez M; Corzo N; M, V. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & technology*, **2007**, 18, (12), 609-625.
62. Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., Waterhouse, N. J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor protocols*, **2016**, 2016(11),
63. Cruz, C., Correa-Rotter, R., Sanchez-Gonzalez, D. J., Hernandez-Pando, R., Maldonado, P. D., Martinez-Martinez, C. M., Medina-Campos, O. N., Tapia, E., Aguilar, D., Chirino, Y. I., Pedraza-Chaverri, J. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **2007**, 293, (5), F1691-8.
64. da Cunha, M. M., dos Santos, L. P., Dornelas-Ribeiro, M., Vermelho, A. B., Rozental, S. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2009**, 55, (3), 396-403.
65. Dahanukar, S.A., Thatte, U.M. Current status of ayurveda in phytomedicine. *Phytomedicine*, **1997**, 4(4):359-68. doi: 10.1016/S0944-7113(97)80048-7.
66. D'Andrea, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* **2015**, 106, 256-71.
67. Daudt, A., Alberg, A. J., Helzlsouer, K. J. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Current opinion in oncology*, **1996**, 8(6), 455-461.
68. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. **2018** Jun;7(3):220-233. doi: 10.21037/tlcr.2018.05.06.
69. Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., Wallace, M. B. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)* **2019**, 394, (10207), 1467-1480.

70. Dhawan, V., Jain, S. Garlic supplementation prevents oxidative DNA damage in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* **2005**, 275, (1-2), 85-94.
71. Dick, J. D., Rosengard, B. R., Merz, W. G., Stuart, R. K., Hutchins, G. M., Saral, R. Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin-B-resistant *Candida guilliermondii*. *Ann Intern Med* **1985**, 102, (1), 67-8.
72. Duhard, E. [Paronychia]. *Presse Med* **2014**, 43, (11), 1216-22.
73. Duke, J.A., Bogenschutz-Godwin, M.J., duCellier, J., PAK, D. *Handbook of Medicinal Herbs*. 2nd edition ed., CRC Press, Boca Raton, London, New York and Washington D.C: **2002**.
74. Duthie, G. G., Duthie, S. J., Kyle, J. A. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* **2000**, 13, (1), 79-106.
75. Dym, O., Pratt, E.A., Ho, C., Eisenberg, D. The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2000**; 97(17):9413-9418. doi:10.1073/pnas.97.17.9413.
76. East, J. E., Saunders, B. P., Jass, J. R. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am* **2008**, 37, (1), 25-46, v.
77. Eilat, S., Oestreicher, Y., Rabinkov, A., Ohad, D., Mirelman, D., Battler, A., Eldar, M., Vered, Z. Alteration of lipid profile in hyperlipidemic rabbits by allicin, an active constituent of garlic. *Coron Artery Dis* **1995**, 6, (12), 985-90.
78. EL-mahmood, M. A. Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Plants Res*, **2009**, 3, (4), 179-185.
79. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, **2007**, 35(4), 495-516.
80. Esposito, T., Celano, R., Pane, C., Piccinelli, A.L., Sansone, F., Picerno, P., Zaccardelli, M., Aquino, R.P., Mencherini, T. Chestnut (*Castanea sativa* Miller.) Burs Extracts and Functional Compounds: UHPLC-UV-HRMS Profiling, Antioxidant Activity, and Inhibitory Effects on Phytopathogenic Fungi. *Molecules*, **2019**, 24, 302, 10.3390/molecules24020302.
81. Fahad Ullah, M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Advances in experimental medicine and biology* **2019**, 1152, 51-64.
82. Faloppi, L., Bianconi, M., Giampieri, R., Sobrero, A., Labianca, R., Ferrari, D., Barni, S., Aitini, E., Zaniboni, A., Boni, C., Caproni, F., Mosconi, S., Fanello, S., Berardi, R., Bittoni, A., Andrikou, K., Cinquini, M., Torri, V., Scartozzi, M., Cascinu, S. Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD). The value of lactate dehydrogenase serum levels as a prognostic and predictive factor for advanced pancreatic cancer patients receiving sorafenib. *Oncotarget*, **2015**, 6(33), 35087-35094.
83. Farcas, A. D., Mot, A. C., Zagrean-Tuza, C., Ticolea, M., Sevastre, B., Kulak, M., Silaghi-Dumitrescu, R., Parvu, A. Remarkable rutin-rich *Hypericum capitatum* extract exhibits anti-inflammatory effects on turpentine oil-induced inflammation in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, **2019**, 19(1), 289.
84. Farhadi, F., Jahanpour, S., Hazem, K., Aghbali, A., Baradaran, B., Vahid Pakdel, S. M. Garlic (*Allium sativum*) Fresh Juice Induces Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma: The Involvement of Caspase-3, Bax and Bcl-2. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* **2015**, 9, (4), 267-73.
85. Filomeni, G., Aquilano, K., Rotilio, G., Ciriolo, M.R. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.*, **2003**, 63(18), 5940-5949.
86. Francipane MG, Bulanin D, Lagasse E. Establishment and Characterization of 5-Fluorouracil-Resistant Human Colorectal Cancer Stem-Like Cells: Tumor Dynamics under Selection Pressure. *Int J Mol Sci*, **2019** Apr 12;20(8):1817. doi: 10.3390/ijms20081817.
87. Fukao, H., Yoshida, H., Tazawa, Y., Hada, T. Antithrombotic effects of odorless garlic powder both in vitro and in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, 71, (1), 84-90.
88. Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., Samali, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*, **2010**, 2010, 214074.
89. Gal-Yam, E. N., Saito, Y., Egger, G., Jones, P. A. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annual review of medicine*, **2008**, 59, 267-80.
90. Gao, X.-Y., Geng, X.-J., Zhai, W.-L., Zhang, X.-W., Wei, Y., Hou, G.-J. Effect of combined treatment with cyclophosphamide and allicin on neuroblastoma-bearing mice. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, **2015**, 8, (2), 137-141.
91. Ge, G., Li, D., Mei, H., Lu, G., Zheng, H., Liu, W., Shi, D. Different toenail onychomycosis due to *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida parapsilosis* in an immunocompetent young adult. *Med Mycol Case Rep*, **2019**, 24, 69-71.
92. Ghahfarokhi, M. S., Goodarzi, M., Abyaneh, M. R., Al-Tiraihi, T., Seyedipour, G. Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, **2004**, 75, (7-8), 645-55.
93. Ghannoum, M. A., Hajjeh, R. A., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A. K., Summerbell, R., Sullivan, S., Daniel, R., Krusinski, P., Fleckman, P., Rich, P., Odom, R., Aly, R., Pariser, D., Zaiac, M., Rebell, G., Leshner, J., Gerlach, B., Ponce-De-Leon, G. F., Ghannoum, A., Warner, J., Isham, N., Elewski, B. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol*, **2000**, 43, (4), 641-8.
94. Giampietri, C., Paone, A., D'Alessio, A. Cell death. *Intl J cell biol*, **2014**, 864062.
95. Ginter, E., Simko, V. Garlic (*Allium sativum* L.) and cardiovascular diseases. *Bratislavske lekarske listy*, **2010**, 111, (8), 452-6.
96. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*. **2017**;398(10):1095-1108. doi:10.1515/hsz-2017-0131.
97. Gonen, A., Harats, D., Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Weiner, L., Ulman, E., Levkovitz, H., Ben-Shushan, D., Shaish, A. The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. *Pathobiology*, **2005**, 72, (6), 325-34.
98. Gruhlke, M. C. H., Antelmann, H., Bernhardt, J., Kloubert, V., Rink, L., Slusarenko, A. J. The human allicin-proteome: S-thioallylation of proteins by the garlic defence substance allicin and its biological effects. *Free Radic Biol Med*, **2019**, 131, 144-153.
99. Gruhlke, M. C., Nicco, C., Batteux, F., Slusarenko, A. J. The Effects of Allicin, a Reactive Sulfur Species from Garlic, on a Selection of Mammalian Cell Lines. *Antioxidants*, **2016**, 6, (1).
100. Guarrera, P. M. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol*, **1999**, 68, (1-3), 183-92.
101. Gunzel, D., Yu, A. S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* **2013**, 93, (2), 525-69.
102. Gupta, A. K., Gupta, M. A., Summerbell, R. C., Cooper, E. A., Konnikov, N., Albreski, D., MacDonald, P., Harris, K. A. The epidemiology of onychomycosis: possible role of smoking and peripheral arterial disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **2000**, 14, (6), 466-9.
103. Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon, A. M. Mechanisms of protection against aflatoxin B(1) genotoxicity in rats treated by organosulfur compounds from garlic. *Carcinogenesis*, **2002**, 23, (8), 1335-41.
104. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, **2009** Nov;22(4):191-7. doi: 10.1055/s-0029-1242458.

