

**UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**

**EFFECTELE UNOR SUBSTANȚE BIOLOGIC
ACTIVE ASUPRA ORGANISMULUI ANIMAL
ȘI MODULAREA RĂSPUNSULUI IMUN**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. univ. dr. CORNEANU GABRIEL**

**DOCTORAND:
EDIȚOIU CORNELIA DANIELA**

**CLUJ-NAPOCA
2011**

CUPRINS:

INTRODUCERE	4
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR EFECTUATE	7
PARTEA TEORETICĂ	
1. ACTUALITATEA TEMEI INVESTIGATE ȘI GRADUL SĂU ABORDARE	8
1.1. Prezentarea substanțelor biologic active utilizate	9
1.1.1. Principiile active – noțiuni generale.....	9
1.1.2. Biosintеза principiilor active.....	11
1.1.3. Principiile active utilizate.....	12
A. Uleiuri volatile.....	12
B. Poliholoside.....	13
C. Polifenoli și flavone.....	15
D. Alcaloizi.....	18
1.2. Extractia din materialul vegetal	19
1.2.1. Analiza extractului diclorometanic.....	19
1.2.2. Analiza extractului metanolic.....	21
1.2.3. Analiza extractului apos.....	23
1.3. Importanța fitoterapeutică a speciilor <i>Aralia mandshurica</i> și <i>Nigella sativa</i>	24
1.3.1. <i>Aralia mandshurica Rupr. et Maxim</i>	24
A. Date botanice.....	24
B. Date fitochimice.....	27
C. Cercetări efectuate pe plan mondial.....	28
D. Cercetări efectuate în România.....	30
E. Produse medicinale din <i>Aralia mandshurica</i>	31
F. Toxicitate.....	34
1.3.2. <i>Nigella sativa Linn.</i>	35
A. Date botanice.....	35
B. Date fitochimice.....	39
C. Cercetări efectuate pe plan mondial.....	40
D. Cercetări efectuate în România.....	50
E. Produse medicinale din <i>Nigella sativa</i>	52
F. Toxicitate.....	54

1.4. Experimente efectuate pe animale de laborator.....	54
1.5. Răspunsul imun.....	54
1.5.1. Componentele sistemului imun.....	55
1.5.2. Legătura sistemului imun cu organele analizate (ficat și splină).....	59
PARTEA EXPERIMENTALĂ	
2. MATERIALUL BIOLOGIC ȘI METODELE DE INVESTIGAȚIE.....	66
2.1. Materialul biologic.....	66
2.1.1. <i>Mus muscullus</i>	66
2.1.2. Extracte vegetale din plantele <i>Aralia mandshurica</i> și <i>Nigella sativa</i>	70
2.1.3. Deuterium depleted water – <i>DDW</i>	70
2.1.4. Factor de stres – <i>radiații-X</i>	74
2.2. Metode de investigație.....	76
2.2.1. Investigații hematologice	76
2.2.2. Investigații imunologice.....	77
2.2.3. Investigații histologice	79
2.2.4. Investigații ultrastructurale.....	81
2.2.5. Investigații citogenetice.....	83
2.2.5.1. Mutății cromosomiale.....	84
2.2.5.2. Clasificarea aberațiilor cromosomiale.....	87
2.2.5.3. Aberații intracromosomiale.....	88
2.2.5.4. Aberații intercromosomiale.....	90
2.2.5.5. Modificări metabolice ale cromosomilor.....	91
2.2.5.6. Importanța mutațiilor.....	93
3. CERCETĂRI EFECTUATE CU EXTRACTELE OBȚINUTE DIN CORTEXUL PLANTEI <i>ARALIA MANDSHURICA</i>.....	93
3.1. Efectul extractului de ulei volatil	94
a) Investigații hematologice.....	94
b) Investigații imunologice.....	98
c) Investigații histologice – ficat.....	99
- splină.....	108
3.2. Efectul extractului de poliholoside.....	116
a) Determinarea leucogramei.....	116

b) Investigații imunologice.....	119
c) Investigații citogenetice.....	121
3.3. Efectul extractului de polifenoli și flavone.....	126
a) Investigații hematologice.....	126
b) Investigații imunologice.....	130
c) Investigații histologice – ficat.....	132
- splină.....	133
d) Investigații ultrastructurale - ficat.....	135
4. CERCETĂRI EFECTUATE CU EXTRACTELE OBȚINUTE DIN SEMINȚE DE <i>NIGELLA SATIVA</i>.....	147
4.1. Efectul extractului de ulei volatil.....	147
a) Investigații hematologice.....	147
b) Investigații imunologice.....	150
c) Investigații histologice - ficat.....	153
- splină.....	156
4.2. Efectul extractului de poliholoside.....	162
a) Investigații hematologice.....	162
b) Investigații imunologice.....	166
c) Investigații histologice - ficat.....	168
- splină.....	172
d) Investigații citogenetice.....	177
4.3. Efectul extractului de alcaloizi.....	178
a) Determinarea leucogramei.....	178
b) Investigații imunologice.....	182
c) Investigații ultrastructurale – ficat.....	183
d) Investigații citogenetice.....	198
5. DISCUȚII ASUPRA RĂSPUNSULUI IMUN.....	201
6. CONCLUZII.....	209
7. BIBLIOGRAFIE.....	211
LUCRĂRI ELABORATE DIN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT.....	236
ANEXE.....	237

Cuvinte cheie: substanțe biologic active, *Aralia mandshurica*, *Nigella sativa*, efect imunomodulator, efect radioprotector.

Introducere

Plantele sunt surse majore de obținere a unor bio-produse esențiale pentru supraviețuirea întregului regn animal, reprezentând de asemenea, surse de compuși farmaceutici, aromatice și industriali.

În zilele noastre, oamenii sunt bombardati cu mii de substanțe toxice, poluanți și produse nesănătoase, nivelul de sensibilitate în fața bolilor este foarte mare și de aceea, utilizarea plantelor poate reprezenta cea mai bună soluție.

Recent, Organizația Mondială a Sănătății estimează că aproximativ 80% din oamenii din întreaga lume sunt interesați de medicamentele pe bază de plante, utilizarea acestora pentru scopuri medicinale crescând în ultimii 30 de ani.

Plantele medicinale și produsele vegetale au fost întrebuițate de oameni din cele mai vechi timpuri, fără însă a se avea nici cele mai elementare noțiuni despre compoziția lor chimică, despre mecanismele de acțiune, fără a se ști că efectul lor se datorează unor compuși pe care îi conțin, știindu-se doar că o plantă sau alta este bună pentru tratarea uneia sau altei boli.

Studiile interdisciplinare efectuate în ultima perioadă (botanică, chimie analitică, microbiologie, farmacognozie, farmacologie) au permis parcurgerea drumului de la cunoașterea unei specii producătoare, până la elaborarea unei forme farmaceutice folosind specia respectivă ca sursă de principii active.

În România, precum și în numeroase țări, plantele sunt permanent studiate, datorită proprietăților lor terapeutice. Acestea sintetizează atât compuși de bază necesari supraviețuirii lor (din categoria hidraților de carbon, proteinelor și lipidelor), dar și o gamă largă de substanțe organice ce pot fi extrase, datorită importanței semnificative, ca materii prime cu variate aplicații științifice, tehnologice și comerciale.

Pentru elaborarea acestei lucrări și efectuarea experimentelor am colaborat și am fost îndrumată de oameni cu calități profesionale deosebite, cărora doresc să le aduc sincere mulțumiri.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR EFECTUATE

Cercetările experimentale efectuate în prezentul proiect au constat în urmărirea efectelor induse de administrarea unor extracte vegetale obținute din specii de *Aralia mandshurica* și *Nigella sativa*, analizând efectul radioprotector și imunostimulator al acestora asupra structurii și funcției unor organe ale șoareciilor *Mus muscullus*, în două condiții experimentale: în condiții normale, fără intervenția prealabilă a factorului de stres și după intervenția *factorului de stres (radiațiile-X)*.

Obiectivele cercetărilor efectuate:

- studiul efectelor administrării extractelor din cortex de *Aralia mandshurica* asupra unor parametri hematologici, imunologici, citogenetici, structurali și ultrastructurali în condiții normale;
- studiul efectelor administrării extractelor din cortex de *Aralia mandshurica* asupra unor parametri hematologici, imunologici, citogenetici, structurali și ultrastructurali în condiții de stres, radiații-X;
- studiul efectelor administrării extractelor din semințe de *Nigella sativa* asupra unor parametri hematologici, imunologici, citogenetici, structurali și ultrastructurali în condiții normale;
- studiul efectelor administrării extractelor din semințe de *Nigella sativa* asupra unor parametri hematologici, imunologici, citogenetici, structurali și ultrastructurali în condiții de stres, radiații-X;
- studiul efectelor utilizării *DDW* – asupra organismului animal, în condiții normale;
- studiul efectelor utilizării *DDW* – asupra organismului animal, în condiții de stres, radiații-X.

PARTEA TEORETICĂ

1. Actualitatea temei investigate și gradul său de abordare

În ultimul timp, o serie de produse naturale obținute din plante au fost tot mai mult cercetate și investigate din punct de vedere chimic și biologic pentru efectele lor de stimulare a unor funcții ale organismului. O categorie aparte de astfel de extracte obținute din plante o ocupă cele cu calități imunomodulatoare, antiinflamatoare, antioxidantă și care în medicina tradițională a unor țări reprezintă concepte de bază în tehniciile și metodologiile terapeutice ale unor boli.

Aralia mandshurica (*Fam. Araliaceae*) este utilizată datorită proprietăților stimulatorii asupra sistemului nervos central, cardiovascular și imun, posedând activitate antistres-adaptogenă de foarte bună calitate (Maslov. L.N. și Guzarova N.V., 2007).

Nigella sativa (*Fam. Ranunculaceae*) a fost utilizată din antichitate de populațiile din regiunea mediteraneană, mărturii ale utilizării acesteia datând din antichitate și din Evul Mediu - în Vechiul Testament (Isaia: 28), cercetările realizate în timpul Școlii Medicale Greco-Arabe (Abou-Basha I.L., 1995), despre care însuși Mahomed spunea că „vindecă orice boală, cu excepția morții“; posedă proprietăți antitumorale, antibacteriene, antispastice, imunostimulatorii (Bellakhdar I., 1997).

O parte din rezultatele expuse în teză au fost obținute în cadrul grantului finanțat de către CNCSIS „*Studiul efectului și mecanismului de acțiune al unor imunostimulatori și radioprotectori de origine vegetală (Nigella sp., A. mandshurica). Rolul citokinelor în modularea răspunsului organismului*” Grant 2004-2006, nr. 33.062/2004.06.2004, tema 16, cod 292.

1.1. Prezentarea substanțelor biologic active utilizate

1.1.3. Principiile active utilizate

Din întreaga compoziție chimică a celor două specii de plante utilizate în această lucrare, am ales doar câteva principii active, care prezintă un anumit interes terapeutic, și anume: ulei volatil, poliholoside, polifenoli și alcaloizi.

A. Uleiurile volatile sunt substanțe lichide, insolubile în apă, solubile în solvenți organici sau grăsimi, cu aromă puternică, care se evaporă total, nu lasă pete grase și care se obțin fie prin distilare cu vapozi de apă, fie prin presare.

B. Poliholosidele sunt compuși macromoleculari, liniari sau ramificați, alcătuiți din peste 10 molecule de oze sau derivați (acizi uronici). Poliholosidele reprezintă o clasă de principii active pentru care cercetări recente, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, au evidențiat reale calități imunostimulatoare.

C. Polifenolii sunt un grup de substanțe chimice aromatice, în a căror structură se întâlnesc unul sau mai multe nuclee aromatice simple sau condensate; sunt substanțe cu certe proprietăți antioxidantă, antibacteriene și antifungice, foarte răspândite în regnul vegetal. Polifenolii sunt antioxidați naturali, de mare interes în ultimii ani, datorită acțiunii radioprotectoare pe care o manifestă, alături de alte componente (flavone, antociană) (Gatea F. și colab., 2006).

Flavonele (Flavonoidele) sunt compuși fenolici naturali, care predomină în plantele superioare; se găsesc în flori, fructe, tulipani, rădăcini, scoarța copacilor, fiind localizate în sucul vacuolar și în cromoplaste. În afară de proprietățile lor de renume antiinflamatoare și antioxidantă, flavonoide sunt, de asemenea, capabile de activare a genelor (Baker M.E., 1998), mutații ale ADN-ului și reparării (Ferguson L.R., 2001).