105. Hammerschmidt, S. Wirtz, H. Lung cancer: current diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt international*, 2009, 106(49), 809–820.
106. Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., Lloyd, D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied microbiology and biotechnology*, **2001**, 57, (3), 282-6.
107. Hay, R. J., Baran, R. Onychomycosis: a proposed revision of the clinical classification. *J Am Acad Dermatol*, **2011**, 65, (6), 1219-27.
108. He, J., Pei, L., Jiang, H., Yang, W., Chen, J., Liang, H. Chemoresistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil is associated with silencing of the BNIP3 gene through aberrant methylation. *J Cancer*, **2017**, 8, (7), 1187-1196.
109. Hecht, S. S. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int J Cancer*, **2012**, 131, (12), 2724-32.
110. Henderson, B. E., Ross, R., Bernstein, L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res*, **1988**, 48, (2), 246-53.
111. Herman-Antosiewicz, A., Kim, Y.A., Kim, S.H., Xiao, D., Singh, S.V. Diallyl trisulfide-induced G2/M phase cell cycle arrest in DU145 cells is associated with delayed nuclear translocation of cyclin-dependent kinase 1. *Pharm. Res.*, **2010**, 27(6), 1072-1079.
112. Hiyasat, B., Sabha, D., Grotzinger, K., Kempfert, J., Rauwald, J. W., Mohr, F. W., Dhein, S. Antiplatelet activity of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Pharmacology*, **2009**, 83, (4), 197-204.
113. Holliday, D. L., Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, **2011**, 13, (4), 215.
114. Hounnou, G., Destrieux, C., Desme, J., Bertrand, P., Velut, S. Anatomical study of the length of the human intestine. *Surg Radiol Anat*, **2002**, 24, (5), 290-4.
115. Huang, H., Jiang, Y., Mao, G., Yuan, F., Zheng, H., Ruan, Y., Wu, T. Protective effects of allicin on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Journal of the science of food and agriculture*, **2017**, 97, (4), 1359-1366.
116. Huang, L., Song, Y., Lian, J., Wang, Z. Allicin inhibits the invasion of lung adenocarcinoma cells by altering tissue inhibitor of metalloproteinase/matrix metalloproteinase balance via reducing the activity of phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling. *Oncol Lett*, **2017**, 14, (1), 468-474.
117. Hutchinson, L. Breast cancer: challenges, controversies, breakthroughs. *Nature reviews. Clinical oncology* **2010**, 7, (12), 669-70.
118. Iciek, M., Kwiecien, I., Wlodek, L. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environ Mol Mutagen*, **2009**, 50, (3), 247-65.
119. Ilić, D. P., Nikolić, V., Nikolić, L., Stanković, M., Stanojević, L., Cakić, M., ALLICIN AND RELATED COMPOUNDS: BIOSYNTHESIS, SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY. *FACTA UNIVERSITATIS*, **2011**, 9, (1), 9-20.
120. Imani Rad, H., Peeri, H., Amani, M., Mohammadnia, A., Ogunniyi, A. D., Khazandi, M., Venter, H., Arzanlou, M. Allicin prevents the formation of Proteus-induced urinary crystals and the blockage of catheter in a bladder model in vitro. *Microbial pathogenesis*, **2019**, 132, 293-301.
121. Imyanitov, E. N., Kuligina, E. S., Belogubova, E. V., Togo, A. V., Hanson, K. P. Mechanism of lung cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanism*, **2005**, 2, (2), 213-223.
122. Inamura, K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.*, **2017** Aug 28;7:193. doi: 10.3389/fonc.2017.00193.
123. Ioannou, P., Vamvoukaki, R., Samonis, G. *Rhodotorula* species infections in humans: A systematic review. *Mycoses*, **2019**, 62, (2), 90-100.
124. Ionescu-Stoian, P. *Extracte farmaceutice vegetale*. Editura Medicală, București: **1977**.
125. Jain, R. C., Konar, D. B., Effect of garlic oil in experimental cholesterol atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1978**, 29, (2), 125-9.
126. Jang HJ, Lee HJ, Yoon DK, Ji DS, Kim JH, Lee CH. Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents. *Food Sci Biotechnol*. **2017** Dec 12;27(1):219-225. doi: 10.1007/s10068-017-0246-4.
127. Jansen, H., Muller, B., Knobloch, K., Allicin characterization and its determination by HPLC. *Planta Med* **1987**, 53, (6), 559-62.
128. Jarros, I. C., Veiga, F. F., Correa, J. L., Barros, I. L. E., Gadelha, M. C., Voidaleski, M. F., Pieralisi, N., Pedrosa, R. B., Vicente, V. A., Negri, M., Svidzinski, T. I. E. Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. *EXCLI J* **2020**, 19, 687-704.
129. Jones, G.S., Baldwin, D.R. Recent advances in the management of lung cancer. *Clin Med (Lond)*. **2018** Apr 1;18(Suppl 2):s41-s46. doi: 10.7861/clinmedicine.18-2-s41.
130. Josling, P. *Allicin The Heart of Garlic*. NWI Publishing Callahan Florida: **2003**.
131. Kamenetsky, R., London Shafir, I., Khassanov, F., Kik, C., van Heusden, A. W., Vrieling-van Ginkel, M., Burger-Meijer, K., Auger, J., Arnault, I., Rabinowitch, H. D. Diversity in fertility potential and organo-sulphur compounds among garlics from Central Asia. *Biodiversity & Conservation* **2005**, 14, (2), 281-295.
132. Kanoun, K., Abbouni, B., Boudissa, S., Bouhaf, N., Seddiki, M. Étude de l'activité des extraits de feuilles de *Punica granatum* Linn sur *Candida albicans* et *Rhodotorula* spp. *Phytothérapie* **2016**, 14, (1), 5-16.
133. Kastrinos, F., Mukherjee, B., Tayob, N., Wang, F., Sparr, J., Raymond, V. M., Bandipalliam, P., Stoffel, E. M., Gruber, S. B., Syngal, S. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* **2009**, 302, (16), 1790-5.
134. Kato, G. J., McGowan, V., Machado, R. F., Little, J. A., Taylor, J., 6th, Morris, C. R., Nichols, J. S., Wang, X., Poljakovic, M., Morris, S. M., Jr, Gladwin, M. T. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, **2006**, 107(6), 2279–2285.
135. Katsuki, T.; Hirata, K.; Ishikawa, H.; Matsuura, N.; Sumi, S.; Itho, H. Aged Garlic Extract Has Chemopreventative Effects On 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Tumors in Rats. *The Journal of Nutrition*, **2006**, 136, 3, 847S–851S.
136. Kaur, G., Dufour, J. M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, **2012**, 2, (1), 1-5.
137. Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A., Dorgan, J. F., Longcope, C., Stanczyk, F. Z., Stephenson, H. E., Jr., Falk, R. T., Miller, R., Schatzkin, A., Allen, D. S., Fentiman, I. S., Key, T. J., Wang, D. Y., Dowsett, M., Thomas, H. V., Hankinson, S. E., Toniolo, P., Akhmedkhanov, A., Koenig, K., Shore, R. E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Berrino, F., Muti, P., Micheli, A., Krogh, V., Sieri, S., Pala, V., Venturelli, E., Secreto, G., Barrett-Connor, E., Laughlin, G. A., Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R. G., Neriishi, K., Land, C. E., Cauley, J. A., Kuller, L. H., Cummings, S. R., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Bush, T. L., Comstock, G. W., Gordon, G. B., Miller, S. R., Longcope, C. Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative, G., Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, **2003**, 95, (16), 1218-26.
138. Key, T., Appleby, P., Barnes, I., Reeves, G., Endogenous, H., Breast Cancer Collaborative, G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* **2002**, 94, (8), 606-16.
139. Koç, E., Çelik-Uzuner, S., Uzuner, U., Çakmak, R. The Detailed Comparison of Cell Death Detected by Annexin V-PI Counterstain Using Fluorescence Microscope, Flow Cytometry and Automated Cell Counter in Mammalian and Microalgae Cells. *J Fluoresc*. **2018**;28(6):1393-1404. doi:10.1007/s10895-018-2306-4.

140. Kolak, A., Kamińska, M., Sygit, K., Budny, A., Surdyka, D., Kukielka-Budny, B., Burdan, F. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* **2017**, 24, (4), 549-553.
141. Kolligs F. T. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visceral medicine*, **2016**, 32(3), 158–164.
142. Kondratyuk, T. P., Pezzuto, J. M. Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. *Pharmaceutical Biology* **2004**, 42, (sup1), 46-63.
143. Krautwald, S., Ziegler, E., Röhlver, L., Linkermann, A., Keyser, K. A., Steen, P., Wollert, K. C., Korf-Klingebiel, M., Kunzendorf, U. Effective blockage of both the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in mice by TAT-crmA. *The Journal of biological chemistry*, **2010**, 285(26), 19997–20005.
144. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Bachrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **2009** Jan;16(1):3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.
145. Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* **2018**; 2018(6):10.1101/pdb.prot095497.
146. Lee, D. Y., Li, H., Lim, H. J., Lee, H. J., Jeon, R., Ryu, J. H. Anti-inflammatory activity of sulfur-containing compounds from garlic. *J Med Food* **2012**, 15, (11), 992-9.
147. Lee, W. S., Yi, S. M., Yun, J. W., Jung, J. H., Kim, D. H., Kim, H. J., Chang, S. H., Kim, G., Ryu, C. H., Shin, S. C., Hong, S. C., Choi, Y. H., Jung, J. M. Polyphenols Isolated from *Allium cepa* L. Induces Apoptosis by Induction of p53 and Suppression of Bcl-2 through Inhibiting PI3K/Akt Signaling Pathway in AGS Human Cancer Cells. *Journal of cancer prevention*, **2014**, 19(1), 14–22.
148. Lee, Y. H., Yang, H., Lee, S. R., Kwon, S. W., Hong, E. J., Lee, H. W. Welsh Onion Root (*Allium fistulosum*) Restores Ovarian Functions from Letrozole Induced-Polycystic Ovary Syndrome. *Nutrients* **2018**, 10, (10).
149. Lemar, K. M., Passa, O., Aon, M. A., Cortassa, S., Muller, C. T., Plummer, S., O'Rourke, B., Lloyd, D. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. *Microbiology* **2005**, 151, (Pt 10), 3257-3265.
150. Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y. W., Buchanan, P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et biophysica acta*, **2015**, 1856(2), 189–210.
151. Leontiev, R., Hohaus, N., Jacob, C., Gruhlke, M. C. H., Slusarenko, A. J. A Comparison of the Antibacterial and Antifungal Activities of Thiosulfinate Analogues of Allicin. *Scientific reports* **2018**, 8, (1), 6763.
152. Li, Q.-Q., Zhou, S.-D., He, X.-J., Yu, Y., Zhang, Y.-C., Wei, X.-Q. Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Alliaceae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Ann Bot*, **2010**, 106, (5), 709-733.
153. Li, W.-R., Shi, Q.-S., Dai, H.-Q., Liang, Q., Xie, X.-B., Huang, X.-M., Zhao, G.-Z., Zhang, L.-X. Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Scientific Reports*, **2016**, 6, (1), 22805.
154. Li, Z., Le, W., Cui, Z. A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion. *Cell Death Discovery*, **2018**, 4, 108.
155. Liang, C. C., Park, A. Y., Guan, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, **2007**, 2, (2), 329-33.
156. Lichota, A., Gwozdziński, K. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, (11).
157. Liehr, J. G., Ulubelen, A. A., Strobel, H. W. Cytochrome P-450 mediated Redox Cycling of Estrogens. *The Journal of Biological Chemistry*, **1986**, 261, (36), 16865-16870.
158. Lim, H., Kim, S. Y., Lee, E., Lee, S., Oh, S., Jung, J., Kim, K. S., Moon, A. Sex-Dependent Adverse Drug Reactions to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Biol Pharm Bull*, **2019**, 42, (4), 594-600.
159. Lin, G. H., Lee, Y.-J., Choi, D.-Y., Han, S. B., Jung, J. K., Hwang, B. Y., Moon, D. C., Kim, Y., Lee, M. K., Oh, K.-W., Jeong, H. S., Leem, J. Y., Shin, H. K., Lee, J. H., Hong, J. T. Anti-amyloidogenic effect of thiacecremonone through anti-inflammation in vitro and in vivo models. *J Alzheimers Dis*, **2012**, 29, (3), 659-676.
160. Liu, Q., Lan, Y., Wen, C., Zhao, H., Wang, J., Wang, Y. Transcriptome Sequencing Analyses between the Cytoplasmic Male Sterile Line and Its Maintainer Line in Welsh Onion (*Allium fistulosum* L.). *Int J Mol Sci*, **2016**, 17, (7).
161. Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, **2003**, 3, (5), 330-8.
162. Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., Ralph, D. J., Cellek, S., Musumeci, G., Giunta, S., Djinic, R., Basic, D., Sansalone, S. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *Biomed Res Int*, **2014**, 2014, 616149.
163. Loss, S. H., Antonio, A. C., Roehrig, C., Castro, P. S., Maccari, J. G. Meningitis and infective endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent patient. *Rev Bras Ter Intensiva*, **2011**, 23, (4), 507-9.
164. Lossi, L., Castagna, C., Merighi, A. Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. *Int J mol sci*, **2018**, 19(12), 3999. <https://doi.org/10.3390/ijms19123999>.
165. Lu, X., Rasco, B. A., Jabal, J. M. F., Aston, D. E., Lin, M., Konkel, M. E. Investigating Antibacterial Mechanisms of Garlic (*Allium sativum*) Concentrate and Garlic-Derived Organosulfur Compounds on *Campylobacter jejuni* Using FT-IR Spectroscopy, Raman Spectroscopy and Electron Microscope. **2011**, AEM.02845-10.
166. Luo, R., Fang, D., Hang, H., Tang, Z. The Mechanism in Gastric Cancer Chemoprevention by Allicin. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, **2016**, 16, (7), 802-9.
167. Majounie, E., Wee, K., Williamson, L. M., Jones, M. R., Pleasance, E., Lim, H. J., Ho, C., Renouf, D. J., Yip, S., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Laskin, J. Fluorouracil sensitivity in a head and neck squamous cell carcinoma with a somatic DPYD structural variant. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, **2020**, 6, (1).
168. Majumder, A., Singh, M., Tyagi, S. C. Post-menopausal breast cancer: from estrogen to androgen receptor. *Oncotarget*, **2017**, 8(60), 102739–102758..
169. Maldonado, P. D., Barrera, D., Medina-Campos, O. N., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M. a. E., Pedraza-Chaverri, J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sciences*, **2003**, 73, (20), 2543-2556.
170. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*, **2017** Sep;7(3):339-348. doi: 10.15171/apb.2017.041.
171. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodríguez Yoldi, M. J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, **2017**, 18(1), 197.

172. Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. C. F. R. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, **2015**, 74, 648-670.
173. Matysiak, M., Gawel-Beben, K., Rybczyńska, K., Gmiński, J., Surma, S. Comparing selected biological properties of garlic (*Allium sativum* L.) from Poland and China. *Food Sci. Technol. Qual*, **2015**, 21, 160-169.
174. McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, **2000**; 321(7261):624-628. doi:10.1136/bmj.321.7261.624.
175. Merhi, F., Auger, J., Rendu, F., Bauvois, B. *Allium* compounds, dipropyl and dimethyl thiosulfates as antiproliferative and differentiating agents of human acute myeloid leukemia cell lines. *Biologics : targets & therapy*, **2008**, 2(4), 885-895.
176. Meriga, B., Mopuri, R., Murali Krishna, T. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pac J Trop Med*, **2012**, 5, (5), 391-5.
177. Metwally, D.M., Al-Olayan, E.M., Alanazi, M., Alzahrany, S.B., Semlali, A. Antischistosomal and anti-inflammatory activity of garlic and allicin compared with that of praziquantel in vivo. *BMC Complement Altern Med*, **2018**, 18:135.
178. Mikaili, P., Maadirad, S., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S., Sarahroodi, S. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of Garlic, Shallot, and Their Biologically Active Compounds. *Iran J. Basic Med. Sci*, **2013**, 16, 1031-1048.
179. Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M., Rabinkov, A. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfates. *Analytical Biochemistry*, **2002**, 307, (1), 76-83.
180. Mitrová, K., Svoboda, P., Milella, L., Ovesná, J. Alliinase and cysteine synthase transcription in developing garlic (*Allium sativum* L.) over time. *Food chemistry*, **2018**, 251, 103-109.
181. Mocayar Marón, F. J., Camargo, A. B., Manucha, W. Allicin pharmacology: Common molecular mechanisms against neuroinflammation and cardiovascular diseases. *Life sciences*, **2020**, 249, 117513.
182. Moosavi, M. A., Hagh, A., Rahmati, M., Taniguchi, H., Mocan, A., Echeverria, J., Gupta, V. K., Tzvetkov, N. T., Atanasov, A. G. Phytochemicals as potent modulators of autophagy for cancer therapy. *Cancer Lett*, **2018**, 424, 46-69.
183. Morling, J. R., Broderick, C., Yeoh, S. E., Kolbach, D. N. Rutosides for treatment of post-thrombotic syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*, **2018**, 11(11), CD005625. <https://doi.org/10.1002/14651858>
184. Mot, A. C., Pärvi, M., Pärvi, A. E., Rosca-Casian, O., Dina, N. E., Leopold, N., Silaghi-Dumitrescu, R., Mircea, C. Reversible naftifine-induced carotenoid depigmentation in *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jorg.) F.C. Harrison causing onychomycosis. *Sci Rep*, **2017**, 7, (1), 11125.
185. Motsei, M. L., Lindsey, K. L., van Staden, J., Jager, A. K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*, **2003**, 86, (2-3), 235-41.
186. Mugge, C., Hausteiner, U. F., Nenoff, P. [Causative agents of onychomycosis--a retrospective study]. *J Dtsch Dermatol Ges*, **2006**, 4, (3), 218-28.
187. Muller, M. F., Ibrahim, A. E., Arends, M. J. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, **2016**, 469, (2), 125-34.
188. Nabavi, S. F., Atanasov, A. G., Khan, H., Barreca, D., Trombetta, D., Testai, L., Sureda, A., Tejada, S., Vacca, R. A., Pittala, V., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., Shirooie, S., Nabavi, S. M. Targeting ubiquitin-proteasome pathway by natural, in particular polyphenols, anticancer agents: Lessons learned from clinical trials. *Cancer Lett*, **2018**, 434, 101-113.
189. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., Das, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2019**, 9613090.
190. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedecine & pharmacotherapy*, **2018**, 97, 67-74.
191. Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Franchi, G.G., Giorgio, G., Micheli, L. Evaluation of antioxidative properties of *Allium* species growing wild in Italy. *Phytother. Res.*, **2007**, 21(9), 874-878.
192. Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, Kyrodimos E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis*, **2018**;35(4):309-318. doi:10.1007/s10585-018-9903-0.
193. Nogueira, M., Istel, F., Jenull, S., Walker, L., Gow, N., Lion, T. Quantitative Analysis of *Candida* Cell Wall Components by Flow Cytometry with Triple-Fluorescence Staining. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*, **2017**, 2, (1).
194. Nohara, T., Fujiwara, Y., El-Aasr, M., Ikeda, T., Ono, M., Nakano, D., Kinjo, J. Antitumor *Allium* Sulfides. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **2017**, 65, (3), 209-217.
195. Nwokocho, C. R., Ozolua, R. I., Owu, D. U., Nwokocho, M., Ugwu, A. C. Antihypertensive properties of *Allium sativum* (garlic) on normotensive and two kidney one clip hypertensive rats. *Nigerian journal of physiological sciences*, **2011**, 26, 213-218.
196. Oh, H., Eliassen, A. H., Beck, A. H., Rosner, B., Schnitt, S. J., Collins, L. C., Connolly, J. L., Montaser-Kouhsari, L., Willett, W. C., Tamimi, R. M. Breast cancer risk factors in relation to estrogen receptor, progesterone receptor, insulin-like growth factor-1 receptor, and Ki67 expression in normal breast tissue. *NPJ breast cancer*, **2017**, 3, 39.
197. O'Keefe, J. H., Bell, D. S. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*, **2007**, 100, (5), 899-904.
198. Oommen, S., Anto, R. J., Srinivas, G., Karunakaran, D. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharmacol*, **2004**, 485, (1-3), 97-103.
199. Oosthuizen, C., Arbach, M., Meyer, D., Hamilton, C., Lall, N. Diallyl Polysulfides from *Allium sativum* as Immunomodulators, Hepatoprotectors, and Antimycobacterial Agents. *Journal of medicinal food*, **2017**, 20, (7), 685-690.
200. O'Reilly, K. M., McLaughlin, A. M., Beckett, W. S., Sime, P. J. Asbestos-related lung disease. *Am Fam Physician*, **2007**, 75, (5), 683-8.
201. Orfali, G. d., Duarte, A. C., Bonadio, V., Martinez, N. P., de Araújo, M. E., Priviero, F. B., Carvalho, P. O., Priolli, D. G. Review of anticancer mechanisms of isoquercetin. *World journal of clinical oncology*, **2016**, 7(2), 189-199
202. Otterbach, F., Bankfalvi, A., Bergner, S., Decker, T., Krech, R., Boecker, W. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. *Histopathology*, **2000**, 37, (3), 232-40.
203. Padiya, R., Chowdhury, D., Borkar, R., Srinivas, R., Pal Bhadra, M., Banerjee, S. K. Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. *PLoS One*, **2014**, 9, (5), e94228.
204. Palaksha, M. N., Ahmed, M., Das, S. Antibacterial activity of garlic extract on streptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* solely and in synergism with streptomycin. *J Nat Sci Biol Med*, **2010**, 1, (1), 12-5.
205. Park, S. Y., Cho, S. J., Kwon, H. C., Lee, K. R., Rhee, D. K., Pyo, S. Caspase-independent cell death by allicin in human epithelial carcinoma cells: involvement of PKA. *Cancer Lett*, **2005**, 224, (1), 123-32.1990; Vol. 18.