D. Alcaloizii sunt substanțe organice heterociclice cu azot, de origine vegetală, cu caracter bazic, rezultate în urma metabolismului secundar al plantelor; conțin în moleculă lor carbon, hidrogen, azot și de cele mai multe ori oxigen. Aceste substanțe al căror atom de azot face parte frecvent din heterociclu au o structură chimică foarte diferită. Constituie un grup foarte heterogen din punct de vedere chimic care, deși toxice, în doze mici se folosesc în terapia unor afecțiuni, având o acțiune calmantă, anestezică și curativă.

1.3. Importanța fitoterapeutică a speciilor *Aralia mandshurica* și *Nigella sativa*

1.3.1. *Aralia mandshurica Rupr. et Maxim.*

A. Date botanice

Încadrarea sistematică a plantei *Aralia mandshurica* Rupr. et Maxim (Sârbu A., 1999): Încrengătura *Magnoliophyta*, Clasa *Magnoliatae* (*Dicotiledonatae*), Ordin *Araliales*, Familia *Araliaceae*, Genul *Aralia*, Specia *Aralia mandshurica*.

Fam. *Araliaceae* cuprinde 55 genuri, în care sunt incluse aproximativ 800 specii (Pîrvu C., 1997), plante dicotiledonate arborescente și arbustive, rar erbacee, raspândite în regiunile tropicale, subtropicale și puțin în cele temperate (Wen J., 2001). Denumirea genului *Aralia* provine de la denumirea indiană a plantei; *mandshurica*, de la regiunea istorică din nord-estul Chinei - Mandshuria (Manchuria, Mandschuria), numită și Dong San Shen – care indică locurile de creștere spontană a plantei.



Figura 1. *Aralia mandshurica*.



Figura 2. *Aralia mandshurica*.

B. Date fitochimice

Rădăcinile, scoarța, frunzele și fructele de *A. mandshurica* conțin saponozide triterpenice, alcaloizi, flavonoide, cumarine și substanțe tanante. Rădăcina plantei conține saponozide triterpenice - *aralozide* (4,7%), *ulei volatil* (0,12%), *flavonozide*, *rășini* și *alcaloidul aralin* (Zagnat M., 2004, Lutomski J., 1986), separându-se aralozidele *A*, *B*, *C*.

1.3.2. *Nigella sativa Linn.*

A. Date botanice

Încadrare taxonomică a speciei *Nigella sativa* L. (Pârvu C., 1997): Încrengătura *Magnoliophyta*, Clasa *Magnoliatae* (*Dicotiledonatae*), Ordinul *Ranunculale*, Familia *Ranunculaceae*, Genul *Nigella*, Specia *Nigella sativa*.

Denumirea genului *Nigella* provine de la latinescul “*niger*” = negru, datorită culorii semințelor; popular se numește *negruișcă* sau *negrilică*.

Primele referințe cu privire la această plantă au fost găsite în Vechiul Testament în cartea lui Isaia 28: 25, 27 (Bellakhdar I., 1997). Hipocrate, supranumit părintele medicinei, a spus că *Nigella sativa* este remediu pentru bolile de ficat și a dereglařilor

metabolice. Cercetările cu privire la acestă plantă au fost realizate din timpul Scolii Medicale Greco-Arabe (reprezentată prin Galenus și Ibn Sina) și continuă până în zilele noastre. În cartea „*Canonul Medicinei*“, Ibn Sina (980-1037) vorbește despre semințele de *Nigella* drept „stimulente ale energiei organismului, cele care ajută la recâștigarea echilibrului după oboseală și dezamăgire“ (Abou-Basha I.L. și colab., 1995).



Figura 3. *Nigella sativa*.



Figura 4. *Nigella sativa*.

B. Date fitochimice

Semințele de *Nigella sativa* sunt o sursă bună de ulei și proteine; analiza chimică a semințelor a arătat o compoziție de proteine de 20,85%, de grăsimi 38,20%, umiditate de 4,64%, cenușă 4,37%, fibră brută 31,94% și carbohidrați 31,94% (Al-Jassir M.S., 1992), elementele predominante fiind potasiu, fosfor, sodiu și fier, în timp ce zinc, calciu, magneziu, mangan și cupru au fost descoperite la nivelurile inferioare. Conținutul de aminoacizi este de aproximativ 30% din conținutul total de proteine, în timp ce aproximativ 84% din acizi grași reprezintă acizi grași nesaturați, în special acizii linoleic și oleic (Al-Jassir M.S., 1992, Nergiz C. și Otles S., 1993). Extractul uleios din semințe conține de asemenea cantități semnificative de steroli, β -sitosterol fiind dominant (69%), în timp ce campesterol și stigmasterol constituie 12% și respectiv 19% din totalul de steroli, mai conține polifenoli și tocoferoli (Nergiz C. și Otles S., 1993).

PARTEA EXPERIMENTALĂ

2. MATERIALUL BIOLOGIC ȘI METODELE DE INVESTIGAȚIE

2.1. Materialul biologic

2.1.1. *Mus muscullus*

În cazul de față au fost utilizate animale tinere, sănătoase de *Mus muscullus*, având cca 25-30 g/exemplar. Animalele folosite pentru experimente au fost întreținute în condiții de laborator, fiindu-le asigurată hrana corespunzătoare și apă „*ad libitum*“.

Animalele au fost injectate intraperitoneal, odată la două zile, cu 0,5 ml soluție apoasă din extractul vegetal, diluat în apă distilată sau apă sărăcită în deuteriu (DDW).

Înaintea iradierii-X au fost administrate trei injecții, iar după iradierea-X a animalelor două injecții, sacrificarea animalelor efectuându-se la o zi de la ultima injecție și fiind recoltat materialul biologic pentru investigații hematologice, imunologice, structurale, ultrastructurale și citogenetice.

Experimentele s-au efectuat pe 16 variante de animale, după cum urmează:

1. Varianta martor neiradiat:

- martor = M;
- apă distilată (AD) = M-AD;
- apă sărăcită în deuteriu (DDW) = M-DDW;

2. Varianta martor iradiat:

- martor = M-X;
- apă distilată (AD) = M-AD-X;
- apă sărăcită în deuteriu (DDW) = M-DDW-X;

3. Varianta tratată cu ulei volatil din *Aralia mandshurica*, neiradiată:

- apă distilată (AD) = UA-AD;
- apă sărăcită în deuteriu (DDW) = UA-DDW;

4. Varianta tratată cu ulei volatil din *Aralia mandshurica*, iradiată:

- apă distilată (AD) = UA-AD-X;
- apă sărăcită în deuteriu (DDW) = UA-DDW-X;

5. Varianta tratată cu poliholoside din *Aralia mandshurica*, neiradiată:

- apă distilată (AD) = PA-AD;
- apă sărăcită în deuteriu (DDW) = PA-DDW;

6. Varianta tratată cu poliholoside din *Aralia mandshurica*, iradiată:
 - apă distilată (AD) = PA-AD-X;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = PA-DDW-X;
7. Varianta tratată cu polifenoli și flavone din *Aralia mandshurica*, neiradiată:
 - apă distilată (AD) = PFA-AD;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = PFA-DDW;
8. Varianta tratată cu polifenoli și flavone din *Aralia mandshurica*, iradiată:
 - apă distilată (AD) = PFA-AD-X;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = PFA-DDW-X;
9. Varianta tratată cu ulei volatil din *Nigella sativa*, neiradiată:
 - apă distilată (AD) = UN-AD;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = UN-DDW;
10. Varianta tratată cu ulei volatil din *Nigella sativa*, iradiată:
 - apă distilată (AD) = UN-AD-X;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = UN-DDW-X;
11. Varianta tratată cu poliholoside din *Nigella sativa*, neiradiată:
 - apă distilată (AD) = PN-AD;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = PN-DDW;
12. Varianta tratată cu poliholoside din *Nigella sativa*, iradiată:
 - apă distilată (AD) = PN-AD-X;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = PN-DDW-X;
13. Varianta tratată cu extract acid de alcaloizi din *N. sativa*, neiradiată:
 - apă distilată (AD) = AAN-AD;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = AAN-DDW;
14. Varianta tratată cu extract bazic de alcaloizi din *N. sativa*, neiradiată:
 - apă distilată (AD) = ABN-AD;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = ABN-DDW;
15. Varianta tratată cu extract acid de alcaloizi din *N. sativa*, iradiată:
 - apă distilată (AD) = AAN-AD-X;
 - apă sărăcită în deuteriu (DDW) = AAN-DDW-X;
16. Varianta tratată cu extract bazic de alcaloizi din *N. sativa*, iradiată:
 - apă distilată (AD) = ABN-AD-X;

- apă sărăcită în deuteriu (DDW) = ABN-DDW-X;

2.1.2. Extracte vegetale din *Aralia mandshurica* și *Nigella sativa*

Pentru realizarea experimentelor am utilizat următoarele extracte:

- *Aralia mandshurica*: - ulei volatil;
 - poliholoside;
 - polifenoli și flavone.
- *Nigella sativa*: - ulei volatil;
 - poliholoside;
 - alcaloizi.

Fiecare extract a fost diluat în apă distilată și în apă sărăcită în deuteriu, apoi injectat intraperitoneal animalelor de experiență.

2.1.3. Apa sărăcită în deuterium (ASD)/apă superușoară /(Deuterium Depleted Water – DDW)

Cercetări privind efectele biologice ale apei cu conținut redus de deuteriu au demonstrat rezultate benefice spectaculoase, în sensul că o scădere a deuteriului din organisme (vegetale, animale și sau umane) îmbunătățește performanța metabolică (Nedelcu I. și colab., 2002). Această apă are aspect fizic de lichid incolor, cu gust de apă plată, cu conținut redus în ioni și conținut scăzut în izotopul hidrogen – **deuterium** – adică este o apă super ușoară, hipotonă hipodeuterizantă.

2.1.4. Factorul de stres radiații-X

În cazul acestor experimente, factorul de stres a fost reprezentat de radiații-X eliberate un aparat RAP-150/300 (ex URSS), în doză unică, acută la parametrii: 250 kV, 5mA, rata dozei 52,8 R/min, doza totală acută 528 R (5,28 Gy), d.f.=500 mm, filtru 1 mm Al. De menționat că iradierea-X sau iradierea gamma, sunt folosite frecvent ca principal factor de stres, față de care este analizată activitatea imunostimulatoare sau protectoare a diferenților factori de stres.

2.2. Metode de investigație:

2.2.1. Investigații hematologice - Analiza hemoleucogrammei ne oferă informații cu privire la modul de formare a celulelor figurate ale sângeului și modalitate lor de funcționare, dar și gradul de afectare al măduvei hematogene.

2.2.2. Investigații imunologice - Putem observa implicarea imunoglobulinelor în neutralizarea toxinelor și a altor factori exogeni (IgG), implicarea în apărarea imună (IgM) și implicarea la nivelul mucoaselor, constituind efectul principal al sistemului imunologic secretor (IgA).

2.2.3. Investigații histologice – Analiza structurală a celulelor și țesuturilor permite descifrarea structurală și stadiul de funcționare al organelor cercetate.

2.2.4. Investigații ultrastructurale - Studiul celulelor și țesuturilor pe secțiuni ultrafine participă la înțelegerea organizării ultrastructurale a materiei vii și a proceselor intime care au loc în substratul material al vieții

2.2.5. Investigații citogenetice – Realizează diagnosticarea unor maladii cromosomiale, studiul malformațiilor congenitale (din punct de vedere genetic) și studiul efectului genetic al agenților mutageni cu consecințe din cele mai grave asupra speciei umane.

3. CERCETĂRI EFECTUATE ASUPRA EXTRACTELOR OBTINUTE DIN CORTEXUL PLANTEI *ARALIA MANDSHURICA*

Investigațiile efectuate au constat din analiza a trei extracte (ulei volatil, poliholoside, polifenoli și flavone) din cortexul plantei *Aralia mandshurica* administrate intraperitoneal șoarecilor.

Substanțele de cercetat au fost diluate în proporție de 1% din extractul brut obținut, diluțiile obținute fiind în apă distilată, respectiv în apă sărăcită în deuteriu (DDW), apoi administrate intraperitoneal.

Pentru substanțele folosite, testarea a fost făcută pe 6 variante de animale, în două condiții experimentale: în condiții normale fără intervenția prealabilă a factorului de stres și după intervenția factorului de stres (*radiațiile-X*). În perioada administrării substanțelor testate nu s-au observat modificări esențiale în comportamentul animalelor testate cu substanțe de cercetat, față de cele ale variantelor martor.

3.1. Efectul extractului de ulei volatil

a) Investigații hematologice

În tabelele 1 și 2 sunt prezentate valorile înregistrate pentru componentele hemoleucogrammei, la *M. musculus* pentru variantele tratate cu extractul diluat cu apă distilată, respectiv cu apă sărăcită în deuteriu.