206. Pârnu M; Barbu-Tudoran L; Roşca-Casian O; Vlase L; Tripon, S.C. Ultrastructural changes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae* hyphae treated in vitro with *Allium fistulosum* plant extract. *Annals of RSCB*, **2010**, *2*, 65-72.
207. Pârnu, A. E., Pârnu, M., Vlase, L., Miclea, P., Mot, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R. Anti-inflammatory effects of *Allium schoenoprasum* L. leaves. *J Physiol Pharmacol*, **2014**, *65*, (2), 309-15.
208. Pârnu, M., Mot, C. A., Pârnu, A. E., Mircea, C., Stoeber, L., Rosca-Casian, O., Țigu, A. B. *Allium sativum* Extract Chemical Composition, Antioxidant Activity and Antifungal Effect against *Meyerozyma guilliermondii* and *Rhodotorula mucilaginosa* Causing Onychomycosis. *Molecules*, **2019**, *24*(21), 10.3390/molecules24213958.
209. Pârnu, M., Pârnu, A., Vlase, L., Roşca-Casian, O., Pârnu, O., Puşcaş, M. Allicin and alliin content and antifungal activity of *Allium senescens* L. ssp. *montanum* (F. W. Schmidt) Holub ethanol extract *Journal of Medicinal Plants Research*, **2011**, *5*, (29), 6544-6549.
210. Pârnu, M., Vlase, L., Pârnu, A. E., Roşca-Casian, O., Gheldiu, A. M., Pârnu, O. Phenolic compounds and antifungal activity of *Hedera helix* L. (Ivy) flowers and fruits. *Not. Bot. Horti Agrobot Cluj-Napoca*, **2015**, *43*, 53-58.
211. Perez, G., Abaira, C., Oster, J. R., Lespier, L., Vaamonde, C. A. The effect of dexamethasone on urinary acidification. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1975**, *150*, (3), 606-11.
212. Petrovic, V., Nepal, A., Olaisen, C., Bachke, S., Hira, J., Sogaard, C. K., Rost, L. M., Misund, K., Andreassen, T., Melo, T. M., Bartsova, Z., Bruheim, P., Otterlei, M. Anti-Cancer Potential of Homemade Fresh Garlic Extract Is Related to Increased Endoplasmic Reticulum Stress. *Nutrients*, **2018**, *10*, (4).
213. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, **2016**, *8*, (4), 603-19.
214. Platz, E. A., Willett, W. C., Colditz, G. A., Rimm, E. B., Spiegelman, D., Giovannucci, E. Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men. *Cancer causes & control : CCC*, **2000**, *11*(7), 579-588.
215. Poblacka-Olech, L., Glod, D., Zebrowska, M. E., Sznitowska, M., Krauze-Baranowska, M. TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum*. *Acta Pharm*, **2016**, *66*, (4), 543-554.
216. Ponder, K. G., Boise, L. H. The prodomain of caspase-3 regulates its own removal and caspase activation. *Cell death discovery*, **2019**, *5*, 56..
217. Prager-Khoutorsky, M., Goncharov, I., Rabinkov, A., Mirelman, D., Geiger, B., Bershadsky, A. D. Allicin inhibits cell polarization, migration and division via its direct effect on microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton*, **2007**, *64*, (5), 321-37.
218. Public Health Agency of Canada. Release notice - Canadian Cancer Statistics 2019. *Health Promot Chronic Dis Prev Can*, **2019**, *39*, (8-9), 255.
219. Pugazhendhi, D., Pope, G. S., Darbre, P. D. Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *Journal of applied toxicology : JAT*, **2005**, *25*(4), 301-309.
220. Rafehi, H., Orłowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., Karagiannis, T. C. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp*, **2011**, (49).
221. Rajput, S., Mandal, M. Antitumor promoting potential of selected phytochemicals derived from spices: a review. *Eur J Cancer Prev*, **2012**, *21*, (2), 205-15.
222. Rammohan, A., Wood, J. J. Desmoid tumour of the breast as a manifestation of Gardner's syndrome. *Int J Surg Case Rep*, **2012**, *3*, (5), 139-42.
223. Rasool, A., Khan, M. U., Ali, M. A., Anjum, A. A., Ahmed, I., Aslam, A., Mustafa, G., Masood, S., Ali, M. A., Nawaz, M. Anti-avian influenza virus H9N2 activity of aqueous extracts of *Zingiber officinalis* (Ginger) and *Allium sativum* (Garlic) in chick embryos. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, **2017**, *30*, (4), 1341-1344.
224. Razo-Rodriguez, A. C., Chirino, Y. I., Sanchez-Gonzalez, D. J., Martinez-Martinez, C. M., Cruz, C., Pedraza-Chaverri, J. Garlic powder ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *J Med Food*, **2008**, *11*, (3), 582-6.
225. Reed J. C. Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, **2000**, *157*(5), 1415-1430. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64779-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7)
226. Reiter, J., Levina, N., van der Linden, M., Gruhlke, M., Martin, C., Slusarenko, A. J. Diallylthiosulfinate (Allicin), a Volatile Antimicrobial from Garlic (*Allium sativum*), Kills Human Lung Pathogenic Bacteria, Including MDR Strains, as a Vapor. *Molecules*, **2017**, *22*, (10).
227. Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., Barreda, D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of visualized experiments : JoVE*, **2011**, (50), 2597.
228. Riikimäki, M., Hemminki, A., Fallah, M., Thomsen, H., Sundquist, K., Sundquist, J., Hemminki, K. Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer* **2014**, *86*, (1), 78-84.
229. Roman, I și Puică, C. Effects of Anakinetic Stress and *Gallium verum* Extract of the Thyroid and Ovary Morphology in Wistar rats. *Bulletin UASVM*, **2013**, *70*(1), 167-169.
230. Russo, G. L., Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Iannitti, R., Palumbo, R. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Cancer treatment and research*, **2014**, *159*, 185-205.
231. Sachdev, J. C., Sandoval, A. C., Jahanzeb, M. Update on Precision Medicine in Breast Cancer. *Cancer treatment and research*, **2019**, *178*, 45-80.
232. Sagaert, X., Vanstapel, A., Verbeek, S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, **2018**, *85*, (1-2), 72-84.
233. Salama, A. A., AbouLaila, M., Terkawi, M. A., Mousa, A., El-Sify, A., Allaam, M., Zaghawa, A., Yokoyama, N., Igarashi, I. Inhibitory effect of allicin on the growth of *Babesia* and *Theileria equi* parasites. *Parasitology research*, **2014**, *113*, (1), 275-83.
234. Salehi, B., Zucca, P., Orhan, I. E., Azzini, E., Adetunji, C. O., Mohammed, S. A., Banerjee, S. K., Sharopov, F., Rigano, D., Sharifi-Rad, J., Armstrong, L., Martorell, M., Sureda, A., Martins, N., Selamoğlu, Z., Ahmad, Z. Allicin and health: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, **2019**, *86*, 502-516.
235. Sallam KI, Ishioroshi M, Samejima K. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensm Wiss Technol*, **2004**, Dec;37(8):849-855. doi: 10.1016/j.lwt.2004.04.001.
236. Sameer, A. S., Nissar, S., Fatima, K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*, **2014**, *23*, (4), 246-57.
237. Sarkar, S., Goldgar, S., Byler, S., Rosenthal, S., Heerboth, S. Demethylation and re-expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes: sensitization of cancer cells by combination therapy. *Epigenomics*, **2013**, *5*, (1), 87-94.
238. Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., Longacre, M. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, (10), 21087-21113.
239. Schafer, G., Kaschula, C. H. The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Anticancer Agents Med Chem*, **2014**, *14*, (2), 233-40.