În cazul hematocritului – pentru varianta M-X scade valoarea, iar pentru variantele tratate cu apă distilată, respectiv DDW s-au înregistrat valori aproximativ egale pentru variantele neiradiate, cât și iradiate. La variantele iradiate și tratate cu ulei volatil din rădăcini de *A. mandshurica* se înregistrează o ușoară scădere a numărului de hematii pentru diluția cu apă distilată și o ușoară creștere a numărului de hematii pentru diluția cu DDW, creștere înregistrată și pentru varianta martor nefiltrată; acest fapt se datorează distrugerii măduvei osoase, datorită iradierii. Comparativ cu variantele martor neiradiate numărul de leucocite scade semnificativ la variantele iradiate. Megakariocitele, precursoarele trombocitelor au rol în imunitatea nespecifică; față de creșterea numărului de trombocite pentru varianta M-X, se înregistrează o ușoară scădere a numărului de trombocite la variantele iradiate față de variantele neiradiate, în cazul diluției cu apă distilată și o scădere semnificativă a numărului de trombocite la variantele iradiate, față de variantele neiradiate, în cazul

diluției cu DDW. Se observă creșterea numărului de neutrofile la toate variantele iradiate, comparativ cu variantele neiradiate, creștere mai puțin relevantă pentru variantele tratate cu uleiul volatil. Numărul de eozinofile este ușor crescut la varianta M-AD-X față de varianta neiradiată; la varianta M-DDW-X se înregistrează aceleași valori ca și la varianta neiradiată, iar în cazul variantelor tratate cu ulei volatil valorile sunt aproximativ aceleași la variantele neiradiate, comparativ cu variantele iradiate. Bazofilele sunt absente la toate variantele, caracter normal pentru șoareci de laborator. Scade numărul de limfocite la toate variantele iradiate, o scădere mai mică înregistrată la varianta UA-DDW-X, comparativ cu toate celealte variante (fig. 5); în cazul variantelor iradiate și tratate cu ulei volatil se observă o scădere nesemnificativă a numărului de monocite, mai ales pentru varianta UA-DDW-X, deci, uleiul volatil diluat în DDW este mai eficient decât în apă distilată (Corneanu C., 2006a).

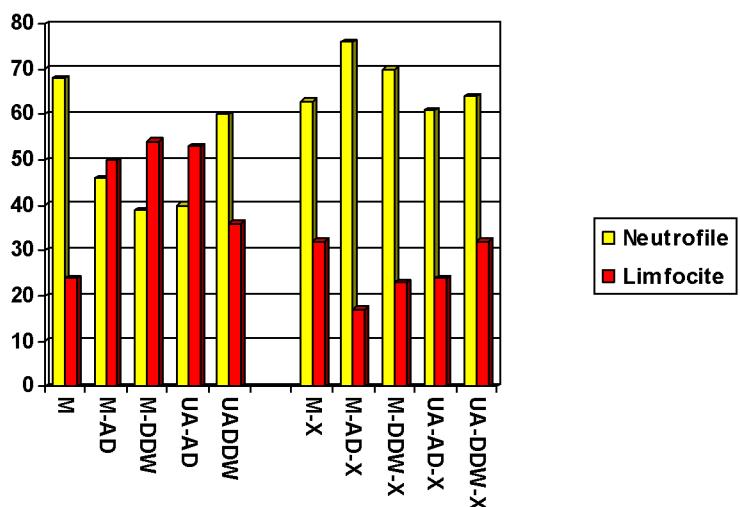


Figura 5. Grafic comparativ între loturile martor și cel tratat cu ulei volatil din *Aralia mandshurica* neiradiate și cele iradiate, privind determinările de neutrofile și limfocite.

Tabel 1. Analiza hemoleucogrammei la *Mus muscullus*, varianta neiradiată.

Varianță neiradiată	Hematocrit %	Hematii mil/mm ³	Leucocite nr/mm ³	Trombocite nr/mm ³	Neutrofile %	Eosinofile %	Basofile %	Limfocite %	Monocite %
M	12,5	4500000	8500	400000	68	3	0	24	5
M-AD	12,8	5000000	6000	700000	46	1	0	50	3
M-DDW	12,0	3900000	7000	850000	39	2	0	54	5
UA-AD	11,8	4000000	5000	400000	40	0	0	53	7
UA-DDW	13,0	4300000	5500	700000	60	0	0	36	4
Valori de referință									
C.Pârvu 1982	38,7-47,1	7-9 mil	6300-15500	220000-700000	10-35	0,5-2	0	27-88	1
I.Marcus, 2004	36-49	7-125,5 mil	6000-15000	160000-410000	10-40	0-4	0-0,3	55-95	0,1-3

Tabel 2. Analiza hemoleucogrammei la *Mus muscullus*, varianta iradiată.

Varianță iradiată	Hematocrit %	Hematii mil/mm ³	Leucocite nr/mm ³	Trombocite nr/mm ³	Neutrofile %	Eosinofile %	Basofile %	Limfocite %	Monocite %
M-X	12	5000000	8000	450000	63	2	0	32	3
M-AD-X	12,8	4300000	2000	320000	76	3	0	17	4
M-DDW-X	12,9	4800000	1500	400000	70	2	0	23	5
UA-AD-X	11,6	2900000	4500	350000	61	0	0	24	5
UA-DDW-X	13,0	5000000	3500	500000	64	1	0	32	3

b) Investigații imunologice

În următoarele tabelele 3 și 4 sunt prezentate valorile înregistrate pentru imunoglobuline, la *M. muscullus*, pentru variantele tratate cu extractul diluat cu apă distilată, respectiv cu apă sărăcită în deuteriu.

Tabel 3. Analiza imunoglobulinelor la variantele neiradiate de *Mus muscullus*.

Varianta neiradiată	IgG (mg/ml)	IgM (mg/ml)	IgA (mg/ml)	Hemoliză
M	4,2	0,8	2,5	
M-AD	12,0	2,0	3,0	
M-DDW	10,0	1,7	2,6	hemoliză
UA-AD	1,8	1,9	2	
UA-DDW	4,2	0,8	2,5	hemoliză intensă
Valori de referință				
Anonymus	0,1-1	1-10	1-3	

Tabel 4. Analiza imunoglobulinelor la variantele iradiate de *Mus muscullus*.

Varianta iradiată	IgG (mg/ml)	IgM (mg/ml)	IgA (mg/ml)	Hemoliză
M-X	1,4	0,4	2	
M-AD-X	11,0	2,4	3,8	ușoară hemoliză
M-DDW-X	7,0	3,0	3,5	
UA-AD-X	4	2,3	3,2	
UA-DDW-X	1,4	0,4	2,0	hemoliză intensă

Imunoglobulinele de tip IgG sunt implicate în neutralizarea toxinelor și a altor factori exogeni. La variantele martor tratate cu apă distilată, respectiv DDW se observă o creștere a valorilor IgG, atât pentru variantele neiradiate, cât și pentru cele iradiate, față de varianta martor neiradiată cât și cea iradiată; la animalele iradiate, scăderea valorii IgG este mai accentuată la varianta M-DDW-X. La varianta UA-AD-X se înregistrează o creștere a valorii IgG, în schimb pentru varianta UA-DDW-X se înregistrează scăderea valorii IgG.

3.2. Efectul extractului de poliholoside

c) Investigații citogenetice

Ca rezultat al iradierii X, procentul PCD a fost de 12% la varianta M-AD-X, iar pentru varianta M-DDW-X nu s-a înregistrat nici o valoare. În cazul iradierii X, gaps-urile au avut drept cauză principală procese de decondensare a fibrelor de cromatină.

Procesul de diviziune centromerică prematură a fost însoțit de o decondensare a regiunii centromerice, care poate constitui o predispoziție la acest fenomen.

În cazul animalelor la care a fost administrat intraperitoneal, înaintea și după iradierea X soluții apoase de extract de poliholoside din cortex de *Aralia mandshurica*, procentul de metafaze anormale și de fragmente acentrice prezente la 100 metafaze a înregistrat valori mai scăzute, subliniind efectul protector al acestei substanțe bioactive; valori mai scăzute au fost obținute în cazul administrării extractului de poliholoside în DDW, de unde efectul protector înregistrat de această combinație. Procesul PCD poate fi parțial, atunci când afectează câțiva cromosomi (1-3) din placa metafazică sau poate fi total, atunci când afectează toți cromosomii din placa metafazică (fig. 6).

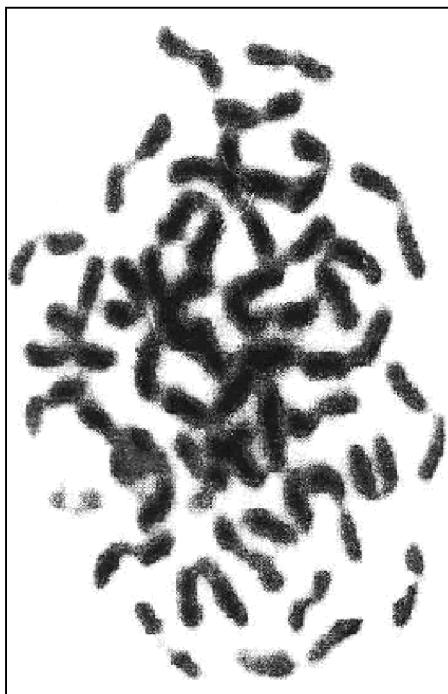


Figura 6. Metafază cu diviziune centromerică prematură totală.

Au fost constatate metafaze poliploide, precum și metafaze hipoploide cu fuziuni centromerice și cromosomi extinși sau metafaze cu majoritatea cromosomilor cu diviziune centromerică prematură și cu două fragmente acentrice (A) (fig. 7).



Figura 7. Metafază cu majoritatea cromosomilor cu diviziune centromerică prematură și cu două fragmente acentrice (A).

3.3. Efectul extractului de polifenoli și flavone

c) Investigații histologice

Ficatul: PFA-DDW: Ficatul prezintă degenerescență granulo-vacuolară, hiperemie vasculară (fig. 8).

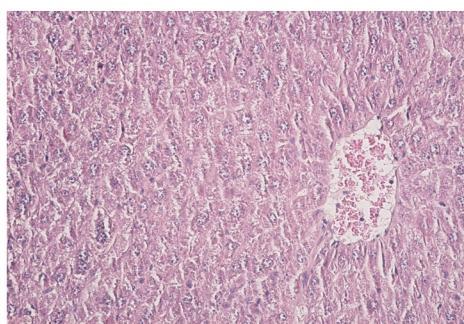


Figura 8. Ficat de șoarece cu degenerescență granulo-vacuolară (oc. 10 x ob. 20).

PFA-DDW-X: Ficatul prezintă hipertrofia ușoară a nucleilor hepatocitelor, cu zone de degenerescență granulo-vacuolară (degenerescență granulară focală, fig. 9); de asemenea se evidențiază dilatarea venelor centrolobulare; nucleul hepatocitelor își păstrează membrana nucleară integră, cu condensare neomogenă a cromatinei, unii cu nucleoli proeminenți.

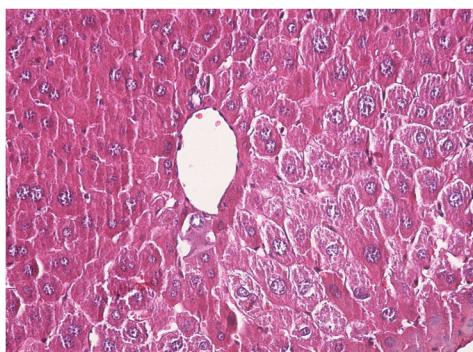


Figura 9. Ficat de șoarece cu degenerescență granulo-vacuolară (oc. 10 x ob. 40).

Splina: PFA-DDW: La nivelul splinei se observă hipertrofia pulpei albe, rare celule cu atipii nucleare, numeroși foliculi cu centri germinativi (fig. 10).

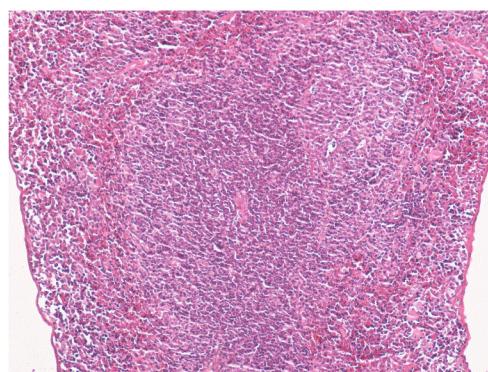


Figura 10. Splina de șoarece cu numeroși foliculi cu centri germinativi (oc. 10 x ob. 10).

PFA-DDW-X: Splina prezintă atrofia marcată a pulpei albe evidențiată prin prezența unor foliculi splenici mici și rari (fig. 11). Se observă hipertrofia marcată a pulpei roșii prin dilatarea intensă a capilarelor sinusoide și cu prezența de numeroase megakariocte. La nivel interstitial, septurile fibro-conjunctive apar inegale, unele hipertrofiate, altele de aspect normal.

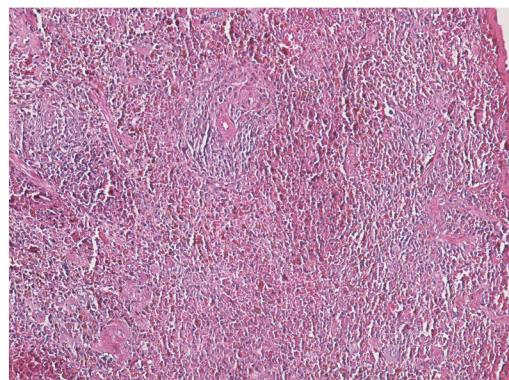


Figura 11. Splina de șoarece cu atrofia pulpei albe
(oc. 10 x ob. 20).

d) Investigații ultrastructurale ale ficatului:

Varianta M-DDW: Hepatocitele reacționează la prezența DDW care, fiind o substanță exogenă afectează metabolismul celular (fig 12), observându-se mici picături lipidice. Nucleul prezintă învelișul nuclear ondulat, se evidențiază o proliferare a reticulului endoplasmic neted, având rol în detoxifiere și mici picături de glicogen. Mitocondriile prezintă matricea lizată în zona centrală și criste puține.

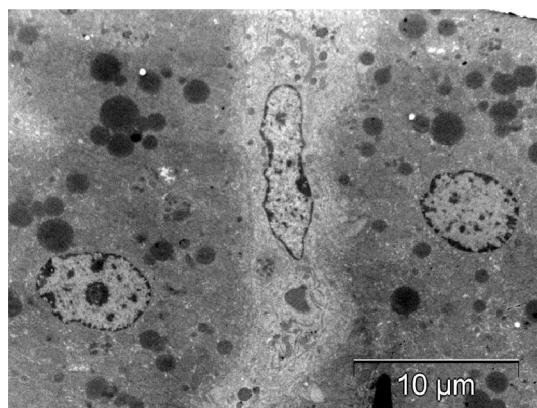


Figura 12. Hepatocit, capilar sinusoid și celula Ito: aspect ultrastructural.

Varianta PFA-DDW: Hepatocitele prezintă structură normală (fig. 13), cu numeroase picături de lipide, glicogenul este practic absent; nucleu are aspect normal, organitele celulare au structură normală. Celulele Ito prezintă picături lipidice în număr foarte mic, practic absent; celulele Kupffer au lisosomi, hematină și în general materialul celular este distrus, iar capilarele fără procese de stază.

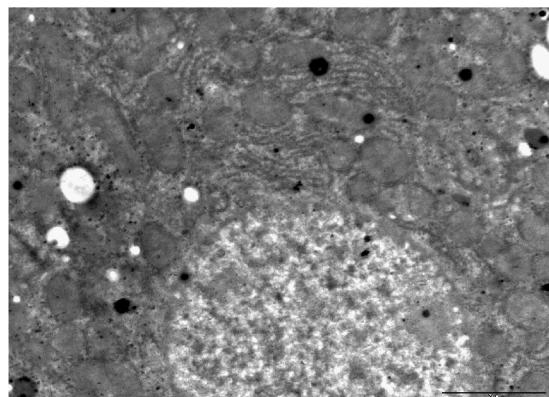


Figura 13. Hepatocit cu structură normală.

Varianta M-DDW-X: Leziunile induse de razele X sunt limitate, mitocondriile au aspect normal, se observă picături de lipide în număr redus, deoarece DDW acționează ca o capcană pentru radicalii liberi. Hepatocitele prezintă lisosomi și resturi fagocitate (fig. 14); prezența acestora confirmă capacitatea extractului de polifenoli și flavone de a anihila alterările produse de radiațiile X și de a menține o activitate metabolică normală în hepatocite.

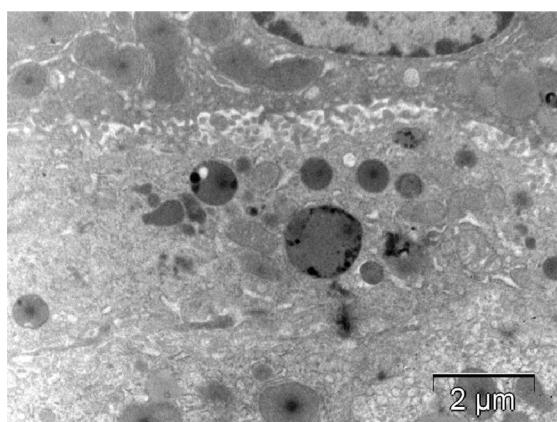


Figura 14. Hepatocit cu lisosomi și resturi fagocitate.

Varianta PFA-DDW-X: Hepatocitele (fig. 15) prezintă o structură similară cu varianta martor. În celulele Kupffer sunt prezenti lisosomi primari și secundari cu reziduuri celulare (fagocite cu resturi celulare distruse). Unele capilarele sinusoide sunt ușor congestionate; se evidențiază microvili proeminente în spațiul Disse. Extractul de polifenoli și flavone oferă protecție totală față de raze X.

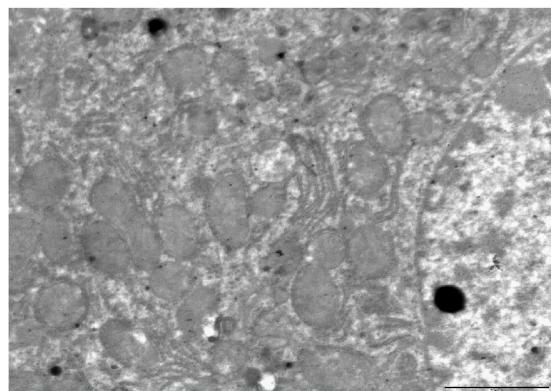


Figura 15. Hepatocit normal, cu reticul endoplasmic și mitocondrii.

4. CERCETĂRI EFECTUATE ASUPRA EXTRACTELOR OBȚINUTE DIN SEMINȚELE PLANTEI *NIGELLA SATIVA*

4. 1. Efectul extractului de ulei volatil

a) Investigații hematologice

În tabelele 5 și 6 sunt prezentate valorile înregistrate pentru componentele hemoleucogrammei, la *Mus musculus*, la variantele tratate cu extractul din semințe de *Nigella sativa*, diluat cu apă distilată, respectiv cu apă sărăcită în deuteriu.

Pentru variantele tratate cu ulei volatil și iradiate, hematocritul înregistrează o creștere nesemnificativă față de cele neiradiate, pentru ambele populații de plante; în cazul variantei UN-AD-X crește numărul de hematii, iar la varianta UN-DDW-X se înregistrează o scădere a numărului de hematii, pentru plantele populația Maroc și o scădere a hematiilor la cele două variante pentru populația Craiova. Numărul de leucocite scade semnificativ pentru varianta UN-AD-X (la ambele populații de plante) și mai puțin pentru varianta UN-DDW-X. În cazul trombocitelor, la variantele iradiate se observă o scădere a numărului de trombocite, scădere mai semnificativă pentru populația Craiova; numărul de neutrofile crește foarte mult pentru variantele iradiate, scade foarte mult numărul de limfocite și scade ușor numărul monocitelor pentru populația Maroc (fig.83) și înregistrează o creștere a numărului de monocite la varianta UN-DDW-X, populația Craiova.

Uleiul volatil poate fi folosit ca un agent natural radioprotector împotriva efectelor oxidative și imunosupresoare ale radiațiilor ionizante (Assayed M.E., 2010).

Rezultatele obținute de la diferite sisteme experimentale sugerează capacitatea radioprotectoare a extractului etanic de *Nigella sativa* implicând prevenirea daunelor oxidative induse de radiații (Rastogi L., 2010).

Tabel 5. Analiza hemoleucogramei la *Mus muscullus*, varianta neiradiată.

Varianta neiradiată	Hematocrit %	Hematii mil/mm ³	Leucocite nr/mm ³	Trombocite Nr/mm ³	Neutrofile %	Eosinofile %	Basofile %	Limfocite %	Monocite %
M	12,5	4500000	8500	400000	68	3	0	24	5
M-AD	12,8	5000000	6000	700000	46	1	0	50	3
M-DDW	12,0	3900000	7000	850000	39	2	0	54	5
Populația Maroc									
UN-AD	12,0	4500000	7000	900000	7	0	0	90	3
UN-DDW	12,3	5100000	6000	650000	19	0	0	79	2
Populația Craiova									
UN-AD	11,9	4900000	6500	750000	50	1	0	44	5
UN-DDW	12,8	5000000	6000	780000	56	0	0	40	4

Tabel 6. Analiza hemoleucogramei la *Mus muscullus*, varianta iradiată.

Varianta iradiată	Hematocrit %	Hematii mil/mm ³	Leucocite nr/mm ³	Trombocite nr/mm ³	Neutrofile %	Eosinofile %	Basofile %	Limfocite %	Monocite %
M-X	12	5000000	8000	450000	63	2	0	32	3
M-AD -X	12,8	4300000	2000	320000	76	3	0	17	4
M-DDW-X	12,9	4800000	1500	400000	70	2	0	23	5
Populația Maroc									
UN-AD-X	13,0	5000000	2000	800000	70	1	0	27	2
UN-DDW-X	12,8	4300000	4000	500000	55	0	0	44	1
Populația Craiova									
UN-AD-X	13,2	4800000	1600	600000	58	1	0	39	3
UN-DDW-X	12,6	4200000	2000	280000	56	2	0	34	6
Valori de referință									
C.Pârvu, 1982	38,7-47,1	7-9 mil	6300	220000-700000	10-35	0,5-2	0	27-88	1
I.Marcus, 2004	36-49	7-12,5 mil	6000-15000	160000-410000	10-40	0-4	0-0,3	55-95	0,1-3,5

c) Investigații histologice

UN-AD: Ficatul prezintă arhitectura pațial păstrată, cu ectazii vasculare, hiperemie (fig. 16) și modificări nucleare mai accentuate decât la celelalte substanțe.

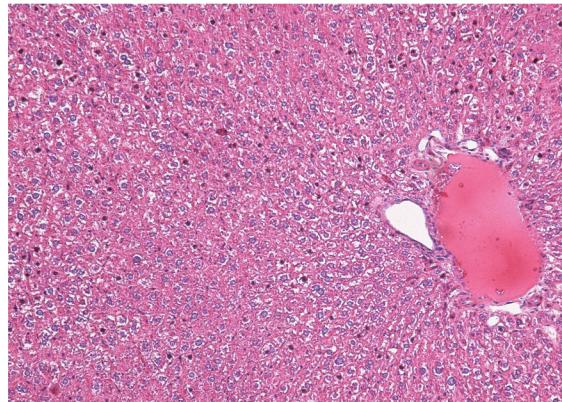


Figura 16. Ficat de șoarece cu ectazie vasculară și hiperemie
(oc. 10 x ob. 10).

UN-DDW: Ficatul prezintă aspect neomogen, cu spații porte dilatate, alternând cu zone cu îngustarea spațiilor porte și modificări nucleare preapoptotice (fig. 17), zone cu proliferarea vaselor interstitiale, cu aspect ramnificat; zone cu vase dilatate și ramificate, aspect de „coarne de cerb“.

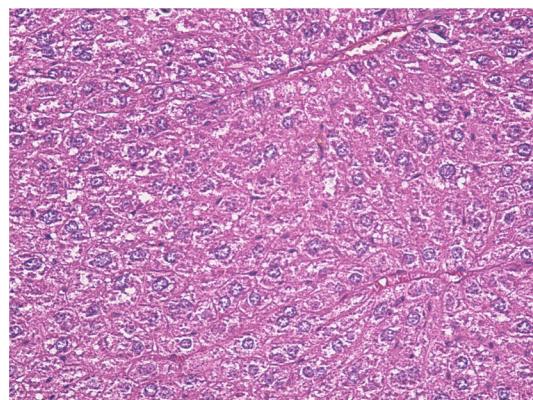


Figura 17. Ficat de șoarece cu modificări nucleare preapoptotice
(oc. 10 x ob. 20).

UN-AD-X: Ficatul prezintă modificări nucleare severe la nivelul hepatocitelor, cu hiperemie vasculară (fig. 18).