240. Scher, R. K., Tavakkol, A., Sigurgeirsson, B., Hay, R. J., Joseph, W. S., Tosti, A., Fleckman, P., Ghannoum, M., Armstrong, D. G., Markinson, B. C., Elewski, B. E. Onychomycosis: diagnosis and definition of cure. *J Am Acad Dermatol*, **2007**, 56, (6), 939-44.
241. Scholzen, T., Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* **2000**, 182, (3), 311-22.
242. Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H., Ramaekers, F. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of neuroscience methods*, **1998**, 86(1), 63–69.
243. Sener, G., Sakarcan, A., Yegen, B. C., Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* **2007**, 51, (11), 1345-52.
244. Setiawan, V.W., Yu, G.P., Lu, Q.Y., Lu, M.L., Yu, S.Z., Mu, L., Zhang, J.G., Kurtz, R.C., Cai, L., Hsieh, C.C., Zhang, Z.F. *Allium* vegetables and stomach cancer risk in China. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2005**, 6(3), 387-395.
245. Shaban, A.M., Hammouda, O., Ghazala, L.A., Raslan, M., El-Magd, M.A. Ethyl acetate fraction of garlic (*Allium sativum*) inhibits the viability of MCF-7 and HepG2 through induction of apoptosis and G2/M phase cell cycle arrest. *J. App. Phar. Sci*, **2018**, 8(09), 142-150, doi: 10.7324/JAPS.2018.8920.
246. Shang, A., Cao, S.Y., Xu, X.Y., Gan, R.Y., Tang, G.Y., Corke, H., Mavumengwana, V., Li, H.B. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*, **2019** Jul 5;8(7):246. doi: 10.3390/foods8070246.
247. Sheppard, J. G., McAleer, J. P., Saralkar, P., Geldenhuys, W. J., Long, T. E. Allicin-inspired pyridyl disulfides as antimicrobial agents for multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of medicinal chemistry*, **2018**, 143, 1185-1195.
248. Si, X. B., Zhang, X. M., Wang, S., Lan, Y., Zhang, S., Huo, L. Y. Allicin as add-on therapy for *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, **2019**, 25, (39), 6025-6040.
249. Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, **2018**, 68, (1), 7-30.
250. Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, **2019**, 69, (1), 7-34.
251. Simon, M. S., Somersan, S., Singh, H. K., Hartman, B., Wickes, B. L., Jenkins, S. G., Walsh, T. J., Schuetz, A. N. Endocarditis caused by *Rhodotorula* infection. *J Clin Microbiol*, **2014**, 52, (1), 374-8.
252. Sinikumpu, S. P., Huilaja, L., Auvinen, J., Jokelainen, J., Puukka, K., Ruokonen, A., Timonen, M., Tasanen, K. The Association Between Low Grade Systemic Inflammation and Skin Diseases: A Cross-sectional Survey in the Northern Finland Birth Cohort 1966. *Acta Derm Venereol*, **2018**, 98, (1), 65-69.
253. Sobenin, I. A., Myasoedova, V. A., Itchuk, M. I., Zhang, D. W., Orekhov, A. N. Therapeutic effects of garlic in cardiovascular atherosclerotic disease. *Chinese journal of natural medicines* **2019**, 17, (10), 721-728.
254. Song, B., Shu, Y., Cui, T., Fu, P. Allicin inhibits human renal clear cell carcinoma progression via suppressing HIF pathway. *Int J Clin Exp Med*, **2015**, 8, (11), 20573-80.
255. Soravia, C., Berk, T., Madlensky, L., Mitri, A., Cheng, H., Gallinger, S., Cohen, Z., Bapat, B. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet*, **1998**, 62, (6), 1290-301.
256. Specian, A. F., Serpeloni, J. M., Tuttis, K., Ribeiro, D. L., Cilião, H. L., Varanda, E. A., Sannomiya, M., Martinez-Lopez, W., Vilegas, W., Cólus, I. M. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology*, **2016**, 68(6), 2729–2744.
257. Sung, Y. Y., Kim, S. H., Yoo, B. W., Kim, H. K. The nutritional composition and anti-obesity effects of an herbal mixed extract containing *Allium fistulosum* and *Viola mandshurica* in high-fat-diet-induced obese mice. *BMC Complement Altern Med*, **2015**, 15, 370.
258. Surjushe, A., Kamath, R., Oberai, C., Saple, D., Thakre, M., Dharmshale, S., Gohil, A. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, **2007**, 73, (6), 397-401.
259. Syntichaki, P., Tavernarakis, N. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?. *EMBO reports*, **2002**, 3(7), 604–609.
260. Szychowski, K. A., Binduga, U. E., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Leja, M. L., Gmiński, J. Cytotoxic effects of two extracts from garlic (*Allium sativum* L.) cultivars on the human squamous carcinoma cell line SCC-15. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2018**, 25, (8), 1703-1712.
261. Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., Enck, P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European journal of nutrition*, **2017**, 56(7), 2215–2244.
262. Takagi, M., Hayashi, H., Yoshida, T. The effect of osmolarity on metabolism and morphology in adhesion and suspension chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *Cytotechnology*, **2000**, 32(3), 171–179.
263. Tariq, K., Ghias, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* **2016**, 13, (1), 120-35.
264. Tattelman, E. Health effects of garlic. *Am Fam Physician* **2005**, 72, (1), 103-6.
265. Thamburan, S., Klaasen, J., Mabusela, W. T., Cannon, J. F., Folk, W., Johnson, Q. *Tulbaghia alliacea* phytotherapy: a potential anti-infective remedy for candidiasis. *Phytother Res*, **2006**, 20, (10), 844-50.
266. Thanikachalam, K., Khan, G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, **2019**, 11, (1).
267. Theodoratou, E., Timofeeva, M., Li, X., Meng, X., Ioannidis, J. P. A. Nature, Nurture, and Cancer Risks: Genetic and Nutritional Contributions to Cancer. *Annu Rev Nutr*, **2017**, 37, 293-320.
268. Thomas, J., Jacobson, G. A., Narkowicz, C. K., Peterson, G. M., Burnet, H., Sharpe, C. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *J Clin Pharm Ther*, **2010**, 35, (5), 497-519.
269. Thomaz, L., Apitz-Castro, R., Marques, A. F., Travassos, L. R., Tabora, C. P. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Medical Mycology* **2008**, 46, (2), 113-118.
270. Thomson, M., Ali, M. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Current cancer drug targets*, **2003**, 3, (1), 67-81.
271. Tigu, A. B., Toma, V. A., Mot, A. C., Jurj, A., Moldovan, C. S., Fischer-Fodor, E., Berindan-Neagoe, I., Parvu, M. The Synergistic Antitumor Effect of 5-Fluorouracil Combined with Allicin against Lung and Colorectal Carcinoma Cells. *Molecules* **2020**, 25, (8), 10.3390/molecules25081947.
272. Toma, V. A., Farcas, A. D., Parvu, M., Silaghi-Dumitrescu, R., Roman, I. 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 research bulletin*, **2017**, 130, 10–17.
273. Toma, V. A., Tigu, A. B., Farcas, A. D., Sevastre, B., Taulescu, M., Gherman, A. M. R., Roman, I., Fischer-Fodor, E., Parvu, M. New Aspects Towards a Molecular Understanding of the Allicin Immunostimulatory Mechanism via Colec12, MARCO, and SCARB1 Receptors. *Int J Mol Sci*, **2019**, 20, (15), 10.3390/ijms20153627.
274. Tomeh, M. A., Hadianamrei, R., Zhao, X. A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *Int J Mol Sci*, **2019**, 20, (5).

275. Trio, P. Z., You, S., He, X., He, J., Sakao, K., Hou, D. X. Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds. *Food Funct*, **2014**, 5, (5), 833-44.
276. Tsubura, A., Lai, Y. C., Kuwata, M., Uehara, N., Yoshizawa, K. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents Med Chem*, **2011**, 11, (3), 249-53.
277. Tyas, L., Brophy, V. A., Pope, A., Rivett, A. J., Tavaré, J. M. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO reports*, **2000**, 1(3), 266–270.
278. Vafaee, K., Dehghani, S., Tahmasvand, R., Abadi, F.S., Irian S., Salimi, M. Potent antitumor property of *Allium bakhtiaricum* extracts. *BMC Complement Altern Med* 19, **2019**, 116,
279. Végran, F., Boidot, R., Solary, E., Lizard-Nacol, S. A short caspase-3 isoform inhibits chemotherapy-induced apoptosis by blocking apoptosome assembly. *PLoS one*, **2011**, 6(12), e29058.
280. Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., Viale, G. Breast cancer. *Lancet (London, England)* **2005**, 365, (9472), 1727-41.
281. Vimal, V., Devaki, T. Hepatoprotective effect of allicin on tissue defense system in galactosamine/endotoxin challenged rats. *J Ethnopharmacol*, **2004**, 90, (1), 151-4.
282. Vives-Bauza, C., Starkov, A., Garcia-Arumi, E. Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. *Methods in Cell Biology*, **2007**, Vol. 80, pp. 379-393: Academic Press.
283. Vlase, L., Parvu, M., Parvu, A. E., Toiu, A. Phytochemical analysis of *Allium fistulosum* L. and *A. ursinum* L. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2013**, 8, (1), 457-467.
284. Vlase, L., Parvu, M., Parvu, E. A., Toiu, A., Chemical constituents of three *Allium* species from Romania. *Molecules*, **2012**, 18, (1), 114-27.
285. Vogelstein, B., Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, **2004**, 10, (8), 789-799.
286. von Roon, A.C., Reese, G., Teare, J., Constantinides, V., Darzi, A.W., Tekkis, P.P. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*, **2007**; 50(6):839-855. doi:10.1007/s10350-006-0848-z.
287. Wang, H. C., Pao, J., Lin, S. Y., Sheen, L. Y. Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. *Ann N Y Acad Sci*, **2012**, 1271, 44-52.
288. Watson, P., Vasen, H. F. A., Mecklin, J. P., Bernstein, I., Aarnio, M., Jarvinen, H. J., Myrhoj, T., Sunde, L., Wijnen, J. T., Lynch, H. T. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer*, **2008**, 123, (2), 444-449.
289. Weaver, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*, **2014**, 25, (18), 2677-2681.
290. Weber, N. D., Andersen, D. O., North, J. A., Murray, B. K., Lawson, L. D., Hughes, B. G. *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med*, **1992**, 58, (5), 417-23.
291. Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A. J., Thibodeau, S. N., Jass, J., Haile, R., Laird, P. W. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*, **2006**, 38, (7), 787-93.
292. Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P. R., Büchler, M. W. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)* **2005**, 365, (9454), 153-65.
293. Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Welsh, E. Onychomycosis. *Clin Dermatol*, **2010**, 28, (2), 151-9.
294. Westerberg, D. P., Voyack, M. J. Onychomycosis: Current trends in diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*, **2013**, 88, (11), 762-70.
295. Whiffin, N., Hosking, F. J., Farrington, S. M., Palles, C., Dobbins, S. E., Zgaga, L., Lloyd, A., Kinnersley, B., Gorman, M., Tenesa, A., Broderick, P., Wang, Y., Barclay, E., Hayward, C., Martin, L., Buchanan, D. D., Win, A. K., Hopper, J., Jenkins, M., Lindor, N. M., Newcomb, P. A., Gallinger, S., Conti, D., Schumacher, F., Casey, G., Liu, T., Swedish Low-Risk Colorectal Cancer Study, G., Campbell, H., Lindblom, A., Houlston, R. S., Tomlinson, I. P., Dunlop, M. G. Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Hum Mol Genet*, **2014**, 23, (17), 4729-37.
296. White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics . Academic Press: Cambridge, MA, USA. : PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, **1990**.
297. Wörmann, B. Breast cancer: basics, screening, diagnostics and treatment. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, **2017**, 40, (2), 55-64.
298. Xiang, Y., Zhao, J., Zhao, M., Wang, K. Allicin activates autophagic cell death to alleviate the malignant development of thyroid cancer. *Exp Ther Med*, **2018**, 15, (4), 3537-3543.
299. Xiao, D., Herman-Antosiewicz, A., Antosiewicz, J., Xiao, H., Brisson, M., Lazo, J.S., Singh, S.V. Diallyl trisulfide-induced G(2)-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc 25 C. *Oncogene*, **2005**, 24(41), 6256-6268.
300. Xu, X. Y., Song, G. Q., Yu, Y. Q., Ma, H. Y., Ma, L., Jin, Y. N. Apoptosis and G2/M arrest induced by *Allium ursinum* (ramson) watery extract in an AGS gastric cancer cell line. *OncoTargets and therapy*, **2013**, 6, 779–783.
301. Xu, Y.-S., Feng, J.-G., Zhang, D., Zhang, B., Luo, M., Su, D., Lin, N.-M. S-allylcysteine, a garlic derivative, suppresses proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2014**, 35, (2), 267-274.
302. Yager, J. D., Davidson, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*, **2006**, 354, (3), 270-82.
303. Yamamoto, Y., Aoyama, S., Hamaguchi, N., Rhi, G. S. Antioxidative and antihypertensive effects of Welsh onion on rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem*, **2005**, 69, (7), 1311-7.
304. Yan, Z. J., Roy, D. Mutations in DNA polymerase beta mRNA of stilbene estrogen-induced kidney tumors in Syrian hamster. *Biochem Mol Biol Int*, **1995**, 37, (1), 175-83.
305. Yang, H., Huang, S., Wei, Y., Cao, S., Pi, C., Feng, T., Liang, J., Zhao, L., Ren, G. Curcumin Enhances the Anticancer Effect Of 5-fluorouracil against Gastric Cancer through Down-Regulation of COX-2 and NF- kappaB Signaling Pathways. *J Cancer*, **2017**, 8(18), 3697-3706.
306. Yang, X., Edgerton, S. M., Kosanke, S. D., Mason, T. L., Alvarez, K. M., Liu, N., Chatterton, R. T., Liu, B., Wang, Q., Kim, A., Murthy, S., Thor, A. D. Hormonal and dietary modulation of mammary carcinogenesis in mouse mammary tumor virus-c-erbB-2 transgenic mice. *Cancer Res*, **2003**, 63(10), 2425-33.
307. Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H., Nakagawa, S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol*, **1987**, 53, (3), 615-7.
308. Yue, W., Santen, R. J., Wang, J. P., Li, Y., Verderame, M. F., Bocchinfuso, W. P., Korach, K. S., Devanesan, P., Todorovic, R., Rogan, E. G., Cavalieri, E. L. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2003**, 86, (3-5), 477-86.