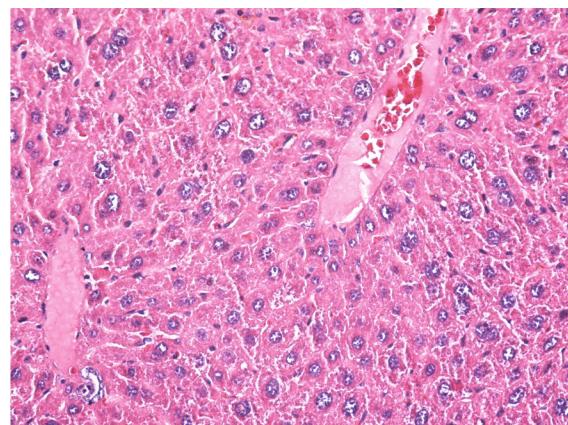


Figura 18. Ficat de șoarece cu hiperemie vasculară
(oc. 10 x ob. 20).

UN-DDW-X: Ficatul prezintă modificări nucleare moderate și severe, dar și zone cu dilatarea spațiilor porte și hiperemie vasculară (fig. 19).

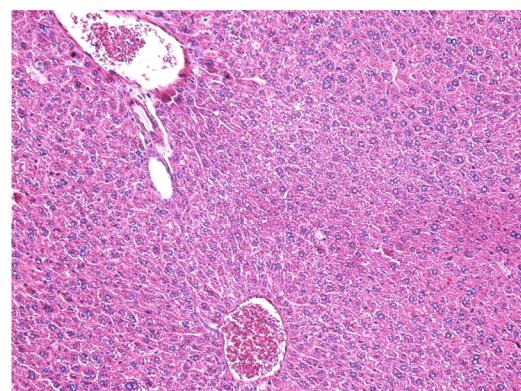


Figura 19. Ficat de șoarece cu zone cu dilatarea spațiilor porte
(oc. 10 x ob. 10).

Splina: UN-AD: La nivelul splinei se observă hipertrofia septurilor fibroconjunctive; hipertrofia pulpei albe, hiperplazia pulpei roșii cu proliferarea megakariocitelor (fig. 20).

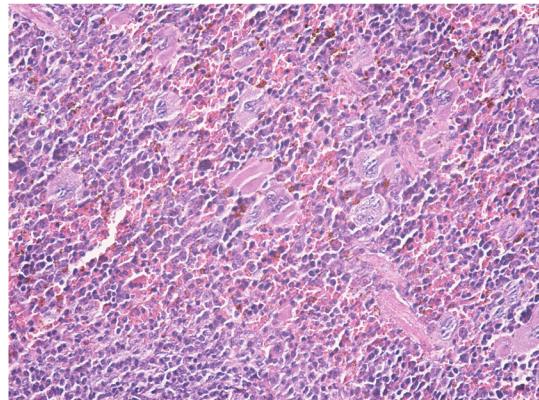


Figura 20. Splina de șoarece cu hiperplazia pulpei roșii
(oc. 10 x ob. 20).

UN-DDW: Splina prezintă hipertrofia și hiperplazia pulpei albe (fig. 21), fibroză intersticială, iar pulpa roșie este ușor dilatată și prezența de rare megakariocite.

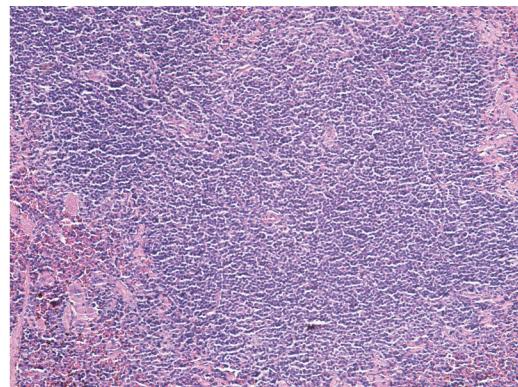


Figura 21. Splina de șoarece cu hiperplazia și hipertrofia pulpei albe
(oc. 10 x ob. 10).

UN-AD-X: Splina prezintă fibroză intersticială intensă, cu dilatarea pulpei roșii și modificări neomogene la nivelul pulpei albe; zone cu aspect normal alternând cu zone cu hipertrofia pulpei albe; hiperplazia celulelor reticulare (fig. 22); zone cu dilatarea capilarelor pulpei roșii.

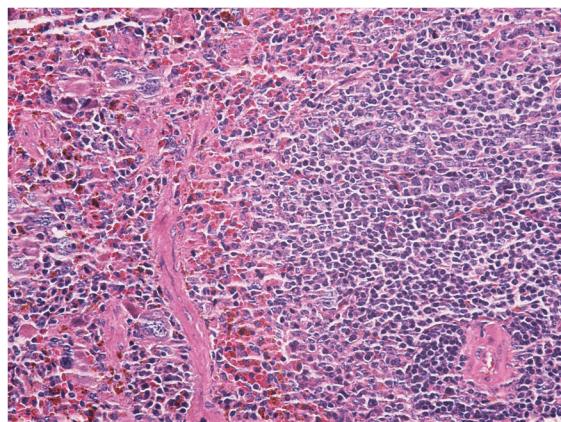


Figura 22. Splina de șoarece cu hiperplazia celulelor reticulare
(oc. 10 x ob. 20).

UN-DDW-X: Splina prezintă dilatarea spațiilor sinusoide de la nivelul pulpei roșii; pulpa albă are aspect normal, dar prezintă fibroză interstitională (fig. 23).

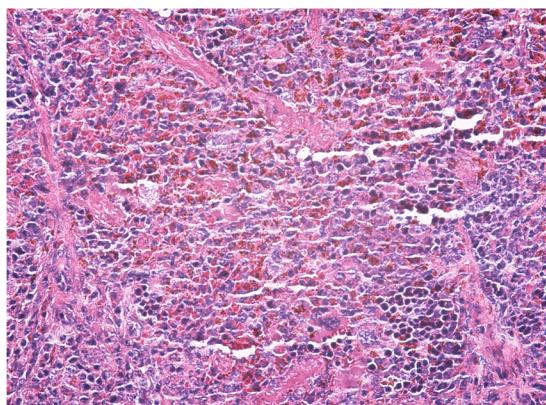


Figura 23. Splina de șoarece cu fibroză interstitională
(oc. 10 x ob. 20).

4.2. Efectul extractului de poliholoside

b) Investigații imunologice

În următoarele tabele 7 și 8 sunt prezentate valorile înregistrate pentru imunoglobuline, la *Mus musculus*, la variantele tratate cu extract de poliholoside din semințe de *Nigella sativa*, diluat în apă distilată, respectiv în apă sărăcită în deuteriu.

Tabel 7. Analiza imunoglobulinelor la variantele neiradiate de *Mus muscullus*.

Varianta neiradiată	IgG (mg/ml)	IgM (mg/ml)	IgA (mg/ml)	Hemoliză
M	4,2	0,8	2,5	
M-AD	12,0	2,0	3,0	-
M-DDW	10,0	1,7	2,6	hemoliză
Poliholoside din semințe de <i>Nigella sativa</i> , populația Maroc				
PN-AD	13	2,4	2,8	hemoliză
PN-DDW	13,1	1,2	2,5	hemoliză
Anonymous	0,1-1	1-10	1-3	

Tabel 8. Analiza imunoglobulinelor la variantele iradiate de *Mus muscullus*.

Varianta iradiată	IgG (mg/ml)	IgM (mg/ml)	IgA (mg/ml)	Hemoliză
M-X	1,4	0,4	2	
M-AD-X	11,0	1,4	3,8	ușoară hemoliză
M-DDW-X	7,0	3,0	3,5	-
Poliholoside din semințe de <i>Nigella sativa</i> , populația Maroc				
PN-AD-X	12	1,7	3	
PN-DDW-X	8	10	2	

Imunoglobulinele de tip IgG - la variantele martor tratate cu apă distilată, respectiv DDW se observă o creștere a valorilor IgG, atât pentru variantele neiradiate, cât și pentru cele iradiate, față de varianta martor neiradiată cât și cea iradiată; la animalele iradiate, scăderea valorii IgG este mai accentuată la varianta M-DDW-X.

Imunoglobulinele de tip IgM - se încadrează în limitele de referință, o ușoară creștere este înregistrată în cazul variantei M-DDW-X.

Imunoglobulinele de tip IgA - prezintă o ușoară creștere pentru variantele martor iradiate.

Pentru variantele tratate cu poliholoside din *Nigella sativa*, valorile IgG înregistrează o ușoară scădere pentru varianta PN-AD-X și o scădere semnificativă în cazul variantei PN-DDW-X.

Se înregistrează o ușoară scădere a valorilor IgM pentru varianta PN-AD-X și o creștere semnificativă pentru varianta PN-DDW-X.

Se observă o creștere nesemnificativă în cazul variantei PN-AD-X și o scădere nesemnificativă pentru varianta PN-DDW-X (fig. 24).

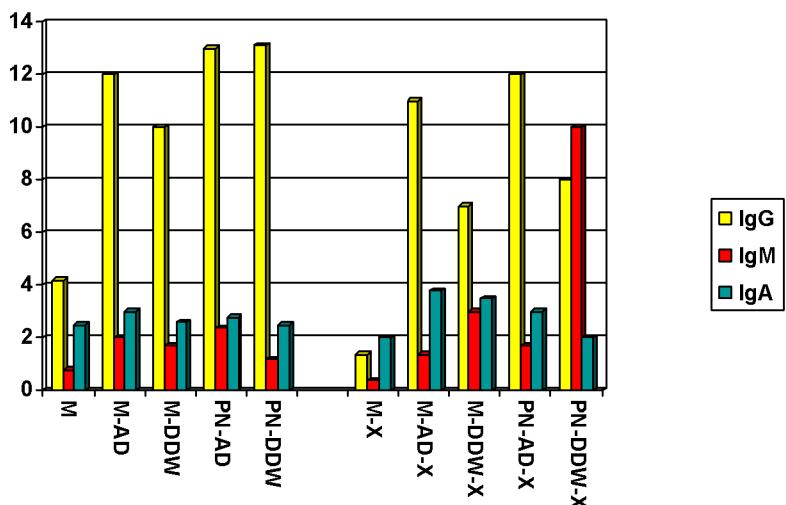


Figura 24. Grafic comparativ între loturile martor și cel tratat cu poliholoside din *Nigella sativa* neiradiate și cele iradiate, privind analiza imunoglobulinelor.

4.3. Efectul extractului de alcaloizi

c) Investigații ultrastructurale

Varianta M-AD: Lobul hepatic prezintă o venă centrolobulară acoperită cu un epiteliu; în jurul venei centrolobulare sunt dispuse capilarele sinusoide. Hepatocitele au formă poligonala și sunt dispuse în rânduri; fiecare hepatocit prezintă doi nuclei de formă oval-sferică. În citoplasmă, sunt prezente numeroase mitocondrii, cu structură normală cu matrice densă. Printre mitocondrii este dispersat reticulul endoplasmic rugos format din profile înguste, de obicei, dispuse în jurul mitocondriilor (Fig. 25).

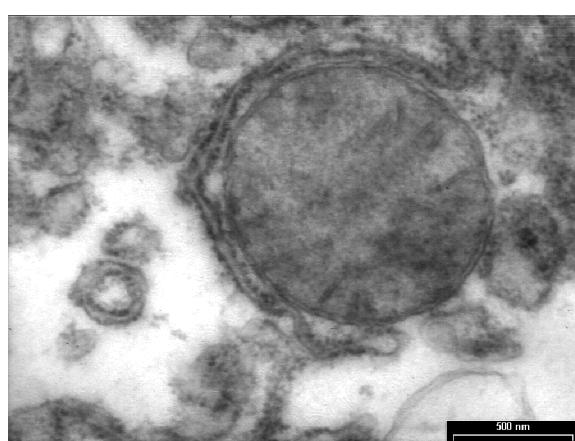


Figura 25. Mitocondrie cu criste ușor dilatate.

Varianta M-DDW: Hepatocitele prezintă unele modificări ușoare, care nu afectează semnificativ metabolismul celular. Reticulul endoplasmic rugos prezintă o activitate intensă, în comparație cu varianta de control, fiind dispus în canalicule paralele, pregătit pentru sinteza proteinelor, dar prezintă unele dilatații ușoare. De asemenea, reticulul endoplasmic neted este hipertrofiat în comparație cu varianta martor tratată cu apă distilată, fiind implicat în procesul de detoxifiere (fig. 26).

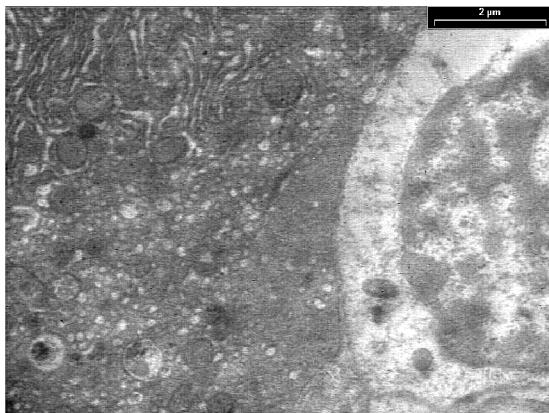


Figura 26. Reticulul endoplasmatic neted hipertrofiat.

Varianta AN-AD: În cazul administrării extractului de alcaloizi dizolvat în apă distilată, nu este afectată ultrastructura celulelor. Nucleul are structură normală, cu aglomerări (de blocuri) de heterocromatină dispersate în conținutul său nuclear interior sau în apropiere. De asemenea, mitocondriile prezintă o structură normală, cu o matrice compactă și criste lungi și numeroase spre interior. Reticulul endoplasmic rugos și reticulul endoplasmic neted sunt bine reprezentați (fig. 27).

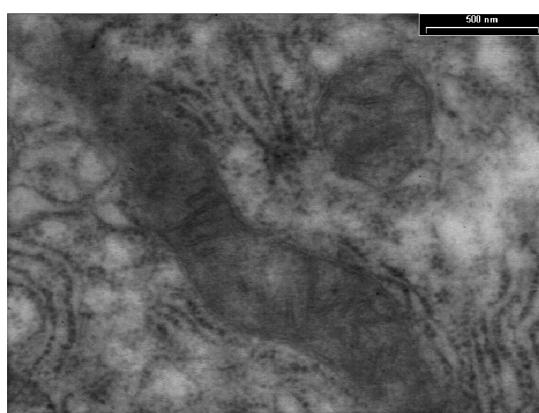


Figura 27. Mitocondrii și reticul endoplasmic rugos.

Varianta AN-DDW: Extractul de alcaloizi din semințele de *Nigella sativa* diluat în DDW nu afectează structura normală a hepatocitelor. Nucleul prezintă un polimorfism în ceea ce privește forma lor și stadiul ciclului celular. În unele celule, cromosomii sunt bine structurați, celulele fiind într-o activitate metabolică intensă (fig. 28).

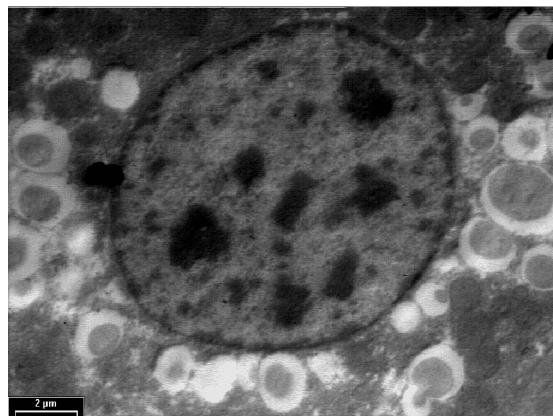


Figura 28. Nucleu având cromosomii structurați.

Varianta M-AD-X: Sub acțiunea iradierii, au fost induse unele modificări: nucleiile hepatocitelor prezintă contur neregulat; unii nuclei fiind hipertrofați (fig. 29). De asemenea, vacuolele și alte componente amorfice sunt hipertrofiate. Reticulul endoplasmic neted este proliferat, ca reacție la acțiunea distructivă a razelor X. Reticulul endoplasmic rugos prezintă cisterne dilatate și ribozomi mici fapt asociat diminuării activității metabolice și a sintezei de proteine.

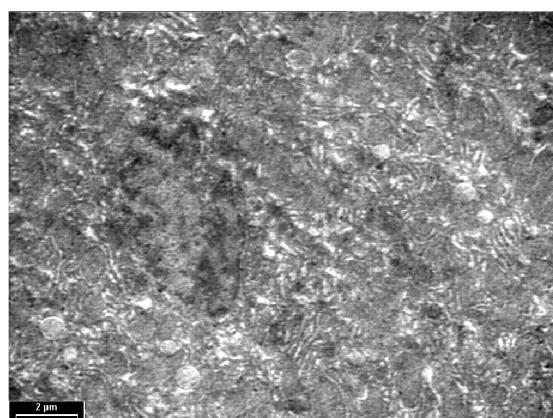


Figura 29. Nuclei picnotici și hiperchromi; reticul endoplasmic cu cisterne dilatate.

Varianta M-DDW-X: La această variantă, reticulul endoplasmic rugos este mai bine reprezentat în celulă, în comparație cu cazul animalelor iradiate. De asemenea, în cazul acțiunii combinate a DDW și a factorului de stres (raze X), picăturile de lipide sunt într-un număr mai mic în celule, comparativ cu varianta martor neiradiat sau iradiat. Nucleul prezintă contur neregulat iar cromatina este rarefiată. Nucleolii sunt hipertrofiați, iar componentele vacuolare și amorfă sunt îmbunătățite cantitativ sau au o structură alterată. La polul vascular al hepatocitelor, plasmalema unor celule este densă și mulți compuși migrează în sinusoide (fig. 30).

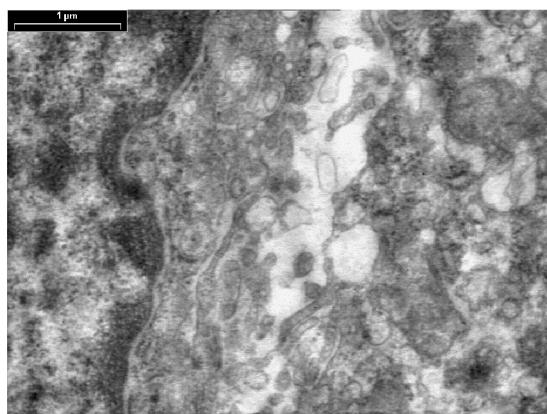


Figura 30. Proeminări ale hepatocitelor în spațiul Disse.

Varianta AN-AD-X: Prezența extractului de alcaloizi diluat în apă distilată, are un efect radioprotector, în comparație cu caracteristicile ultrastructurale înregistrate la prezența alcaloizilor diluați în DDW. Nucleul prezintă o structură normală cu heterocromatina dispusă în interiorul sau în apropierea membranei nucleare. De asemenea, nucleolii prezintă o activitate metabolică intensă. Unele mitocondrii prezintă o structură normală (fig. 31) în timp ce altele prezintă o structură alterată. În acest caz, matricea lor prezintă unele regiuni rarefiate, cu criste sunt puține și de lungime scurtă.

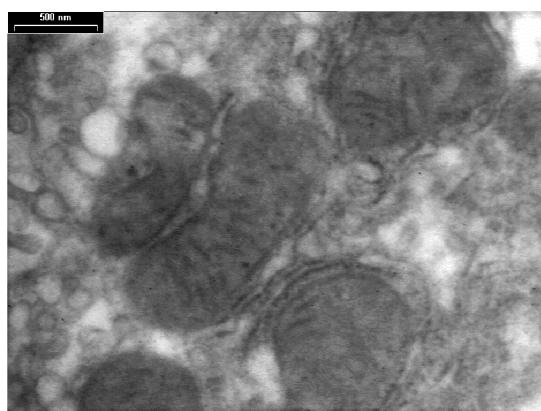


Figura 31. Mitocondrii.

Varianta AN-DDW-X: Modificările ultrastructurale induse de razele X, în prezența DDW au fost majore în comparație cu modificările înregistrate sub acțiunea singulară a razelor X. În unele celule, nucleul are forma normală, cu heterocromatina dispusă în blocuri (în interiorul acestuia), precum și pe partea interioară a membranei nucleare (fig. 32).

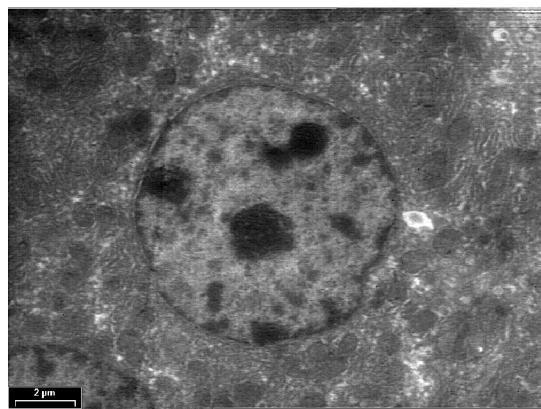


Figura 32. Dispunerea heterocromatinei în blocuri dense în interiorul nucleului.

a) Investigații citogenetice

În tabelele 9 și 10 sunt prezentate rezultatele analizelor citogenetice la *M. muscullus*, la variantele tratate cu extract de alcaloizi din semințe de *Nigella sativa*, diluat în apă distilată, respectiv în apă săracită în deuteriu.

Tabel 9. Caracteristicile metafazelor la variantele neiradiate de *Mus muscullus*.

Varianta neiradiată	Metafaze normale %	Gaps %	Metafaze poliploide %	PCD %	Metafaze cu fragmente	Fragmente/ 100 metafaze
M-AD	92	-	-	-	-	-
M-DDW	94	-	-	6	-	-
AAN-AD	94	-	-	6	-	-
AAN-DDW	94	-	-	6	-	-
ABN-AD	90	4	-	6	-	-
ABN-DDW	94	-	-	6	-	-

Tabel 10. Caracteristicile metafazelor la variantele iradiate de *Mus muscullus*.

Varianta neiradiată	Metafaze normale %	Gaps %	Metafaze poliploide %	PCD %	Metafaze cu fragmente	Fragmente/ 100 metafaze
M-AD-X	65	-	12	12	11	16,7
M-DDW-X	85	15	-	-	-	-
AAN-AD-X	80	6	4	10	-	6
AAN-DDW-X	86	-	1	8	2	3
ABN-AD-X	79	5	5	8	3	4
ABN-DDW-X	86	-	4	8	2	3

Gaps-urile au avut drept cauză principală procese de decondensare a fibrelor de cromatină. De asemenea, în cazul iradierii X, a fost întâlnită decondensarea cromosomilor (varianta ABN-AD-X) sau depolimerizarea lor (varianta AAN-DDW-X), precum și cazuri de hipoploidie.

În cazul animalelor la care a fost administrat intraperitoneal, înaintea și după iradiera X soluții apoase de extract total de alcaloizi din semințe de *Nigella sativa*, procentul de metafaze anormale și de fragmente acentrice prezente la 100 metafaze a înregistrat valori mai scăzute, subliniind efectul protector al celor două tipuri de substanțe bioactive. Aceste valori au fost sensibil mai scăzute în cazul administrării celor două tipuri de alcaloizi în DDW, de unde efectul protector înregistrat de această combinație.

5. DISCUȚII ASUPRA RĂSPUNSULUI IMUN

În general, efectele nocive ale radiațiilor X asupra măduvei osoase sunt observate prin scăderea numărului de hematii, leucocite, trombocite, scăderea procentului de limfocite și creșterea procentului de monocite; în cazul analizelor efectuate se observă o scădere mai mare a procentului de limfocite la variantele iradiate, mai ales la cele nefiltrate cu substanțe bioactive.

Pentru cercetările noastre este dificil să susținem care sunt mecanismele prin care acționează extractele vegetale. Totuși, pe baza unor date bibliografice putem considera că sunt implicate principiile active, care protejează împotriva acțiunii radicalilor liberi și astfel pot preveni efectele nocive ale radiațiilor. Acești compuși aparțin la numeroase specii chimice (vitamine, carotene, fenoli, glicozide, polifenoli, flavonoide, saponine, etc.) și sunt denumiți chemopreventori (Stavric, 1993). Mecanismele de acțiune ale chemopreventorilor sunt complexe și heterogene, iar capacitatea lor antioxidantă are un rol semnificativ în efectele hepatoprotectoare, fapt pentru care pot fi inclusi în prima linie de apărare celulară împotriva xenobioticelor (Rusu M.A. și colab., 2005). La nivel intracelular, aceste substanțe active reprezintă adevărate capcane pentru grupările electrofile ale radicalilor liberi pe care astfel îi neutralizează; de asemenea, sunt capabile să reducă activitatea enzimelor implicate în formarea radicalilor liberi, precum și să crească activitatea enzimelor responsabile de detoxifierea radicalilor liberi (Stavric, 1993).

Administrarea extractelor vegetale din cortex de *Aralia mandshurica* și din semințe de *Nigella sativa* șoareciilor *Mus musculus*, pe o perioadă de 13 zile, nu manifestă efecte toxice secundare la nivelul organelor studiate: splină, ficat, măduvă hematogenă; acestea au acțiune protectoare asupra ficatului, splinei și măduvei hematogene. Investigațiile structural-funcționale efectuate demonstrează faptul că extractele vegetale testate stimulează într-o oarecare măsură proliferarea, diferențierea și maturarea celulelor la nivelul ficatului și splinei.