309. Yue, W., Yager, J. D., Wang, J. P., Jupe, E. R., Santen, R. J. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*, **2013**, 78, (2), 161-70.
310. Zhang, Q., Yang, D. Allicin suppresses the migration and invasion in cervical cancer cells mainly by inhibiting NRF2. *Exp Ther Med*, **2019**, 17, (3), 1523-1528.
311. Zhang, X. D., Li, W., Zhang, N., Hou, Y. L., Niu, Z. Q., Zhong, Y. J., Zhang, Y. P., Yang, S. Y. Identification of adipophilin as a potential diagnostic tumor marker for lung adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Med*, **2014**, 7, (4), 1190-6.
312. Zhao, J. G., Ren, K. M., Tang, J. Overcoming 5-Fu resistance in human non-small cell lung cancer cells by the combination of 5-Fu and cisplatin through the inhibition of glucose metabolism. *Tumour Biol*, **2014**, 35, (12), 12305-15.
313. Zhen, H., Fang, F., Ye, D.-Y., Shu, S.-N., Zhou, Y.-F., Dong, Y.-S., Nie, X.-C., Li, G. Experimental study on the action of allitridin against human cytomegalovirus in vitro: Inhibitory effects on immediate-early genes. *Antiviral Res*, **2006**, 72, (1), 68-74.
314. Zimta, A.A., Țigu, A.B, Muntean, M., Cenariu, D., Slaby, O., Berindan-Neagoe, I. Molecular Links between Central Obesity and Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. **2019**;20(21):5364. Published 2019 Oct 28. doi:10.3390/ijms20215364
315. Zou, X., Liang, J., Sun, J., Hu, X., Lei, L., Wu, D., Liu, L. Allicin sensitizes hepatocellular cancer cells to anti-tumor activity of 5-fluorouracil through ROS-mediated mitochondrial pathway. *J Pharmacol Sci*, **2016**, 131, (4), 233-40.

Activitate științifică

Articole ISI, în calitate de autor principal (prim-autor, co-prim-autor, corespondent sau ultim-autor), în domeniul tezei de doctorat

Original - Țigu A.B, Toma V.-A, Moț A.C, Jurj A, Moldovan C.S, Fischer-Fodor E, Berindan-Neagoe I, Pârvu M. The Synergistic Antitumor Effect of 5-Fluorouracil Combined with Allicin against Lung and Colorectal Carcinoma Cells. *Molecules* **2020**, 25, 1947. doi: 10.3390/molecules25081947 (IF 3.060)

Original - Pârvu M, Moț C. A, Pârvu A. E, Mircea C, Stoeber L, Roșca-Casian O, Țigu A. B. *Allium sativum* Extract Chemical Composition, Antioxidant Activity and Antifungal Effect against *Meyerozyma guilliermondii* and *Rhodotorula mucilaginosa* Causing Onychomycosis. *Molecules* ,**2019**, 24(21), 3958. (IF 3.060)

Review - Zimta AA#, Țigu A.B#, Muntean M, Cenariu D, Slaby O, Berindan-Neagoe I. Molecular Links between Central Obesity and Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. **2019**;20(21):5364. Published 2019 Oct 28. doi:10.3390/ijms20215364 (IF 4.182)

Original - Toma VA#, Țigu A.B#, Farcaș AD, Sevastre B, Taulescu M, Gherman A. M. R, Roman I, Fischer-Fodor E, Parvu M. New Aspects Towards a Molecular Understanding of the Allicin Immunostimulatory Mechanism via Colec12, MARCO, and SCARB1 Receptors. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3627. doi:10.3390/ijms20153627 (IF 4.182)

Articole ISI, în calitate de co-autor, în domeniul tezei de doctorat

Review - Braicu C, Zanoaga O, Zimta A-A, Țigu A.B, Kilpatrick KL, Bishayee A, Nabavi S.M, Berindan-Neagoe Ioana. Natural compounds modulate the crosstalk between apoptosis- and autophagy-regulated signaling pathways: Controlling the uncontrolled expansion of tumor cells, *Seminars in Cancer Biology*, **2020**. doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.015 (IF 9.658)

Original - Andreicuț AD, Fischer-Fodor E, Pârvu AE, Țigu A.B, Cenariu M, Pârvu M, Cătoi FA, Irimie A. Antitumoral and Immunomodulatory Effect of *Mahonia aquifolium* Extracts. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:6439021. Published 2019 Dec 14. doi:10.1155/2019/6439021 (IF 4.868)

Articole ISI în calitate de co-autor

Review - Desmirean M, Rauch S, Jurj A, Pasca S, Iluta S, Teodorescu P, Berce C, Zimta A.-A, Turcas C, Țigu A.B, Moldovan C, Paris I, Steinheber J, Richlitzki C, Constantinescu C, Sigurjonsson O.E, Dima D, Petrushev B, Tomuleasa C. B Cells versus T Cells in the Tumor Microenvironment of Malignant Lymphomas. Are the Lymphocytes Playing the Roles of Muhammad Ali versus George Foreman in Zaire 1974? *J. Clin. Med.*, **2020**, 9, 3412. (IF 3.303)

Original – Teodorescu P, Pasca S, Jurj A, Gafencu G, Joelsson J-P, Selicean S, Moldovan C, Munteanu R, Onaciu A, Țigu A.B, Buse M, Zimta A-A, Stiufiuc R, Petrushev B, Desmirean M, Dima D, Vlad C, Bergthorsson J.T, Berce C, Ciurea S, Ghiaur G, Tomuleasa C. Transforming growth factor β -mediated micromechanics modulates disease progression in primary myelofibrosis, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020; 00:1-11, **2020**, 10.1111/jcmm.15526, (IF 4.486)