Acțiunea toxică a radicalilor este îndreptată preponderent asupra organelor cu diviziuni celulare intense, cele mai afectate fiind măduva hematogenă, ficatul și splina, organe caracterizate printr-o profundă perturbare a componentei celulare cât și a celei vasculare.

În cadrul experimentelor, în cazul iradierii-X, procentul de neutrofile crește, iar prin activarea metabolismului oxidativ participă la formarea radicalilor liberi de oxigen toxici (RLO), dar și alte specii de oxigen redus care, dacă se formează în exces pot provoca nu numai distrugerea materialului fagocitat, dar și grave injurii vasculare. Creșterea numărului de neutrofile determină inflamație, prin lezare tisulară directă, datorită generării radicalului superoxid. În cazul tratamentelor cu extractele utilizate se poate observa efectul radioprotector asupra elementelor figurate ale săngelui. Deși au extindere deosebită, modificările structurale și ultrastructurale induse de radiații sunt reversibile, fapt dovedit prin reluarea funcționalității organelor studiate – măduva hematogenă; la 5 zile de la administrarea dozei de radiații, parametrii hematologici sunt inferiori martorului.

Uleiul volatil din cortex de *A. mandshurica* are proprietăți imunomodulatorii și antiinflamatorii, semnificative pentru variantele neiradiate (diluția cu DDW), iar pentru variantele iradiate (diluția cu apă distilată). La variantele iradiate (diluția cu apă distilată) se înregistrează un proces inflamator declanșat ca reacție de apărare împotriva factorului de stres, observat prin hipertrofia hepatocitelor, cât și hipertrofia și hiperplazia foliculilor limfatici Malpighi. La variantele iradiate (diluția cu DDW) se observă un infiltrat inflamator redus, ceea ce denotă un efect hepatoprotector, dar și imunostimulator, observat prin dilatarea pulpei roșii și hiperplazia foliculilor din pulpa albă.

Administrarea extractului de poliholoside din cortex de *A. mandshurica* diluat atât în apă distilată, cât și în DDW, a determinat stimularea imunității, prin stimularea sistemului fagocitar polimorfonuclear și al celui mononuclear. De asemenea, pentru variantele iradiate a determinat o stimulare a repopulării sanguine cu elemente figurate, datorită probabil stimulării granulocitopoiezii, limfopoiezii și monocitopoiezii la nivelul măduvei hematogene. Extractul de poliholoside manifestă efect protector atât înainte, cât și după iradirea X, fapt observat prin scăderea procentajului de metafaze anormale și fragmente acentrice înregistrate la 100 de metafaze.

Administrarea extractului de polifenoli și flavone din cortex de *A. mandshurica* are efect radioprotector, antiinflamator și antioxidant, influențând favorabil regenerarea hematiilor și leucocitelor, putând fi utilizată cu rezultate spectaculoase în tratamentul anemiilor și leucemiiilor. Extractul de polifenoli și flavone diluat atât în apă distilată, cât

și în DDW, prezintă proprietăți imunostimulatoare pentru varianțele iradiate, fapt observat prin creșterea valorilor IgG, IgM și IgA. De asemenea are proprietăți antioxidantă și hepatoprotectoare, prin anihilarea alterărilor produse de radiațiile X (menținând activitățile metabolice normale în hepatocite și ajutând astfel la regenerarea acestora), iar la nivelul splinei o accelerare a proceselor de refacere structurală, dereglată de acțiunea radiațiilor X.

Uleiul volatil din semințe de *Nigella sativa* are proprietăți radioprotectoare, imunostimulatoare și antioxidantă, implicând prevenirea daunelor oxidative induse de radiații. Administrarea uleiului volatil (diluția cu DDW) are acțiune de stimulare a proceselor de refacere structurală a măduvei hematogene pentru varianțele iradiate, comparativ cu extractul diluat în apă distilată. Extractul de ulei volatil (populația Maroc și Craiova), conduce la mărirea valorilor imunoglobulinelor IgG, IgM și IgA, cele mai bune valori obținându-se pentru IgG la utilizarea uleiului volatil - populația Maroc și pentru IgA și IgM - populația Craiova. Pentru varianțele iradiate, uleiul volatil a determinat la nivelul splinei un proces de refacere structurală (datorită acțiunii toxice a radiațiilor X), fenomen observat la nivelul foliculilor splenici, care sunt bine reprezentați și cu centrul germinativ dezvoltat.

Extractul de poliholoside din semințe de *Nigella sativa* are capacitatea de a proteja celulele hematopoietice, prin stimularea sistemului fagocitar mononuclear și polimorfonuclear, valori mai bune înregistrându-se pentru extractul diluat în DDW. Administrarea extractului de poliholoside a determinat creșterea nivelului de imunoglobuline, activarea celulelor NK și a unor populații de limfocite T, efectele nocive ale radiațiilor-X fiind diminuate la administrarea extractului de poliholoside (mai ales pentru cel diluat în DDW). Pentru varianțele iradiate, extractul de poliholoside a determinat o acțiune hepatoprotectoare, arhitectura ficatului fiind parțial păstrată, cu unele modificări nucleare preapoptotice. Pentru varianțele neiradiate, extractul de poliholoside diluat în apă distilată prezintă efect imunostimulator asupra splinei, observat prin hipertrofia pulpei albe și prezența numeroșilor foliculi cu centri germinativi, pe când extractul diluat în DDW prezintă efect imunosupresor, observat prin atrofia pulpei albe. În cazul variantelor iradiate, extractul manifestă o acțiune imunosupresoare, observată prin hipotrofia pulpei albe. De asemenea, administrarea extractului de poliholoside a

redus procentul diviziunii premature a centromerilor, iar procentul PCD este mărit sub doar la acțiunea radiațiilor X.

Extractul de alcaloizi din semințele de *Nigella sativa*, diluat în apă distilată, are un efect radioprotector, în comparație cu caracteristicile ultrastructurale înregistrate la prezența alcaloizilor diluați în DDW; iar la cinci zile după terminarea experimentului, analiza formulei leucocitare sugerează existența unui proces de adaptare a sistemelor enzimatic ale organismului la acțiunea factorilor de stres utilizați. Pentru variantele iradiate extractul de alcaloizi prezintă o acțiune ușor imunosupresoare. Extractul de alcaloizi diluat în apă distilată sau în DDW nu a afectat structura normală a hepatocitelor, pentru variantele neiradiate, pe când, pentru variantele iradiate a indus modificări structurale majore ale hepatocitelor, comparativ cu acțiunea singulară a razelor X. De asemenea, administrarea extractului de alcaloizi prezintă efectul protector al celor două tipuri de substanțe bioactive, procentul de metafaze anormale și de fragmente acentrice prezente la 100 metafaze înregistrând valori mai scăzute. Aceste valori au fost sensibil mai scăzute în cazul administrării celor două tipuri de alcaloizi în DDW, de unde efectul protector înregistrat de această combinație.

În concluzie, refacerea structurală și funcțională a organelor șoarecilor *Mus muscullus*, afectate de acțiunea distuctivă a radiațiilor X este mai rapidă sub acțiunea extractelor de *Aralia mandshurica* și *Nigella sativa*, comparativ cu refacerea de la sine; de asemenea, substanțele bioactive din cele două plante manifestă puternice activități antoxidante, radioprotectoare și imunostimulatoare. Compararea acestor rezultate cu cele obținute din studiile clinice alte altor cercetători pot sugera o posibilă aplicare a acestor extracte vegetale ca adjuvante sau suplimente alimentare, ajutând la menținerea unei bune homeostazii a organismului.

6. CONCLUZII

Cercetările experimentale realizate în scopul determinării efectului radioprotector și imunostimulator al unor extracte vegetale obținute din specii de *Aralia mandshurica* și *Nigella sativa* – au condus la următoarele concluzii:

1. În condiții normale, extractele din cortex de *Aralia mandshurica* au determinat stimularea imunității, prin stimularea sistemului fagocitar polimorfonuclear și mononuclear și creșterea valorilor imunoglobulinelor. Extractul de polifenoli și flavone diluat în DDW manifestă puternice efecte imunomodulatoare, observate prin hipertrofia pulpei albe, celule cu rare atipii nucleare și numeroși foliculi cu centri germinativi, iar la nivelul ficatului, hepatocitele au structură normală, iar celulele Kupffer prezintă lisosomi, hematină și în general material celular distrus.

2. În condiții de stres – radiații-X, administrarea extractelor din cortex de *Aralia mandshurica* au efect protector, mai accentuat pentru diluția cu DDW asupra structurii splinei, observat prin hipertrofia și hiperplazia pulpei roșii, dar și imunomodulatoare, observat prin creșterea numărului de megakariocite. La nivelul ficatului, extractele manifestă proprietăți antioxidantă și hepatoprotectoare, evidențiate prin hipertrofia hepatocitelor, iar în celulele Kupffer sunt prezenți lisosomi primari și secundari, cu reziduuri celulare. Efectul protector este subliniat și de scăderea procentajului de metafaze anormale și fragmente acentrice înregistrate la 100 de metafaze.

3. Extractele din semințe de *Nigella sativa* - mai ales extractul de ulei volatil - manifestă un puternic efect antioxidant și acționează ca un protector universal al celulelor; stimulează imunitatea, prin stimularea limfocitelor B și creșterea valorilor imunoglobulinelor. La nivelul splinei și ficatului, efectul imunostimulator al extractelor a fost observat prin hipertrofia pulpei albe, hiperplazia pulpei roșii, cu proliferarea megakariocitelor, respectiv cu arhitectura parțial păstrată a ficatului, structură normală a hepatocitelor și zone cu proliferarea vaselor interstițiale.

4. Pentru variantele iradiate, extractele din semințe de *Nigella sativa* prezintă proprietăți de protejare a celulelor hematopoietice și de stimulare a proceselor de

refacere structurală a măduvei hematogene; la cinci zile după terminarea experimentului, analiza formulei leucocitare sugerează existența unui proces de adaptare a sistemelor enzimatic ale organismului la acțiunea factorilor de stres utilizați. Efectul imunostimulator este observat la nivelul splinei prin zone cu aspect normal alternând cu zone cu hipertrofia pulpei albe, hiperplazia celulelor reticulare; la nivelul ficatului s-au evidențiat modificări nucleare moderate și severe ale hepatocitelor, zone cu dilatarea spațiilor porte și hiperemie vasculară.

5. Pentru variantele neiradiate, DDW prezintă efect protector, analizele hematologice și imunologice au prezentat valori ușor crescute față de varianta martor nefiltrată și neiradiată. La nivelul splinei se evidențiază efectul imunostimulator prin hipertrofia și hiperplazia pulpei albe, cu prezența de foliculi splenici mari, unii cu centri germinativi și cu numeroase limfocite și la nivelul pulpei roșii, respectiv hepatocitele prezintă modificări ușoare, mitocondriile au matricea densă, reticulul endoplasmic neted este hipertrofiat .

6. Pentru variantele iradiate, DDW prezintă efect protector pentru parametrii formulei leucocitare și imunostimulator evidențiat prin creșterea valorilor imunoglobulinelor; se observă hipertrofia și hiperplazia pulpei albe, numeroase limfocite și la nivelul pulpei roșii, iar în hepatocite se înregistrează modificări observate prin conturul neregulat al nucleilor, matricea citoplasmatică rarefiată și o cantitate mare de reticul endoplasmic rugos.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Abbas A.T., Abdel-Aziz M.M., Zalata K.R., Abd Al-Galel T.D.** (2005). Effect of dexamethasone and *Nigella sativa* on peripheral blood eosinophil count, Ig G1 and Ig G2, cytokine profiles and lung inflammation in murine model of allergic asthma. *Egypt Journal Immunology*, 2: 95-102.
- Abdel-Salam I.M., Amira R., Hassan A.M.** (1998). Radioprotective effects of *Nigella sativa* oil on the liver of Swiss albino mice. *Journal Egypt Biochemistry*, 16: 167-176.
- Abidov M.T., del Rio M.J., Ramazanov T.Z., Klimenov A.L., Dzhamirze Sh., Kalyuzhi8n O.V.** (2006). Effects of *Aralia mandshurica* and *Engelhardtia chrysolepis* extracts on some parameters of lipid metabolism in women with nondiabetic obesity. *Bulletin Experimental Biology and Medicine*, 141(3): 343-6.
- Ali B.H., Blunden G.** (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytotherapy Research*. 17(4): 299-305.
- Al-Ghamdi M.S.** (2001). Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activity of *Nigella sativa*. *Journal Ethnopharmacology*, 76: 45-8.
- Al-Ghamdi M.S.** (2003). Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage. *American Journal Chinese Medicine*, 31(5): 721-8.
- Assayed M.E.** (2010). Radioprotective effects of black seed (*Nigella sativa*) oil against hemopoietic damage and immunosuppression in gamma-irradiated rats. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32(2): 284-296.
- Badary O.A., Taha R.A., El-Din A.M.G., Abdel-Wahab M.H.** (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*, 26: 87-98.
- Badary O.A., Abd-Ellah M.F., El-Mahdy M.A., Salama S.A., Hamada F.A.** (2007). Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a) pyrene in mice. *Food Chemical Toxicology*, 45: 88-92.
- Baker, M. E.** (1998). Flavonoids as hormones. A perspective from an analysis of molecular fossils. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439, 249-276.
- Ballenger L.** (1999). "Mus musculus" (On-line), Animal Diversity Web. (2009). <http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus.html>

- Bamosa A., Ali B.A., Sowayan S.** (1997). Effect of oral ingestion of *Nigella sativa* seeds on some blood parameters. *Saudi Pharmacology Journal*, 5: 126-9.
- Bild W., Ștefănescu I., Hăulică I., Lupușoru C., Titescu G., Iliescu R., Năstasa V.** (1999). Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water. *Romanian Journal Physiology*, 36 (3-4):205-218.
- Bowen R.** (2004). Arhitecture of the liver, <<http://www.biology.about.com/library/.../bldigestliver.html>>.
- Bravo L.** (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Reviews*, 56: 317-333.
- Brekhman I.I.** (2002). A Review of the Clinical Trials and Evaluations of *Prime One* The following is a retrospective analysis of Prime One and its active ingredients, AMS Health Sciences, 1(1),
<http://www.amsonline.com/Edocs/Physicians_Reference_Guide.pdf>.
- Caceci T.** (2004). (VM 8054) Veterinary Histology Exercise 13 Lymphatic System: <<http://www.Liver and Other Organs education.vetmed.vt.edu/.../labs/...Lab13.html>>.
- Caceci T.** (2004). (VM 8054) Veterinary Histology Exercise 20 Digestive System: <<http://www.Spleen and Other Organs education.vetmed.vt.edu/.../labs/...Lab20.html>>.
- Cemek M., Büyükokuroğlu M.E., Bayiroğlu F., Koç M.** (2008). Irradiation, Radioprotection and *Nigella sativa*, Herbal Radiomodulators. Applications in Medicine, Homeland Defence and Space, p. 47-62,
<http://www.bookshop.cabi.org/Uploads/Books/PDF/>
- Coman N.** (2003). Genetică. vol. I, Universitatea “Babeș-Bolyai”, Facultatea de Biologie-Geologie Catedra de Ecologie-Genetică, Cluj-Napoca, p. 78-87.
- Corder C, Benghuzzi H, Tucci M, Cason Z.** (2003). Delayed apoptosis upon the treatment of Hep-2 cells with black seed. *Biomed. Sci. Instrum.*, 39:365-70.
- Corneanu G.** (1989). Elemente de radiobiologie vegetală. Edit. Ceres, Bucureşti, 37-44.
- Corneanu, C.G., Rogoz I., Rogoz S., Corneanu M., Zagnat M., Grigorescu E.M., Popa M.,** (2003). Testarea efectului radioprotector și imunostimulator al unor substanțe biologic active (poliholoside și saponine) extrase din *Nigella sativa* și *Aralia mandshurica*. Analele SNBC, Ed. Risoprint Cluj-Napoca, VIII: 315-322.

- Corneanu G.C., Rogoz I., Edițoiu C., Corneanu M., Atyim P., Zagnat M., Grigorescu M., Ștefănescu I., Corneanu L.M.** (2004). Efectul protector al apei superusoare și a două substanțe bioactive (extract total alcaloizi și poliholoside) în cazul iradierii-X la *Mus musculus*. Analele SNBC, Ed. Risoprint Cluj-Napoca, IX: (1): 260-265.
- Corneanu G.C., Drăgoi S.G., Șutru C., Corneanu M., Zagnat M., Grigorescu E., Atyim P., Melinte P.R., Popa M.** (2004). The single or combined effect of the X-rays and of two bioactive substances (saponins and polyholosides) at the liver level in *Mus muscullus L.*. Proceedings (Eds. Ivana Maksimović, Maja Čuvardić and Simonida Đurić), E.S.N.A. XXXIV, Annual Meeting, Ed. Monograf., Novi Sad: 82-85.
- Corneanu G.C., Crăciun C., Ciupină V., Prodan G., M. Corneanu , Atym P., Ștefănescu I., Iacob M., Corneanu L-M.** (2005). The efect of *Nigella sativa L.* alkaloids and of deuterium-depleted water on *Mus musculus L.* splin. Revue de Cytologie et Biologie végétales-Le Botaniste, 28 (s.i.), 84-91.
- Corneanu G.C., Ciupină V., Prodan G., Corneanu M., Ștefănescu I., Iacob M.** (2005). Efectul antibacterian și antiviral al ASDR. A XXIII-A Sesiune Științifică Anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară, Sibiu, 33: 159.
- Corneanu G.C., Ciupină V., Prodan G., Corneanu M., Ștefănescu I.,Atyim P., Iacob M., Popa M.** (2005). Efectul detoxifiant la nivelul ficatului și splinei la *Mus musculus*, sub acțiunea unor factori externi. Analele SNBC, Edit. Risoprint, Cluj-Napoca, X: 285-290.
- Corneanu G.C., Crăciun C., Ciupină V., Prodan G., Corneanu Mihaela, Atym P., Ștefănescu I., Iacob M.** (2006). Ultrastructural effects of *Nigella sativa* total alkaloids extract at liver level (*Mus musculus*). 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-East European Countries, Iași, p. 105.
- Corneanu G.C., Siloși I., Rogoz S., Hădărugă N., Hădărugă D., Corneanu M., Edițoiu C., Rogoz I., Zagnat M., Ștefănescu I.** (2006a). Testing of immunostimulatory effect of the volatile oil (*Nigella sativa* and *Aralia mandshurica*) in *Mus musculus*. Analele Universității din Craiova, Biologie, Horticultură, Tehnica Prelucrării Produselor Agricole, Ingineria Mediului, XI (XLVII): 229-234.

- Corneanu G., Siloși I., Rogoz S., Corneanu M., Hădărugă N., Hădărugă D., Zagnat M., Ștefănescu I., Corneanu L-M., Popa M..** (2006b). Efectul radioprotector al DDW și al uleiului volatil din semințele de *Nigella sativa* sau din cortexul de *Aralia mandshurica*. Analele S.N.B.C., Edit. Risoprint, Cluj-Napoca, XI: 487-493.
- Corneanu C.G., Siloși I., Rogoz S., Hădărugă N., Hădărugă D., Edițoiu C., Rogoz I., Zagnat M.** (2006c). The radioprotective effect of the volatile oil, estimated on the immunoglobulines quantity in mice (*Mus musculus L.*). University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Annual Meeting, Iași, XXXVI: 25.
- Corneanu C. G., Corneanu M., Atyim P., Crăciun C.** (2007a). The COX-2 gene implication in the immune response (experiments on animals, *Mus musculus L.*). Analele Universității din Craiova, Agricultură-Montanologie-Cadastru, vol. XXXVII/A: 525-535.
- Corneanu C.G., Corneanu M.** (2007b). Genetica. In: Enciclopedie de Biologie (Coord. Gh. Mohan, A. Ardelean), pp. 611-763, Edt. All, București.
- Corneanu C.G., Corneanu M., Crăciun C., Zagnat M., Ștefănescu I., Popa M.** (2010). The radioprotective effect of deuterium depleted water and polyphenols. Environm. Eng. & Managem. J., 9 (11): 1509-1514.
- Corneanu M., Corneanu C.G.** (2005). Genetică generală și evoluția genomului. Edit. Universitaria Craiova.
- Decker K.**, (1990). Biologically active products of stimulated liver macrophages (*Kupffer cells*). *European Journal Biochemistry*, 192: 2245-261.
- Demir H., Kanter M., Coskun O., Hulya U.Y., Koc A., Yildiz A.** (2006). Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on heart rate, some hematological values, and pancreatic β -cell damage in cadmium-treated rats. *Journal Biological Trace Element Research*, 10(2): 151-162.
- El-Naggar A.M., El-Deib A.M.** (1992). A study of some biological activities of *Nigella sativa* (black seeds) "Habat El Baraka." *Journal Egypt Societies Pharmacology, Experimental Therapy*, 11: 781-99.
- Enomoto, S., Asano R., Iwahori Y., Narui T., Okada Y., Singab A.N., Okuyama T.** (2001). Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. *Biological Pharmacology Bulletin*, 24: 307-310.
- Ghiorghită G., Corneanu G.** (2002). Radiobiologie, Edit. Alma Mater, Bacău.

- Goodall K.B.** (2003). In search of the fountain of youth. Preliminary analysis of deuterium's role in DNA degradation,
[<http://www.dd-water.ru/properties/in_search_of_the_fountain_of_youth.pdf>](http://www.dd-water.ru/properties/in_search_of_the_fountain_of_youth.pdf).
- Kanter M.** (2008). *Nigella sativa* and Derived Thymoquinone Prevents Hippocampal Neurodegeneration After Chronic Toluene Exposure in Rat. *Journal Neurochemical Research*, 33(3): 579-588.
- Maslov L. N., Guzarova N. V.** (2007). Cardioprotective and antiarrhythmic properties of preparations from *Leuzea carthamoides*, *Aralia mandshurica*, and *Eleutherococcus senticosus*. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 70(6): 48-54.
- Pașca C., Crăciun C., Ardelean A.** (2000). Efecte secundare ale unor citostatice asupra organismului, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca.
- Roitt I., Brostoff J., Male D.** (2001). Immunology, Sixth edition, Mosby, W.B. Saunders, London.
- Rusu, M.A., Crăciun, C., Rusu, M.L., Puică, C.** (2005). Xenobiotice și radicali liberi cu tropism hepatic: Hepatectomia chimică. Ed. Eikon, Cluj-Napoca.
- Smith L.E., Nagar S., Kim G.J., Morgan W.F.** (2003). Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. *Health Physiology*, 85: 23-9.
- Stavric B.** (1994). Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 32(1): 79-90.
- Ștefănescu I., Manolescu N., Comișel V., Tamaian R., Titescu G.** (2008). Deuterium depleted water effects on Walker tumours. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 65(1):443-450;
- Titescu G., Iliescu R., Nastasa V., Bild W., Stefanescu I., Haulica I., Lupusoru C.** (1999). *Apa echilibrată în deuteriu*, Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water. *Romanian Journal Physiology*, 36(3-4) : 18-205.
- Zagnat M.** (2003). *Aralia mandshurica Rupr et Maxim.* – a plant with a realy perspective for Roumania. „*Ovidius*“ University Annals of Medical Science – Pharmacy, 1(2): 18-21.

LUCRĂRI ELABORATE DIN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT

1. **Edițoiu C., Popescu C., Ispas G., Corneanu G.C., Zagnat M., Ștefănescu I. (2010).** The effect of biologically active substances of *Aralia mandshurica* and deuterium depleted water on the structure of spleen in *Mus musculus*. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, Cluj-Napoca, Vol. XV (2): 212-216.
2. **Edițoiu C., Corneanu G.C., Popescu C., Ispas G., Zagnat M., Atyim P., Ștefănescu I. (2010).** The hepatoprotective and immunostimulating effect of the volatile oil and polyholosides in *Nigella sativa*. Scientific Conferences with International Participation „Durable Agriculture – Agriculture of the Future“ – the 6th edition; The National Mycology Symposium – the 22nd edition, Craiova, Vol. XL (2): 300-305.
3. **Corneanu G.C., Rogoz I., Edițoiu C., Corneanu M., Atyim P., Zagnat M., Grigorescu M., Ștefănescu I., Corneanu L.M. (2004).** Efectul protector al apei superusoare și a două substanțe bioactive (extract total alcaloizi și poliholoside) în cazul iradierii-X la *Mus musculus*. Analele SNBC, Ed. Risoprint Cluj-Napoca, IX: (1): 260-265.
4. **Corneanu G.C., Siloși I., Rogoz S., Hădărugă N., Hădărugă D., Corneanu M., Edițoiu C., Rogoz I., Zagnat M., Ștefănescu I. (2006a).** Testing of immunostimulatory effect of the volatile oil (*Nigella sativa* and *Aralia mandshurica*) in *Mus musculus*. Analele Universității din Craiova, Biologie, Horticultură, Tehnica Prelucrării Produselor Agricole, Ingineria Mediului, XI (XLVII): 229-234.
5. **Corneanu C.G., Siloși I., Rogoz S., Hădărugă N., Hădărugă D., Edițoiu C., Rogoz I., Zagnat M. (2006c).** The radioprotective effect of the volatile oil, estimated on the immunoglobulines quantity in mice (*Mus musculus L.*). University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Annual Meeting, Iași, XXXVI: 25.