Review - Zimta A-A, Țigu A.B, Braicu C, Ștefan C, Ionescu C, Berindan-Neagoe I. (2020) An Emerging Class of Long Non-coding RNA With Oncogenic Role Arises From the snoRNA Host Genes. *Front. Oncol*. 10:389., **2020**, doi: 10.3389/fonc.2020.00389 (IF 4.137)

Review - Boca S, Gulei D, Zimta A. A, Onaciu A, Magdo L, **Țigu A. B**, Ionescu C, Irimie A, Buiga R, Berindan-Neagoe I. Nanoscale delivery systems for microRNAs in cancer therapy. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 77(6), 1059–1086. (IF 7.014)

Original - Budisan L, Gulei D, Jurj A, Braicu C, Zanoaga O, Cojocneanu R, Pop L, Raduly L, Barbat A, Moldovan A, Moldovan C, **Țigu A. B**, Ionescu C, Atanasov A. G, Irimie A, Berindan-Neagoe I. Inhibitory Effect of CAPE and Kaempferol in Colon Cancer Cell Lines-Possible Implications in New Therapeutic Strategies. IJMS, 2019, 20(5), 1199. (IF 4.183)

Review - Buduru SD, Gulei D, Zimta AA, **Țigu A.B**, Cenariu D, Berindan-Neagoe I. The Potential of Different Origin Stem Cells in Modulating Oral Bone Regeneration Processes. Cells. 2019, 8(1):29. doi:10.3390/cells8010029 (IF 4.892)

Review - Gulei D, Petrut B, **Țigu A.B**, Onaciu A, Fischer-Fodor E, Atanasov AG, Ionescu C, Berindan Neagoe I. Exosomes at a glance - common nominators for cancer hallmarks and novel diagnosis tools. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2018;53(5):564-577. doi:10.1080/10409238.2018.1508276 (IF 5.279)

Participare în proiecte de cercetare:

2020-2022 – Cercetător doctorand în proiectul SEATTLE – Susținerea unei echipe de tineri cercetători pentru dezvoltarea unui program de cercetare independent prin utilizarea protocolului "Sleeping Beauty" pentru dezvoltarea celulelor CAR-T. PN-III-P1-1.1-TE-2019-0271, **director de proiect CSII Dr. Ciprian Tomuleasa.**

2020-2022 – Cercetător doctorand în proiectul Biofortificare cu seleniu: putem crește proprietățile anticolesterolice ale speciilor de Allium? P1-1.1-TE-2019-1396, director de proiect CSIII Dr. Augustin Cătălin Moț.

2020-2021 – Tehnician administrativ în proiectul HE-RO-IS – Cooperare strategică în hematologie. **Proiect SEE, director de proiect CSII Dr. Ciprian Tomuleasa.**

Mai 2019 – Decembrie 2020 - Cercetător doctorand în proiectul ARTEMIS - Genomic mapping of population from polluted area with radioactivity and heavy metals to increase national security – **Director proiect Profesor Dr. Berindan-Neagoe Ioana, UMF Cluj-Napoca.**

Aprilie 2017 – Decembrie 2019 - Cercetător doctorand în proiectul H2020 – REPROGRAM - Targeting epigenetic REPROGRAMming of innate immune cells in Atherosclerosis Management and other chronic inflammatory diseases – **coordonator proiect din partea UMF Cluj-Napoca Profesor Dr. Iancu Adrian, Institutul Inimii Cluj-Napoca.**

Martie 2018 – Noiembrie 2019 - Cercetător doctorand în proiectul PCE-2016-RECONSIDER - The Effect of Glucocorticoid Therapy on Left Ventricular Remodeling in Acute ST Elevation Myocardial Infarction – **Director proiect Profesor Dr. Iancu Adrian, Institutul Inimii Cluj-Napoca.**

Aprilie 2019 – Noiembrie 2019 - Cercetător doctorand în proiectul ECHITAS - Increasing the performance of scientific research and technology transfer in translational medicine through the formation of a new generation of young researchers – **Director proiect Rector: Profesor Dr. Irimie Alexandru**

Școli de vară

1-13 iulie 2019 – Școala de vară "From Genes To Cells: A Basic Course of Molecular, Cellular and Ultrastructural Biology" – Universitatea din Pisa, Pisa, Italia. Absolvită cu 29 de puncte dintr-un maxim de 30.

INDICE HIRSCH

7 (la 05.12.2020) (Google Scholar)

Număr de citări: 84

5 (la 05.12.2020) (Scopus)

Număr de citări: 64

5 (la 05.12.2020) (Web of Science)

Număr de citări: 55

FACTOR DE IMPACT CUMULAT:

62.305 – la data de 02.12.2020

Mulțumiri

Am ajuns în acest punct, în care, după mult efort, alături de colaboratori dedicați, Teza de Doctorat este conturată. Evoluția mea în domeniul științelor biologice nu ar fi fost aceeași fără interacțiunea de-a lungul timpului cu oameni minunați și dedicați meseriei pe care o practică.

Doresc să le mulțumesc în primul rând profesorilor din cadrul Facultății de Biologie și Geologie, oamenii fără de care nu aș fi prins drag, de acest domeniu de activitate minunat, le mulțumesc pentru dăruirea de care au dat dovadă și pentru că sunt alături de tinerii studenți. Mulțumiri speciale dl. Dr. Bogdan Drugă și dl. Prof. Dr. Nicolae Dragoș, care mi-au deschis ușa laboratorului de biologie moleculară din cadrul ICB Cluj-Napoca și alături de care am făcut primii pași în cercetare, finalizând lucrarea de licență ce avea să mă motiveze să merg mai departe.

Astfel, doresc să îi mulțumesc grupului de fiziologie a Facultății de Biologie și Geologie a UBB, pentru că mi-a oferit șansa de a aprofunda cunoștințele din domeniul biologiei și pentru oportunitatea de a învăța ce înseamnă munca în echipă, cum să dezvolt anduranță și cum să capăt încredere în propriile forțe.

Desigur, o influență semnificativă au avut Dr. Raul Moldovan și Dr. Elena Matei, care au fost întâi de toate mentori în timpul stagiului petrecut alături de echipa lor în laboratorul de Controlul Calității din cadrul SC Ferrosan SRL (Parte a Pfizer), iar mai apoi, timp de doi ani s-au dovedit a fi buni colegi în cadrul aceluiași laborator.

Le mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare, Prof. Dr. Manuela Banciu, Conf. Dr. Lucian Barbu-Tudoran și Lector Dr. Augustin-Cătălin Moț, pentru toate sfaturile pe care le-am primit de-a lungul anilor și pentru încrederea acordată.

Mulțumesc doamnei Prof. Dr. Alina Elena Pârvu, pentru eforturile depuse în realizarea studiilor ce sunt prezentate în această lucrare și pentru contribuțiile extraordinare avute la fundamentarea studiilor *in vivo* și la publicarea datelor experimentale.

Doresc să mulțumesc colegilor Dr. Vlad Alexandru Toma și Dr. Anca Daniela Farcaș, pentru colaborarea excelentă din toți acești ani și pentru oportunitatea de a lucra împreună în cadrul grupului condus de Prof. Dr. Marcel Pârvu.

Mulțumesc domnișoarei CSIII Dr. Ancuța Jurj, membră a colectivului Centrului de Genomică al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, pentru răbdarea și priceperea de care a dat dovadă, în vederea realizării studiilor de citometrie de flux.

Mulțumesc echipei de cercetare, din cadrul MedFuture – UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, pentru sprijinul oferit în realizarea studiilor prezentate, pentru sfaturile și criticile pe care le-

am primit, pentru toate momentele frumoase și pentru unitatea de care au dat dovadă în momentele dificile.

Recunoștința și mulțumirile mele se îndreaptă către cel ce a făcut posibilă această Teză de Doctorat, domnul Prof. Dr. Marcel Pârvu, care este mai mult decât un conducător de doctorat. Vă mulțumesc pentru încrederea acordată, pentru răbdarea și calmul cu care ați reușit să mă îndrumați, pentru că sunteți un exemplu pentru tinerii cercetători pe care îi formați și vă mulțumesc nespus pentru colaborarea din toți acești ani.